

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

**Efeitos de extratos de *Carica papaya* nos padrões de expressão de  
genes reguladores da hemoglobina fetal**

Maria Inês Joaquim dos Santos Mendes

Orientadores:

Professora Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro (ESTeSL, H&TRC)

Professor Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

**Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde**

Lisboa, 2022

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

**Efeitos de extratos de *Carica papaya* nos padrões de expressão de genes reguladores da hemoglobina fetal**

Maria Inês Joaquim dos Santos Mendes

Professora Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro (ESTeSL, H&TCR)

Professor Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Júri:

Presidente: Professor Doutor Bruno Filipe Sousa Carmona (ESTeSL)

Arguente: Professora Doutora Joana Dias Apolónio Viegas (ABC - Algarve Biomedical Center)

Mestrado em **Tecnologias Moleculares em Saúde**

(Esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2022



Mestrado em  
Tecnologias  
Moleculares  
em Saúde

EFEITOS DE EXTRATOS DE CARICA PAPAYA NOS PADRÕES DE  
EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DA HEMOGLOBINA FETAL

Maria Inês  
Mendes

**2022**



## **Efeitos de extratos de *Carica papaya* nos padrões de expressão de genes reguladores da hemoglobina fetal**

Maria Inês Joaquim dos Santos Mendes

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 e parcialmente suportado pela FCT/MCTES (UIDB/05608/2020 e UIDP/05608/2020). 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 Duque de Brito (ESTeSL) e da Professora Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro (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 – Maria Inês Mendes

## Agradecimentos

---

Ao finalizar este mestrado não posso deixar de agradecer às pessoas que me acompanharam e que de alguma forma ajudaram-me a concluir este percurso.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, na pessoa da Presidente desta Escola, pelas condições proporcionadas para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Edna Ribeiro e Professor Doutor Miguel Brito agradeço por toda a ajuda prestada na realização desta dissertação.

Aos Professores, Professora Doutora Anita Gomes e Professor Doutor Mário Gomes agradeço pelas suas recomendações e disponibilidade ao longo destes meses.

À Mariana Delgado, agradeço pela sua paciência, pelos seus ensinamentos e por estar sempre disposta a ajudar-me.

À minha companheira de viagem pelas terras da papaia, Beatriz Canteiro, agradeço pelo seu apoio, pelas conversas e por ser uma excelente colega de equipa.

Aos meus Professores que, ao longo do meu percurso académico, tentaram sempre inculcar-me os seus conhecimentos mesmo em tempo de pandemia.

Às minhas colegas de Mestrado e a toda a equipa de apoio ao laboratório.

Aos meus pais pelo apoio incondicional tanto a nível financeiro como a nível emocional.

Ao meu namorado, pela sua paciência e por estar sempre ao meu lado incentivando-me a não desistir.

Às minhas amigas, só tenho de agradecer o enorme carinho e o apoio dado ao longo da nossa amizade.

## Resumo

---

**Introdução:** As  $\beta$ -hemoglobinopatias são uma das doenças monogênicas mais comuns em todo o mundo. Atualmente, um dos tratamentos disponíveis passa pela indução farmacológica da hemoglobina fetal (HbF) através de compostos, tais como, a hidroxiureia (HU), contudo o seu perfil de segurança e o elevado custo em países subdesenvolvidos limitam a sua utilização. Nesse contexto, é essencial estudar novos compostos indutores de HbF que tenham efeitos adversos escassos e que possam estar amplamente disponíveis, como é o caso dos compostos naturais.

**Objetivo:** Avaliar o efeito do extrato metanólico das folhas de *Carica papaya* (EMFCP) e da Quercetina, em células linfoblásticas em suspensão (células K562), na expressão dos genes *HBG1* e *HBG2*.

**Métodos:** Células K562 foram expostas durante 24 horas ao EMFCP (0,5; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), à Quercetina (0,2 e 20  $\mu\text{M}$ ) e à HU (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Após a exposição ao EMFCP e à Quercetina, os efeitos na expressão gênica foram quantificados a partir do RNA total através do PCR quantitativo em Tempo Real. Os genes estudados foram *HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*, genes reguladores da  $\gamma$ -globina (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*), assim como moduladores epigenéticos desta globina (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* e HDAC classe I), tendo como gene de referência o *GAPDH*.

**Resultados:** Enquanto a proliferação celular é afetada pela Quercetina a 20  $\mu\text{M}$ , a viabilidade não é afetada por nenhum dos compostos nas concentrações avaliadas. A análise transcricional demonstrou que o EMFCP e a Quercetina têm efeitos opostos nos padrões de expressão dos genes *HBB*, *MYB* e *KLF1*, o que sugere diferentes mecanismos de ação. Quanto à análise do potencial epigenético, o EMFCP parece aumentar a transcrição da maioria dos moduladores epigenéticos, enquanto a Quercetina parece ter um efeito inibitório nos genes *HDAC2* e *HDAC3*.

**Conclusão:** No geral, este estudo preliminar sugere que o EMFCP e a Quercetina podem modular a expressão da  $\gamma$ -globina, dos genes reguladores e dos moduladores epigenéticos da mesma, constituindo assim uma abordagem potencialmente eficaz para o tratamento de  $\beta$ -hemoglobinopatias.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -hemoglobinopatias, *Carica papaya*; reativação da hemoglobina fetal; expressão gênica, Quercetina

## Abstract

---

**Background:**  $\beta$ -Hemoglobinopathies are one of the most common human monogenic disorders in the world. Fetal hemoglobin (HbF) pharmacological induction, through compounds such hydroxyurea (HU), is one of the available treatments, however their safety concerns and the expensive cost in low- and middle-income countries limit their use. In this context, it is essential to study novel HbF-inducing compounds that have scarcer adverse effects and can be widely available, such as natural compounds.

**Objective:** Here, we evaluate the effect of *Carica papaya* methanolic leaf extract (CPMLE) and Quercetin, in suspension lymphoblastic cells (K562 cells), in expression of *HBG1* and *HBG2* genes.

**Methods:** Cells were exposed for 24 hours to CPMLE (0,5; 50 and 100  $\mu$ g/mL), Quercetin (0,2 and 20  $\mu$ M) and HU (25  $\mu$ g/mL). Gene expression differential effects after CPMLE and Quercetin exposure were quantified using total RNA through quantitative Real Time PCR. The studied genes were *HBA*, *HBB*, *HBG1* and *HBG2*,  $\gamma$ -globin expression regulators (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* and *BGLT3*), as well as epigenetic modulators of this globin (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* and HDAC class I), and *GAPDH* was used as a reference gene.

**Results:** While cell proliferation is affected by 20  $\mu$ M of Quercetin, viability is not affected by any of the compounds at the assessed concentrations. Transcriptional analysis demonstrated that CPMLE and Quercetin have divergent effects in *HBB*, *MYB* and *KLF1* expression levels, which suggests different mechanisms of action. As for the epigenetic potential analysis, CPMLE appears to increase transcription of most epigenetic modulators, while Quercetin appears to have an inhibitory effect on genes *HDAC2* and *HDAC3*.

**Conclusion:** Overall, this preliminary study suggests that CPMLE and Quercetin can modulate the expression of  $\gamma$ -globin, regulator genes and epigenetic modulators of this globin, thus potentially constituting an effective approach for treatment of  $\beta$ -hemoglobinopathies.

**Key Words:**  $\beta$ -hemoglobinopathies, *Carica papaya*; fetal hemoglobin reactivation; gene expression, Quercetin



# Índice Geral

---

<b>Agradecimentos</b> .....	I
<b>Resumo</b> .....	II
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Índice Geral</b> .....	V
<b>Índice de Tabelas</b> .....	IX
<b>Índice de Figuras</b> .....	XI
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	XIII
<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Hemoglobina</b> .....	1
<b>1.2. Regulação da expressão da hemoglobina</b> .....	1
1.2.1. BCL11A .....	3
1.2.2. KLF1 ou EKLF.....	4
1.2.3. LRF/ZBTB7A .....	5
1.2.4. HBSL1-MYB <i>intergenic region</i> (HMIP) .....	5
1.2.5. BGLT3 .....	6
1.2.6. Regulação epigenética .....	6
1.2.6.1. Metilação do DNA.....	7
1.2.6.2. Modificações pós-tradução proteica das histonas .....	8
1.2.6.3. RNAs não codificantes.....	9
1.2.6.4. Outros fatores epigenéticos envolvidos na regulação do gene da $\gamma$ -globina .....	9
<b>1.3. Hemoglobinopatias</b> .....	9
1.3.1. Anemia falciforme .....	10
1.3.2. Talassémias .....	10
<b>1.4. Terapêuticas para as <math>\beta</math>-hemoglobinopatias</b> .....	11
1.4.1. Reguladores epigenéticos.....	13
<b>1.5. Plantas medicinais / Produtos naturais</b> .....	14
1.5.1. Indutores naturais da HbF .....	15

1.5.1.1. Quercetina .....	16
1.5.2. <i>Carica papaya</i> L.....	17
1.5.2.1. Folhas da <i>C. papaya</i> L.....	19
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b> .....	21
<b>2.1. Geral:</b> .....	21
<b>2.2. Específicos:</b> .....	21
<b>Capítulo 3 - Material e Métodos</b> .....	23
<b>3.1 Colheita e preparação do material vegetal</b> .....	23
<b>3.2 Extração</b> .....	23
<b>3.3 Cultura de células</b> .....	23
3.3.1 Linha celular K562.....	24
3.3.2 Descongelamento e Passagem de células em suspensão .....	25
<b>3.4 Tratamentos</b> .....	26
<b>3.5 Análise da proliferação e da viabilidade celular</b> .....	27
<b>3.6 Extração de RNA e síntese de DNA Complementar (cDNA)</b> .....	28
<b>3.7 Amplificação de cDNA por PCR quantitativo em tempo real</b> .....	29
<b>3.8 Análise Estatística</b> .....	32
<b>3.9 Considerações ético-legais</b> .....	33
<b>Capítulo 4 - Resultados</b> .....	35
<b>4.1 Proliferação e viabilidade celular</b> .....	35
<b>4.2 Análise do perfil de expressão de genes das globinas</b> .....	38
4.2.1 Gene <i>HBA</i> .....	38
4.2.2 Gene <i>HBB</i> .....	40
4.2.3 Gene <i>HBG1</i> .....	42
4.2.4 Gene <i>HBG2</i> .....	43
<b>4.3 Análise do perfil de expressão de genes reguladores da <math>\gamma</math>-globina</b> .....	45
4.3.1 Gene <i>MYB</i> .....	45
4.3.2 Gene <i>KLF1</i> .....	47
4.3.3 Gene <i>BCL11A</i> .....	49
4.3.4 Gene <i>BGLT3</i> .....	51
<b>4.4 Análise do perfil de expressão de moduladores epigenéticos da <math>\gamma</math>-globina</b> .....	53
4.4.1 Gene <i>DNMT1</i> .....	53

4.4.2	Gene <i>DNMT3a</i> .....	54
4.4.3	Gene <i>DNMT3b</i> .....	56
4.4.4	Gene <i>HDAC1</i> .....	57
4.4.5	Gene <i>HDAC2</i> .....	59
4.4.6	Gene <i>HDAC3</i> .....	60
4.4.7	Gene <i>HDAC8</i> .....	62
<b>Capítulo 5 - Discussão</b> .....		65
<b>Capítulo 6 - Conclusão</b> .....		73
6.1	<b>Conclusões:</b> .....	73
6.2	<b>Estudos futuros:</b> .....	73
<b>Capítulo 7 - Referências Bibliográficas</b> .....		75
<b>Capítulo 8 - Anexos</b> .....		84
Anexo I: Descongelamento celular.....		84
Anexo II: Passagem de células em suspensão.....		85
Anexo III: Contagem de células com azul de tripano .....		86
Anexo IV: Extração de RNA.....		87
<b>Capítulo 9 - Apêndices</b> .....		89
Apêndice I: Quantificação do RNA.....		89
Apêndice II: Reação de síntese do cDNA .....		90
Apêndice III: Princípio da técnica de PCR quantitativo em tempo real e respetivo procedimento.....		92



## Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 3.1.</b> Sequências dos primers e temperaturas de melting específicas, que se utilizou na reação de PCR quantitativo em tempo real.....	30
<b>Tabela 9.1:</b> Resultados da quantificação do RNA presente nas amostras celulares...	89
<b>Tabela 9.2:</b> Volumes dos reagentes utilizados na reação.....	90
<b>Tabela 9.3:</b> Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação. ....	90
<b>Tabela 9.4:</b> Temperaturas e tempos utilizados na reação de obtenção de cDNA. ....	91
<b>Tabela 9.5:</b> Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação. ....	95
<b>Tabela 9.6:</b> Condições de amplificação da reação de qPCR. ....	95



## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.1.</b> Esquema da hemoglobina humana. ....	1
<b>Figura 1.2:</b> Hemoglobin Switching durante o desenvolvimento humano.....	2
<b>Figura 1.3:</b> Fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão do gene da globina fetal durante o hemoglobin switching. ....	3
<b>Figura 1.4:</b> Mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão génica. 7	
<b>Figura 1.5:</b> Visão global dos tratamentos e terapias para as hemoglobinopatias. ....	12
<b>Figura 1.6:</b> Mecanismos de regulação da expressão génica através dos compostos bioativos da dieta. ....	15
<b>Figura 1.7:</b> Indutores Naturais da HbF já reportados.....	16
<b>Figura 1.8:</b> Estrutura química da quercetina. ....	16
<b>Figura 1.9:</b> Taxonomia da <i>C. papaya</i> L. ....	18
<b>Figura 3.1:</b> <b>(A)</b> Morfologia da célula K562. Adaptado de (64). <b>(B)</b> Células K562 em suspensão com baixa densidade. Adaptado de (65).....	24
<b>Figura 3.2:</b> <b>(A)</b> Câmara de fluxo laminar (Foto tirada durante o projeto). <b>(B)</b> Meio RPMI (biowest). ....	25
<b>Figura 3.3:</b> Tratamentos em placas de seis poços. ....	27
<b>Figura 3.4:</b> <b>(A)</b> Zoom in de uma câmara de Neubauer e respetiva grelha de contagem. Adaptado de: (68). <b>(B)</b> Visualização das células numa câmara de Neubauer. As setas indicam células mortas. Adaptado de: (69). ....	28
<b>Figura 4.1:</b> Efeitos do EMFCP na proliferação (A) e na viabilidade (B) das células K562. ....	36
<b>Figura 4.2:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina na proliferação de células K562. ....	37
<b>Figura 4.3:</b> Efeito do EMFCP e da Quercetina na viabilidade das células K562.....	38
<b>Figura 4.4:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene HBA. ....	39
<b>Figura 4.5:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>HBB</i> . ....	41
<b>Figura 4.6:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene HBG1. ....	43
<b>Figura 4.7:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>HBG2</i> . ....	44

<b>Figura 4.8:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>MYB</i> . .....	46
<b>Figura 4.9:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>KLF1</i> . .....	48
<b>Figura 4.10:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>BCL11A</i> . .....	50
<b>Figura 4.11:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>BGLT3</i> . .....	52
<b>Figura 4.12:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>DNMT1</i> . .....	54
<b>Figura 4.13:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>DNMT3a</i> . .....	55
<b>Figura 4.14:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>DNMT3b</i> . .....	57
<b>Figura 4.15:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>HDAC1</i> . .....	58
<b>Figura 4.16:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>HDAC2</i> . .....	60
<b>Figura 4.17:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>HDAC3</i> . .....	62
<b>Figura 4.18:</b> Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene <i>HDAC8</i> . .....	63
<b>Figura 9.1:</b> Fases da curva de amplificação do qPCR (inicial, exponencial, linear e plateau) da quantidade relativa de fluorescência emitida em função do número de ciclos. .....	93
<b>Figura 9.2:</b> Etapas do workflow do qPCR para este estudo. ....	94

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

---

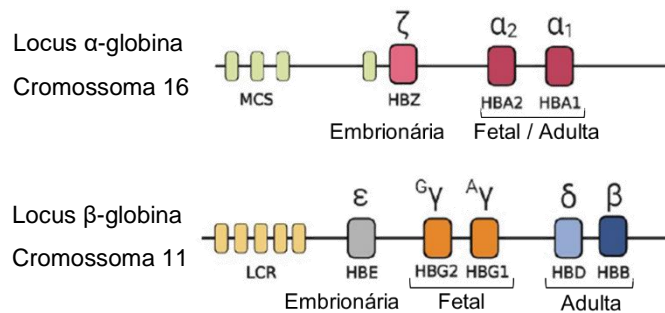
<b>AIPC</b>	Agência Internacional de Pesquisa no Cancro
<b>A<sub>230</sub></b>	Absorvância a 230 nm
<b>A<sub>260</sub></b>	Absorvância a 260 nm
<b>A<sub>280</sub></b>	Absorvância a 280 nm
<b>BGLT3</b>	Transcrito do locus da β-globina ( <i>Beta Globin Locus Transcript 3</i> )
<b>BCL11A</b>	<i>Proteína B-cell leucemia and lymphoma 11a</i>
<b>C<sup>-</sup></b>	Controlo negativo
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CPMLE</b>	<i>Carica papaya methanolic leaf extract</i>
<b>C<sub>q</sub></b>	Ciclo de quantificação
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferases
<b>DRED</b>	<i>Direct repeat erythroid-definitive complex</i>
<b>EKLF</b>	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>
<b>EMFCP</b>	Extrato metanólico de folhas de <i>Carica papaya</i>
<b>ESTeSL</b>	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
<b>FBS</b>	Soro de bovino fetal
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>HAT</b>	Acetil transferase de histona
<b>Hb</b>	Hemoglobina

<b>HbA</b>	Hemoglobina adulta
<b>HBA</b>	Gene da $\alpha$ -globina
<b>HBB</b>	Gene da $\beta$ -globina
<b>HbF</b>	Hemoglobina fetal
<b>HBG</b>	Gene da $\gamma$ -globina
<b>HbS</b>	Hemoglobina S
<b>HDAC</b>	Desacetilase de histona
<b>HDM</b>	Demetilase de histona
<b>HMT</b>	Metiltransferase de histona
<b>HU</b>	Hidroxiureia
<b>H&amp;TRC</b>	Centro de Investigação de Tecnologia e Saúde de Lisboa ( <i>Health and Technology Research Center of Lisbon</i> )
<b>iDNMT</b>	Inibidor das DNA metiltransferases
<b>iHDAC</b>	Inibidor das desacetilases de histona
<b>KLF1</b>	Fator de transcrição 1 do tipo Kruppel ( <i>Kruppel Like Factor 1</i> )
<b>LCR</b>	<i>Locus control region</i>
<b>LMC</b>	Leucemia mielóide crónica
<b>lncRNA</b>	<i>Long non-coding RNA</i>
<b>LRF</b>	<i>Leukemia/lymphoma related factor</i>
<b>LSD</b>	<i>Lysine demethylase</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MPT</b>	Modificações pós-tradução proteica
<b>MSC</b>	<i>Multispecies conserved sequence</i>
<b>MYB</b>	Família de genes MYB

<b>ncRNA</b>	RNA não codificantes
<b>NTC</b>	<i>No template control</i>
<b>NURD</b>	<i>Nucleosome Remodeling and Deacetylase</i>
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PHFH</b>	Persistência da hemoglobina fetal hereditária
<b>qPCR</b>	PCR (Reação em cadeia da polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) quantitativo
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>Ta</b>	Temperatura ambiente
<b>TET</b>	<i>Ten-eleven translocation</i>
<b>Tm</b>	Temperatura de melting
<b>UV</b>	Ultra-violeta

## 1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb), responsável pela oxigenação tecidual, está presente em grande quantidade nos eritrócitos ou glóbulos vermelhos (1). Nos humanos, esta proteína tetramérica é composta por duas cadeias  $\alpha$ -globina e duas cadeias  $\beta$ -globina (2), onde cada uma contém um grupo heme com um átomo de ferro (3). O locus da  $\alpha$ -globina, localizado no cromossoma 16, é constituído por 3 genes - *HBZ* ( $\zeta$ ) (embrionário), *HBA1* ( $\alpha_1$ ) (fetal/adulto) e *HBA2* ( $\alpha_2$ ) (fetal/adulto) (**Figura 1.1**) (4). Já o locus da  $\beta$ -globina, localizado no cromossoma 11, é composto por 5 genes – *HBE* ( $\epsilon$ ) (embrionário), *HBG1* ( $^A\gamma$ ) (fetal), *HBG2* ( $^G\gamma$ ) (fetal), *HBD* ( $\delta$ ) (adulto) e *HBB* ( $\beta$ ) (adulto), (**Figura 1.1**) (4).



**Figura 1.1.** Esquema da hemoglobina humana.

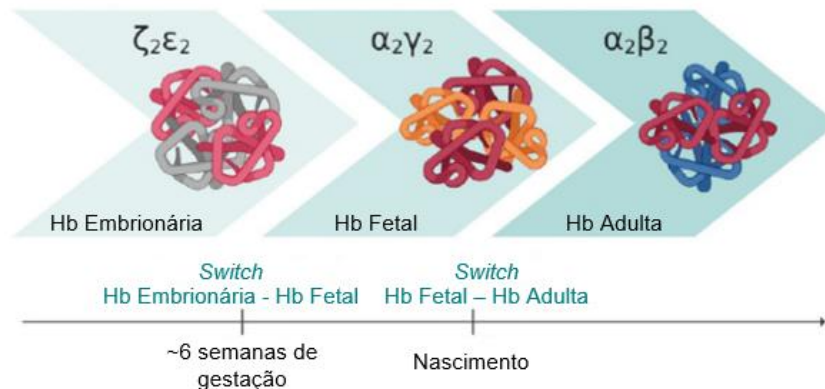
MCS- *multispecies conserved sequence*; LCR- *locus control region*. Adaptado de (4).

## 1.2. Regulação da expressão da hemoglobina

Durante o desenvolvimento humano, os níveis elevados de expressão dos genes do locus da  $\alpha$ -globina são assegurados por elementos regulatórios designados de *multispecies conserved sequence* (MCS), que encontram-se a montante do promotor da  $\zeta$ -globina (1) (**Figura 1.1**). Por outro lado, a expressão elevada dos genes da  $\beta$ -globina é garantida pela atividade da *locus control region* (LCR), uma região que encontra-se a montante do *HBE* (1). Neste período do desenvolvimento, e conforme a necessidade fisiológica de oxigénio, este mecanismo regulatório complexo desencadeia a alteração da composição do tetrâmero da hemoglobina (1), num processo conhecido como *hemoglobin switching* (4). Cada *switch* é acompanhado pela formação de um *loop* de cromatina que promove a interação entre o LCR e o promotor do gene alvo, traduzindo-

se na transcrição do mesmo (4). Enquanto isso os genes fora desse *loop* são silenciados (4).

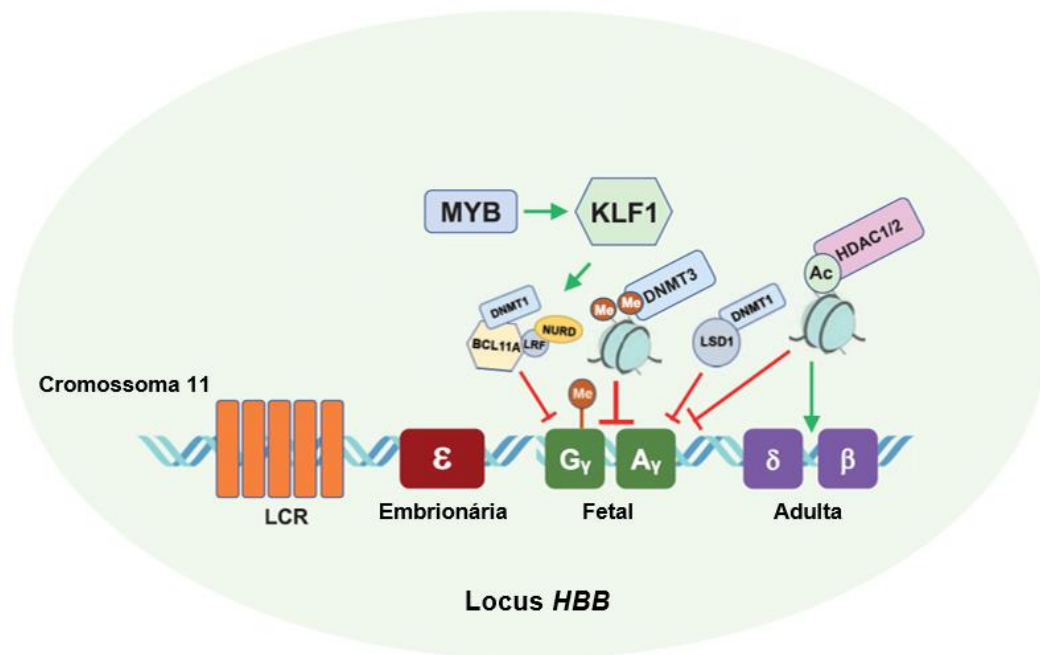
Ao longo do desenvolvimento ocorrem dois *switch* (**Figura 1.2**): o primeiro acontece por volta das 6 semanas de gestação onde começa a haver uma troca da  $\epsilon$ -globina para a  $\gamma$ -globina e o segundo decorre no nascimento onde inicia-se lentamente a substituição da  $\gamma$ -globina pela  $\beta$ -globina (4).



**Figura 1.2:** Hemoglobin Switching durante o desenvolvimento humano.

Adaptado de (4).

Este mecanismo de *switching* é facilitado por ativadores e repressores específicos (**Figura 1.3**) que atuam em diferentes alturas do desenvolvimento (5). Para além disto, no *switch* da  $\gamma$ -globina para a  $\beta$ -globina é sugerido que modificações epigenéticas mediadas por DNA metiltransferases (DNMTs), metiltransferases de histonas (HMTs), demetilases de histonas (HDMs), desacetilases de histonas (HDACs) e acetil transferases de histonas (HATs) também possam estar envolvidas neste processo (**Figura 1.3**) (6).



**Figura 1.3:** Fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão do gene da globina fetal durante o *hemoglobin switching*.

(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*. Setas verdes: indutores da HbF. Linhas vermelhas: repressores da HbF. Me: grupo metil na histona metilada. Me: grupo metil no DNA metilado. Ac: grupo acetil na histona acetilada). Adaptado de: (6)

### 1.2.1. BCL11A

O gene *BCL11A* (*B-cell lymphoma/leucemia 11 A*), localizado no braço curto do cromossoma 2 (7), é um inibidor da  $\gamma$ -globina nos humanos (**Figura 1.3**), estando a sua expressão aumentada em células eritroides adultas e diminuída em células fetais eritroides, apresentando nestas últimas níveis elevados de hemoglobina fetal (HbF) (1).

Foi mostrado que a diminuição do BCL11A em células K562 e em eritroblastos humanos leva ao aumento da expressão da  $\gamma$ -globina, evidenciado a atuação deste fator como inibidor da expressão da HbF (7).

O mecanismo de ação deste repressor transcricional ainda não é totalmente conhecido, no entanto foi demonstrado que interage com a cromatina do locus da  $\beta$ -globina como parte de um complexo onde outros fatores como GATA-1, FOG-1, KLF1 e SOX6 levam ao recrutamento de vários fatores epigenéticos tais como: complexo repressor

*Nucleosome Remodeling and Deacetylase* (NuRD), LSD1, DNMT1, HDAC1 e HDAC2 (7), para formar um complexo regulatório (2).

O NuRD é um complexo repressor constituído pelas HDAC1 e HDAC2, ambas críticas para o silenciamento da  $\gamma$ -globina (2). A interação deste complexo com o BCL11A sugere um papel mediador deste fator na localização deste complexo para o promotor da  $\gamma$ -globina (1).

Adicionalmente, foi mostrado que o BCL11A liga-se a outros repressores transcricionais como é o caso do LSD1/CoREST (*lisina demetilase/corepressor to repressor element 1-silencing transcription factor*), contudo desconhece-se o mecanismo de como contribuem para o silenciamento da  $\gamma$ -globina (8).

### 1.2.2. KLF1 ou EKLF

O gene *KLF1*, localizado no braço curto do cromossoma 19, codifica o fator de transcrição KLF1 (*Krüppel-like factor 1*), também conhecido como EKLF (*erythroid Krüppel-like factor*) (7). Este, pode regular o *switching* da  $\gamma$ -globina para a  $\beta$ -globina através de diferentes mecanismos de atuação (9). Por um lado, ativa o gene da  $\beta$ -globina através da formação de *loops* de cromatina que permitem a interação do LCR com o promotor do gene desta globina (7). Por outro lado, inibe indiretamente a expressão da  $\gamma$ -globina ao ativar repressores transcricionais tal como o BCL11A (7), em eritroblastos humanos adultos primários (10).

Zhou e colaboradores mostraram que a diminuição deste fator, em progenitores adultos eritróides, reduz significativamente os níveis de BCL11A, culminando na expressão do gene da  $\gamma$ -globina (11). Já o aumento do KLF1 para além de ativar o BCL11A, faz com que o LCR e o promotor da  $\beta$ -globina interagem, traduzindo-se na inibição da interação do LCR com o promotor da  $\gamma$ -globina e conseqüentemente à repressão da expressão desta globina (11).

Mutações neste fator têm sido reportadas em populações com risco para as hemoglobinopatias, uma vez que a diminuição do KLF1 impede o silenciamento da HbF, traduzindo-se no melhoramento da sintomatologia dos pacientes com estas patologias (7).

### 1.2.3. LRF/ZBTB7A

O leucemia/lymphoma related factor (LRF), codificado pelo gene *ZBTB7A* é um fator de transcrição que se liga diretamente ao promotor da  $\gamma$ -globina reprimindo a expressão desta durante a eritropoiese adulta (6).

No silenciamento da  $\gamma$ -globina, o LRF exerce a sua atividade ao inibir a descondensação da cromatina no promotor desta globina (1), como parte do complexo repressor NuRD por uma via independente do BCL11A (2).

Por outro lado, resultados obtidos por Masuda e colaboradores mostram que o LRF é um repressor da expressão das globinas embrionária e fetal em células adultas eritrocitárias (12). Mais ainda, estes investigadores supõem que a diminuição do LRF descondensa a cromatina dos genes da  $\gamma$ -globina, facilitando a interação de ativadores transcricionais com os promotores destes genes culminando na indução da expressão desta globina (12).

Adicionalmente, Weber e colaboradores (13) demonstram que mutações no local de ligação deste fator no promotor da  $\gamma$ -globina induzem o aumento da produção da HbF, salientando uma vez mais o papel repressor deste gene nesta globina.

### 1.2.4. HBSL1-MYB *intergenic region* (HMIP)

No braço longo do cromossoma 6 (6q23), entre os genes HBSL1 e MYB há uma região intergênica denominada HMIP, que está associada à indução da HbF (14).

O gene *HBS1L* é apontado como um gene *housekeeping*, enquanto o gene *MYB* tem um padrão de expressão restrito sendo imprescindível para o desenvolvimento eritrocitário (10). Os níveis de expressão do *c-MYB* e do *HBS1L* estão diminuídos em pessoas com níveis elevados de HbF (10), o que sugere que um ou ambos os genes estão envolvidos na regulação da hemoglobina fetal (15).

Mais ainda, em células K562 foi demonstrado que o aumento da expressão do *c-MYB* inibe a expressão da  $\gamma$ -globina, enquanto o aumento da expressão do *HBSL1* não tem qualquer efeito da expressão da mesma globina, culminando na observação que o *cMYB* é um fator chave na regulação da produção da HbF (15).

Estudos adicionais suportam um papel indireto do *MYB* na regulação da transcrição da  $\gamma$ -globina através da sua interação com o BCL11A e com o repressor TR2/TR4 (6). O aumento da expressão do fator de transcrição MYB inibe a expressão da  $\gamma$ -globina em

células K562, uma vez que ativa o KLF1 que por sua vez ativa o BCL11A (6). Já o silenciamento do *MYB* induz o aumento da expressão da HbF ao diminuir diretamente a expressão de elementos chave envolvidos no silenciamento do gene *HBG* como é exemplo o BCL11A e TR2/TR4 (1).

### 1.2.5. BGLT3

Mais recentemente descobriu-se um novo interveniente na regulação da  $\gamma$ -globina, o gene *BGLT3* (*Beta Globin Locus Transcript 3*) (16). Este, é transcrito simultaneamente com os genes da  $\gamma$ -globina em células eritrocitárias *in vitro* e *in vivo* e encontra-se a jusante do *HBG1* e a montante do *HBBP1*, numa região denominada região intergênica (16). Mutações nesta região levam à persistência da hemoglobina fetal hereditária (PHFH), uma condição benigna (17) em que há aumento da expressão da  $\gamma$ -globina, sugerindo a presença de inibidores desta globina neste local (16). Neste contexto surge o pseudogene *HBBP1*, também presente nesta região, que contribui para a inibição da HbF ao ligar-se, provavelmente, com o BCL11A (um conhecido repressor desta molécula) (16). A deleção deste locus pela tecnologia CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), em células K562, diminui a expressão da  $\gamma$ -globina (16).

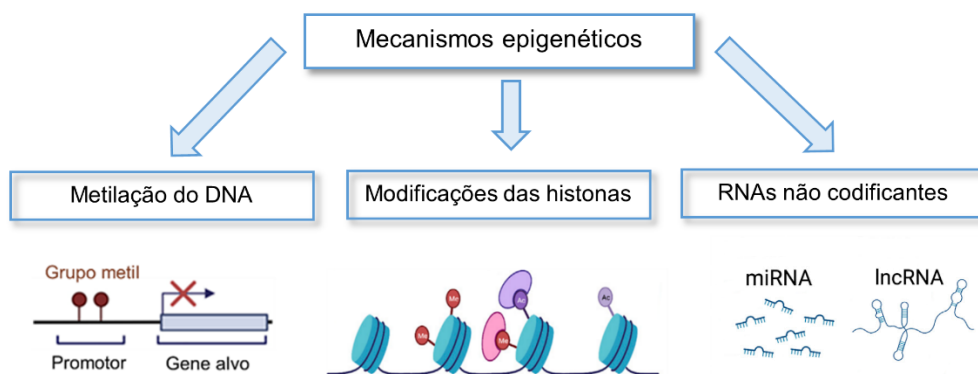
Em suma, este gene não codificante aumenta a produção da  $\gamma$ -globina (17).

### 1.2.6. Regulação epigenética

O termo “epigenética” foi descrito pela primeira vez em 1942 pelo pai da epigenética Conrad Waddington (18). Este ramo da biologia estuda as alterações hereditárias na expressão génica que não envolvem alterações na sequência do DNA (19).

O fenótipo de um indivíduo é resultante da descodificação de dois códigos (genético e epigenético), sendo que este último é influenciado ao longo da vida pelo ambiente (20), pela nutrição, pela prática de exercício físico e pelo stress (21).

Os mecanismos epigenéticos mais comuns encontram-se apresentados na **Figura 1.4.** e dividem-se em metilação do DNA, modificações pós-tradução proteica (MPTs) das histonas e regulação transcricional e pós-transcricional por RNAs não codificantes (ncRNAs) (18). Estes mecanismos são responsáveis por remodelar a cromatina, tendo, por conseguinte, um papel fundamental na regulação da expressão génica (19).



**Figura 1.4:** Mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão génica.

(Ac- histona acetilada; Me-histona metilada; miRNA – microRNA; lncRNA – *long non-coding RNA*). Adaptado de: (19).

#### 1.2.6.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil ao carbono 5' da citosina (22). Este mecanismo, que ocorre em ilhas CpG, é responsável pelo silenciamento génico (18). Para além disso, também regula diferentes processos, nomeadamente, *imprinting* genómico, inativação do cromossoma X e eventos transcripcionais (23). A metilação é levada a cabo pelas enzimas DNMTs, que podem ser divididas nas DNMT1, que mantêm o padrão de metilação durante a replicação do DNA, e nas DNMT3A e DNMT3B, responsáveis pela metilação *de novo* nos embriões (23). Este processo regula a expressão génica ao recrutar proteínas envolvidas no silenciamento génico ou bloqueando a ligação de fatores de transcrição ao DNA (22).

A DNMT1 é um repressor que silencia a expressão da  $\gamma$ -globina ao interagir com outros repressores transcripcionais, nomeadamente com o BCL11A (1) e com os fatores TR2 ou TR4 do complexo DRED (*direct repeat erythroid-definitive complex*) (24). Já as metilases *de novo* (DNMT3a e DNMT3b) adicionam grupos metil aos promotores da  $\gamma$ -globina silenciando-os durante a eritropoiese adulta (6).

O perfil de metilação do DNA pode ser alterado como resultado da metilação/demetilação *de novo*, pelo *imprinting* parental (25), por mutações, por fatores ambientais ou por componentes presentes na dieta (22). A remoção da metilação do DNA é realizada por uma família de enzimas conhecidas como *ten-eleven translocation* (TETs) (18).

### 1.2.6.2. Modificações pós-tradução proteica das histonas

Outro mecanismo epigenético, associado à estrutura da cromatina são as modificações das histonas (22). As histonas são proteínas carregadas positivamente que ao associarem-se ao DNA constituem a cromatina (19). A unidade básica estrutural da cromatina designa-se de nucleossoma, sendo constituído por 147 pares de bases (22) associados a duas moléculas de cada histona: H2A, H2B, H3 e H4 (26). Estes octâmeros são separados por um segmento de DNA designado de DNA de ligação que é protegido pela histona H1 (18).

As MPTs das caudas das histonas modulam a cromatina de forma a esta apresentar um de dois tipos de conformação: forma descondensada (eucromatina) associada à transcrição génica e a forma condensada (heterocromatina) associada à repressão génica (19). Estas modificações incluem acetilações e metilações (22).

A acetilação das histonas que consiste na adição de um grupo acetil aos resíduos de lisinas presentes na cauda das histonas é realizado pelas HATs (acetil transferases de histonas) que promovem uma alteração da conformação da cromatina tornando-a mais favorável e acessível à maquinaria transcricional (19). Por outro lado, as HDACs (desacetilases de histonas) são responsáveis pela remoção desta modificação (23) e provocam a compactação da cromatina com conseqüente silenciamento génico (19). Estas enzimas são divididas em quatro subtipos: classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8 – localizadas no núcleo), classe II (IIa: HDACs 4, 5, 7, e 9; IIb: HDACs 6 e 10 – localizadas no núcleo e no citoplasma), classe III composta por sirtuínas e a classe IV constituída pela HDAC11 (27). Estudos prévios mostram que as histonas HDAC1 e HDAC2 inibem a expressão da  $\gamma$ -globina e ativam a expressão da  $\beta$ -globina (6), uma vez que são membros de complexos repressores da  $\gamma$ -globina, como o complexo NuRD (1).

A metilação e desmetilação das histonas é levada a cabo pelas metiltransferases de histonas (HMTs) e demetilases de histonas (HDMs), respetivamente (23). Enquanto a metilação ocorre com a adição de um, dois ou três grupos metil aos resíduos de lisina ou apenas um grupo metil aos resíduos de arginina presentes na cauda das histonas (23), a desmetilação consiste na remoção desses grupos. A metilação das histonas é um processo dinâmico, uma vez que está associada tanto a ativação génica como ao silenciamento génico (6).

### 1.2.6.3. RNAs não codificantes

Apesar de 90% do genoma humano ser transcrito em RNAs, apenas 2% destes são traduzidos em proteínas (23). Os restantes, designados de RNAs não codificantes (ncRNAs), estão envolvidos na regulação génica pós-transcricional (20). Os microRNAs (miRNAs) são uma família de ncRNAs constituídos por 18-25 nucleótidos (19). Estes interatuam com a região 3' dos RNAs mensageiros (mRNAs) afetando a sua tradução e estabilidade (19). Os miRNAs estão envolvidos na proliferação, na diferenciação, no desenvolvimento celular (20), na apoptose, na resposta imunitária, sinalização hormonal (22) e no silenciamento génico (6). Já os RNAs não codificantes longos (lncRNAs) são constituídos por mais de 200 nucleótidos e têm a capacidade de se ligarem ao DNA, RNA e proteínas (19). Em suma, podem estar envolvidos na organização da cromatina, e na regulação transcricional e pós-transcricional (23). A modulação epigenética baseada neste tipo de RNA é por vezes associada ao silenciamento génico (19).

### 1.2.6.4. Outros fatores epigenéticos envolvidos na regulação do gene da $\gamma$ -globina

As lisinas demetilases (LSD) são um grupo de modificadores epigenéticos conhecidos por, em células eritróides adultas, influenciarem o silenciamento da  $\gamma$ -globina ao interagirem com o BCL11A (6). Este silenciamento é mediado pela associação da LSD1 com o BCL11A através do CoREST (6). Adicionalmente, foi observado que a inibição desta enzima reativa a  $\gamma$ -globina em células eritróides humanas (6).

Adicionalmente, foi observado que a atividade do complexo multifatorial designado de DRED contribui para o *switch* entre  $\gamma$ -globina e a  $\beta$ -globina (1). Este complexo, associado ao silenciamento da  $\epsilon$ -globina e da  $\gamma$ -globina, é composto principalmente pelos recetores nucleares TR2 e TR4 que interagem com outras proteínas como *NuRD*, HDMs e DNA metiltransferases (1).

## 1.3. Hemoglobinopatias

Tendo em conta que a Hb tem um papel crucial no organismo, mutações nos genes que codificam esta proteína podem comprometer o equilíbrio entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , dando origem ao aparecimento de um grupo heterogéneo de doenças designadas hemoglobinopatias (1) cujos sintomas começam a manifestar-se por volta do nascimento. Estas doenças, reportadas como as patologias monogénicas mais prevalentes em todo o mundo, podem ser divididas em dois grupos: a) mutações que

alteram a estrutura da hemoglobina levando ao aparecimento de variantes, que conduzem à formação de agregados de proteínas (Ex: anemia falciforme), à alteração do transporte de oxigênio ou à precipitação da Hb, ou b) alterações na síntese dos genes das globinas que levam à perda ou à redução da Hb (Ex: talassemias) (1). Embora a sua prevalência seja mais elevada em países subdesenvolvidos na África-Subsariana, Ásia ou Mediterrâneo, atualmente estas patologias já se encontram distribuídas por todo o globo devido às migrações populacionais (3).

### 1.3.1. Anemia falciforme

A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva (2) caracterizada por uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina (28) que leva à substituição de uma adenina por uma timina no sexto codão deste gene (29). Esta alteração faz com que o ácido glutâmico seja substituído por uma valina, originando uma Hb anormal designada de hemoglobina S (HbS) em vez da hemoglobina adulta normal (HbA) (28). Neste contexto em condições de hipoxia a HbS polimeriza originando eritrócitos em forma de foice caracterizados por serem mais frágeis, rígidos e mais suscetíveis à adesão endotelial (28), conduzindo a manifestações clínicas tais como, dor, hemólise (30), anemia, bloqueio dos vasos sanguíneos (31), aumento do stress oxidativo e inflamação (32).

A severidade desta patologia depende, em grande parte, se o indivíduo recebe os dois alelos mutados (homozigotia) ou um alelo normal e outro mutado (heterozigotia) (3). Para além disso, o ganho simultâneo de outras mutações no gene *HBB* também podem influenciar a severidade desta condição ao melhorar os sintomas destes doentes, como por exemplo, mutações que originem a PHFH (3).

### 1.3.2. Talassémias

As talassémias são um grupo de doenças hereditárias caracterizadas por mutações nos genes das globinas que levam à síntese anormal de pelo menos uma das cadeias das globinas do polipéptido da hemoglobina (2). Deste grupo surgem as  $\alpha$ -talassémias ou as  $\beta$ -talassémias (3). Estas últimas, pertencentes ao grupo das  $\beta$ -hemoglobinopatias, são doenças autossômicas recessivas (3), caracterizadas por mutações no gene da  $\beta$ -globina (33), que têm impacto nas várias etapas da regulação da expressão génica deste gene, nomeadamente, na transcrição, no processamento do RNA e na tradução (34). A ausência ou a síntese inadequada das cadeias da  $\beta$ -globina, resultantes destas mutações, estão associadas com a acumulação e precipitação das cadeias da  $\alpha$ -globina que levam à apoptose dos precursores eritroides, à hemólise dos glóbulos vermelhos

(33) e, conseqüentemente, a uma eritropoiese ineficaz (35). A severidade desta doença é elevada em indivíduos homozigóticos, enquanto que nos portadores os sintomas são ligeiros (34).

#### **1.4. Terapêuticas para as $\beta$ -hemoglobinopatias**

Atualmente a única cura para os casos mais severos das  $\beta$ -hemoglobinopatias (anemia falciforme e  $\beta$ -talassémia) passa pelo transplante de células estaminais da medula óssea, contudo os riscos de segurança associados, a falta de dadores compatíveis (1) e o seu custo elevado limita a sua aplicabilidade (35). Neste contexto, outras estratégias tiveram de ser desenvolvidas ao longo dos anos com o intuito de ultrapassar esta problemática. Neste caso, surgiram as terapias génicas que englobam tecnologias que são capazes de corrigir a mutação responsável pela doença ou que consigam reativar a expressão da HbF em células adultas (34) ao alterar a regulação dos genes das globinas (1).

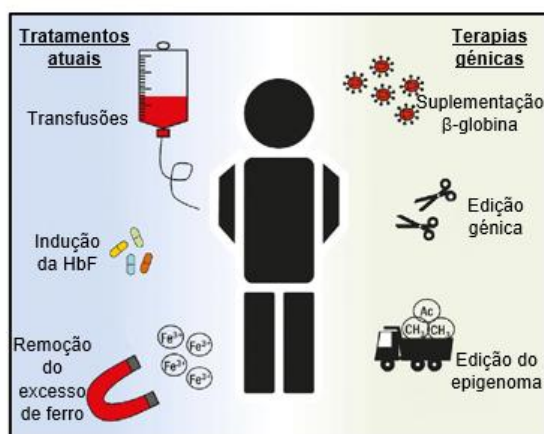
A edição de células do próprio indivíduo *ex vivo* pode ser uma forma de restituir a hematopoiese ao corrigir os defeitos génicos (1). Neste caso surgem os vetores lentivíricos que, ao serem introduzidos nessas células, expressam o gene da  $\beta$ -globina corrigindo assim os fenótipos dos pacientes com  $\beta$ -hemoglobinopatias (1).

Outra alternativa para aumentar os níveis de  $\gamma$ -globina é mimetizar a PHFH (1). Esta é uma síndrome benigna, caracterizada por um espectro de mutações espontâneas que mantêm a expressão da  $\gamma$ -globina em células adultas (34). Quando os alelos com estas mutações são herdados simultaneamente com os alelos responsáveis pelas  $\beta$ -hemoglobinopatias há uma melhoria dos sintomas destes pacientes (34). Um limite de 30% de expressão da HbF foi considerado como “curativo”, uma vez que é capaz de prevenir a polimerização das cadeias  $\alpha$  livres na  $\beta$ -talassémia e a precipitação da HbS na anemia falciforme (34).

As mutações da PHFH podem ser divididas em: deleções que retiram sequências inibitórias ou que direcionam a atividade do LCR para o promotor da  $\gamma$ -globina; mutações pontuais que inibem a ligação de repressores transcrpcionais ou que criem novos locais de ligação no promotor da  $\gamma$ -globina para a ligação de ativadores transcrpcionais (1); ganho de polimorfismos genéticos capazes de modular a expressão da HbF (29).

Apesar de serem ultrapassadas algumas limitações com estas técnicas, como por exemplo já não ser necessário encontrar um dador compatível, estas apresentam outras desvantagens, nomeadamente ao nível da eficiência dos sistema de entrega (29).

Em paralelo com estas terapias, existem atualmente alguns tratamentos que tentam aliviar os sintomas dos indivíduos com hemoglobinopatias (1). Estes passam por transfusões sanguíneas recorrentes, pela remoção do excesso de ferro e pela indução farmacológica da HbF (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5:** Visão global dos tratamentos e terapias para as hemoglobinopatias.

Adaptado de: (1)

A indução farmacológica da HbF tem a capacidade de inibir a polimerização da HbS em indivíduos com anemia falciforme, ou de corrigir o desequilíbrio das cadeias das globina em pacientes com  $\beta$ -talassemia (33). Desde as últimas três décadas que têm sido descobertos inúmeros compostos farmacológicos com capacidade para reativar a  $\gamma$ -globina, contudo são poucos os que passam para os ensaios clínicos (36).

Até à data, apenas três moléculas (hidroxiureia, L-glutamina e *voxelotor*) foram aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da anemia falciforme (37). A L-glutamina é uma molécula que pode proteger os eritrócitos em forma de foice contra o dano oxidativo, enquanto o *voxelotor* é uma pequena molécula que liga-se à cadeia da  $\alpha$ -globina da HbS aumentando a sua afinidade para o oxigénio (28). Por fim a hidroxiureia é um composto citotóxico que apesar de ter a capacidade para aumentar a síntese da  $\gamma$ -globina, induz a apoptose em células eritróides devido à ativação de vias de sinalização que levam ao stress oxidativo, tal como a via p38 MAPK (2). Para além disso, os efeitos secundários demonstrados, a existência de não respondedores (28) e o preço elevado em países subdesenvolvidos faz com que a

procura por novas moléculas mais eficazes, com menos riscos associados e menos dispendiosa, continue.

#### 1.4.1. Reguladores epigenéticos

Como mencionado anteriormente, os mecanismos epigenéticos conduzem a alterações da cromatina que induzem ou reprimem a transcrição génica (1). Embora herdadas, as alterações epigenéticas são reversíveis (23), o que abre portas para o desenvolvimento de fármacos que sejam capazes de reativarem a hemoglobina fetal ao terem potencial para reverter estas alterações (6).

Atualmente há já vários inibidores das DNMTs (iDNMTs) que estão a ser usados na clínica ou sob investigação, nomeadamente, *5-azacytidine* e *decitabine* (23). Estas moléculas reativam a expressão da  $\gamma$ -globina ao hipometilarem a ilha CPG dentro do promotor do gene desta globina (6). Em alguns estudos clínicos com indivíduos com  $\beta$ -talassémia a utilização destes agentes demonstrou ter um efeito indutor da HbF (2). Adicionalmente, o *5-azacytidine* tem também um efeito semelhante à HU ao inibir células progenitoras eritrocitárias (2). Apesar disto, esta molécula apresenta uma vida semi-curta e baixa biodisponibilidade, o que limita a sua utilização (32).

Para além de iDNMTs, surgem os inibidores das HDACs (iHDACs), como é o caso do butirato (28). Estes inibidores ativam a via p38 MAPK com o intuito de aumentar a produção da HbF (2). Em vários estudos com modelos animais, células humanas *in vitro* e pacientes com  $\beta$ -hemoglobinopatias foi mostrado que o butirato estimula a produção da HbF (38).

Os iHDACs aumentam a acetilação das histonas, alterando a conformação da cromatina para uma forma mais relaxada que, conseqüentemente, está mais acessível a fatores que interajam com o DNA (39). Contudo, apesar de se apresentarem como uma potencial terapêutica, a utilização destes inibidores está limitada uma vez que as HDACs participam em múltiplas funções celulares e fisiológicas, fazendo com que a sua inibição acarrete vários efeitos secundários (24).

Apesar de se apresentarem como possíveis abordagens para reverter o silenciamento da  $\gamma$ -globina e induzirem a expressão da HbF, os iDNMTs e os iHDACs (6) têm ainda um longo caminho pela frente no que toca à alta citotoxicidade, à rápida eliminação pelo organismo (21) e à baixa especificidade e eficácia que limitam a sua utilização na clínica (33).

Atualmente, apesar de novas moléculas com potencial indutor de HbF estarem em desenvolvimento e muitas outras já estarem em ensaios pré/clínicos ou clínicos (2), alguns investigadores têm se focado na procura de compostos menos tóxicos (35) em fontes capazes de influenciar modificações epigenéticas, como é o caso dos produtos naturais (27).

## 1.5. Plantas medicinais / Produtos naturais

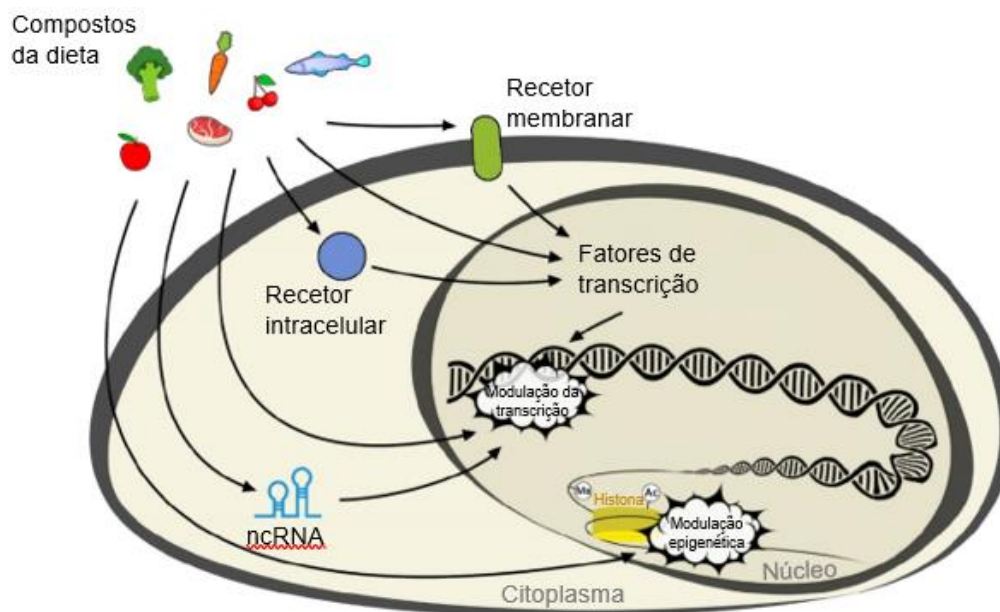
Há pelo menos 60 mil anos que as plantas têm sido utilizadas como medicamentos pelo ser humano para o tratamento de várias patologias (40). De acordo com um relatório da Organização Mundial de Saúde, cerca de 70-95% da população dos países subdesenvolvidos depende dos medicamentos à base de extratos de plantas como fonte principal de cuidados de saúde primários (41). Isto acontece devido ao facto de que os produtos naturais, provenientes de plantas medicinais, apresentam efeitos adversos reduzidos, maior disponibilidade e baixo custo (31).

O termo “planta medicinal” é definido como uma planta que é utilizada como fármaco ou como precursor deste, ou como uma fonte botânica capaz de curar, prevenir ou aliviar uma doença (42).

Ao longo da sua vida, as plantas sintetizam metabolitos secundários que desempenham funções na reprodução (43) e na defesa das mesmas contra patógenos e herbívoros (42). A produção dos diversos compostos químicos com diferentes estruturas, atividades e propriedades farmacológicas faz destes seres vivos um “*hot spot*” para a descoberta de novos fármacos (43).

Quando um produto natural é ingerido, os compostos bioativos presentes influenciam processos metabólicos que podem ser benéficos no tratamento de doenças (42). Neste contexto, estas moléculas exercem uma série de efeitos biológicos nos hospedeiros, tais como, antivíricos, antimicrobianos, antifúngicos, antimaláricos, analgésicos, antiarrítmicos, anti-hipertensivos, psicoativos e anti tumorais (42). Adicionalmente, estas substâncias podem ainda regular a expressão génica (**Figura 1.6**) através de alterações na estrutura da cromatina, alterações epigenéticas (ncRNAs) ou na ativação de fatores de transcrição (22).

O conhecimento das propriedades biológicas dos produtos naturais e a facilidade com que estes são encontrados faz com que se tornem numa linha de investigação atrativa.

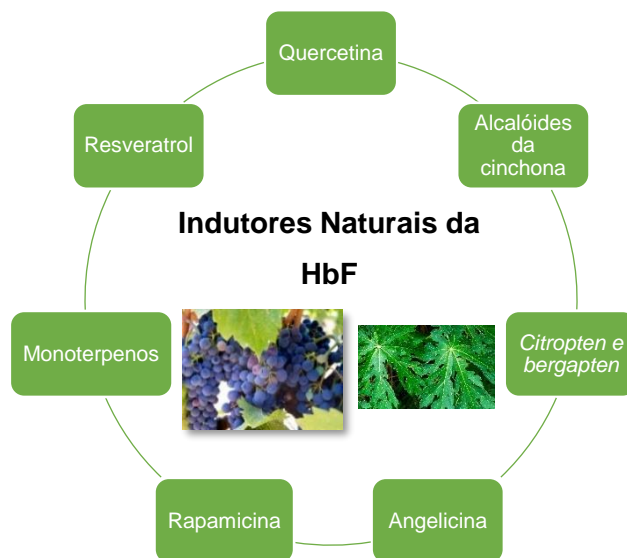


**Figura 1.6:** Mecanismos de regulação da expressão gênica através dos compostos bioativos da dieta.

(Me- grupo metil no DNA metilado; AC- grupo acetil nas histonas acetiladas; ncRNA- RNAs não codificantes). Adaptado de (22).

### 1.5.1. Indutores naturais da HbF

Até à data, os cientistas têm isolado com sucesso vários compostos bioativos provenientes de fontes naturais com baixa toxicidade e com alta eficácia na indução da HbF (2). Estes incluem por exemplo: resveratrol, alcalóides da cinchona, monoterpenos, quercetina, angelicina, rapamicina, *citropten* e *bergapten* (**Figura 1.7**), que atuam ao nível das vias de sinalização JAK/STAT, NO/p38 MAPK, NO/Cgmp e NRF2/ARE (2). Estas moléculas surgem como potenciais indutores na expressão do gene da  $\gamma$ -globina, levando assim ao conseqüente aumento dos níveis de HbF importantes para o tratamento das  $\beta$ -hemoglobinopatias (2).

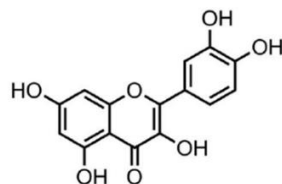


**Figura 1.7:** Indutores Naturais da HbF já reportados.

Adaptado de (2).

#### 1.5.1.1. Quercetina

A Quercetina, (**Figura 1.8**) pertence à família dos flavonoides e à subfamília dos flavonóis (44). Este composto apresenta propriedades benéficas para a saúde humana, tais como, antivíricas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas (44), anti cancerígenas e antialérgicas (45).



Quercetina

**Figura 1.8:** Estrutura química da quercetina.

Adaptado de (23).

A Quercetina encontra-se presente em frutas e vegetais especialmente em papaias (46), cebolas, maçãs, uvas, e chás, tendo uma ingestão diária conforme a dieta do indivíduo (45). Estes valores, por exemplo, podem chegar às 200-500 mg por dia em indivíduos que consomem grandes quantidades de vegetais ou fruta ricos nesta substância (45).

Esta molécula tem ganho cada vez mais atenção por parte dos investigadores devido ao seu potencial antioxidante e anticancerígeno (46). Este último efeito ocorre através da modulação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ $\beta$ -catenin e MAPK/ERK1/2

(47). Para além disso, este composto, com propriedades antioxidantes comprovadas, pode induzir a expressão do gene da  $\gamma$ -globina ao sinalizar a via NRF2/ARE protegendo as células do stress oxidativo (35).

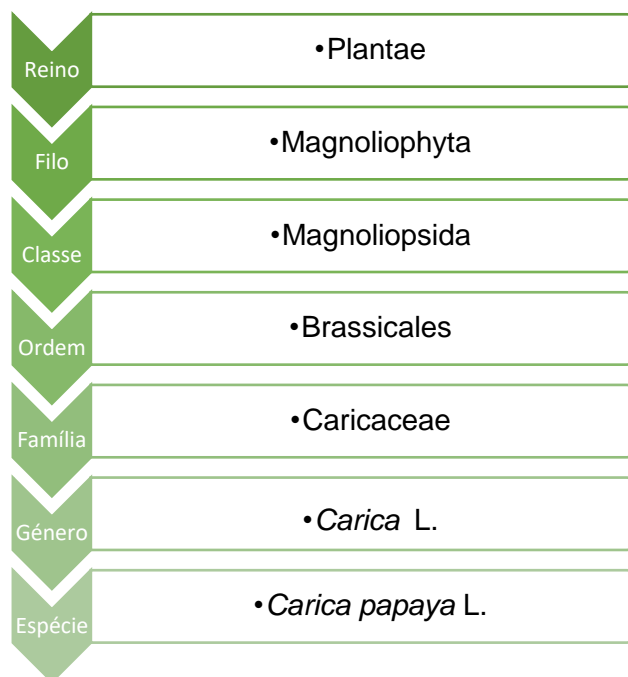
De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa no Cancro (AIPC), a quercetina não está na lista dos compostos carcinogénicos para os humanos (44). Mais ainda, estudos reportam que a administração de quercetina numa dose superior a 1000 mg/dia não apresenta efeitos secundários nas funções hepáticas, hematológicas, parâmetros sanguíneos ou renais e nos níveis de eletrólitos no plasma (44). Apesar disto, não se pode descartar a toxicidade, uma vez que faltam dados sobre o uso de doses mais elevadas deste composto a longo prazo (44).

Embora a quercetina apresente inúmeras propriedades farmacológicas vários estudos reportam a sua baixa biodisponibilidade quando ingerida numa única dose (48). Adicionalmente, a sua fraca solubilidade em água e a sua baixa absorção (49), juntamente com a sua instabilidade química e ao facto de ser metabolizada muito rapidamente, fazem com que a aplicação deste composto em estudos clínicos seja bastante limitada (44).

Apesar dos flavonoides apresentarem efeitos benéficos para a saúde humana ao modularem o epigenoma, não se sabe até que ponto estes possam ter efeitos prejudiciais, uma vez que as exposições a longo termo de dietas ricas nestes compostos podem induzir efeitos secundários devido à falta de especificidade destes compostos sobre as várias enzimas responsáveis pela modulação epigenética (HATs e HDACs) (21). Por outro lado, ainda pouco se conhece sobre a sua disponibilidade no organismo, metabolismo e bioatividade (21), o que dificulta a sua utilização na clínica. Neste contexto, são precisos mais estudos de forma a avaliar os efeitos secundários e a utilização segura destes compostos para que possam ficar disponíveis para uma possível terapia (19).

### 1.5.2. *Carica papaya* L.

A espécie *Carica papaya* L (*C. papaya* L.), popularmente conhecida como papaia, *pawpaw* ou mamão, pertence à família Caricaceae e ao género *Carica* L., estando a sua taxonomia descrita na **Figura 1.9**.



**Figura 1.9:** Taxonomia da *C. papaya* L.

Adaptado de: (50)

Esta árvore, caracterizada por ter um único tronco e por ter folhas e frutos grandes, pode chegar aos 20 metros em altura (31). As folhas e os frutos desta planta são usados diariamente para vários propósitos, tais como, alimentos, medicamentos, pesticidas e cosméticos (51).

A produção de *C. papaya* L. encontra-se distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais (52) tendo vindo a crescer ao longo dos anos. Em 2020 a produção mundial de papaia atingiu cerca de 13.9 milhões de toneladas em que 50.7% foi produzido na Ásia (principalmente na Índia), 36.4% nas Américas e 12.8% em África (53).

Para além de conter nutrientes tais como vitaminas A, B e C, cálcio e ferro (31), esta planta é também constituída por compostos químicos, que são responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes e que são encontrados nas suas sementes, folhas e frutos (54). Para além disso, o facto de apresentarem propriedades anti-hipertensivas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias, anti tumorais, diuréticas e anti-falciformação (52) fazem com que esta planta possa ser usada no tratamento de várias doenças.

#### 1.5.2.1. Folhas da *C. papaya* L.

As folhas da papaia apresentam propriedades antibacterianas, antioxidantes, antivíricas, anti tumorais (51) e anti-inflamatórias (55). Estas são compostas por vários fitoquímicos, nomeadamente flavonoides, como é exemplo a quercetina (51).

Recentemente várias pesquisas têm-se focado na utilização terapêutica das folhas da papaia e, como tal, vários métodos de extração têm vindo a ser explorados (31). A maceração é o método mais comum, uma vez que é mais simples e menos dispendioso quando comparado a outros métodos (51). Este processo também pode incorporar solventes como água, metanol ou etanol que estão entre os mais utilizados para a preparação de extratos a partir das folhas desta planta (31).

Estes extratos, ricos em vitaminas, minerais e fitoquímicos (31), têm sido utilizados ao longo dos séculos na medicina tradicional no tratamento da febre causada por doenças infecciosas, como dengue ou malária (51).

Na Nigéria, comunidades locais reportaram a utilização de folhas secas de *C. papaya* no tratamento da anemia falciforme (56). Mais ainda, estudos *in vitro* com extratos metanólicos de folhas de *C. papaya* mostraram que estes extratos protegem a integridade da membrana dos eritrócitos e reduzem a hemólise em condições de stress osmótico (56). Adicionalmente, o tratamento de células SS com extratos de folhas desta planta inibe a formação de células falciformes em condições de hipoxia severa (56).

Devido ao seu poder antioxidante, esta planta pode ser incorporada em suplementos alimentares ou medicamentos de forma a ajudar no controlo de certas condições de saúde relacionadas com o stress oxidativo (54). Contudo, para uso humano é imprescindível fazer uma avaliação de segurança que inclui as várias formulações do produto e a composição fitoquímica do mesmo (57).



## Capítulo 2 - Objetivos

---

### 2.1. Geral:

Avaliar os efeitos *in vitro* do extrato metanólico de folhas de *Carica papaya* L. e da Quercetina na reativação transcricional da  $\gamma$ -globina e na indução da hemoglobina fetal (HbF).

### 2.2. Específicos:

- a) Avaliar a proliferação e a viabilidade das células K562 expostas às diversas concentrações do extrato metanólico de folhas de *C. papaya* L. e da Quercetina.
- b) Avaliar os efeitos das diversas concentrações do extrato metanólico de folhas de *C. papaya* L. e da Quercetina no padrão de expressão de genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), de genes reguladores/silenciadores da  $\gamma$ -globina (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*) e de moduladores epigenéticos da mesma (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*) em células K562 por PCR quantitativo em tempo real.
- c) Avaliar os efeitos da hidroxiureia (HU) no padrão de expressão de genes das globinas, de genes reguladores/silenciadores da  $\gamma$ -globina e de moduladores epigenéticos da mesma globina em células K562, por PCR quantitativo em tempo real.



## Capítulo 3 - Material e Métodos

---

### 3.1 Colheita e preparação do material vegetal

As folhas de *C.papaya* L. foram colhidas num jardim doméstico em Faro, Algarve, Portugal, gentilmente cedidas pelo Sr. Fernando Nunes. Após a colheita, estas foram deixadas a secar à temperatura ambiente (Ta) até obterem uma variação de massa constante. Antes do processo de extração, o material vegetal seco foi reduzido a pó com recurso a um almofariz e a um pilão.

### 3.2 Extração

Cerca de 30 gramas de folhas secas de *C.papaya* L. foram extraídas com metanol (cerca de 550 mL) a Ta durante dois dias. Para este procedimento foi utilizada uma placa de agitação que, juntamente com um magneto, permitiu fazer uma extração completa. O extrato metanólico de folhas de *C.papaya* L. (EMFCP) foi filtrado utilizando um funil de *Buchner* e posteriormente concentrado num evaporador rotativo (Rotavapor R-200 BUCHI, Zurique, Suíça). A evaporação foi realizada a 40°C sob pressão reduzida até obter-se uma massa viscosa. Após este processo, o EMFCP foi guardado no frigorífico a 4° C até à preparação da solução *stock*.

### 3.3 Cultura de células

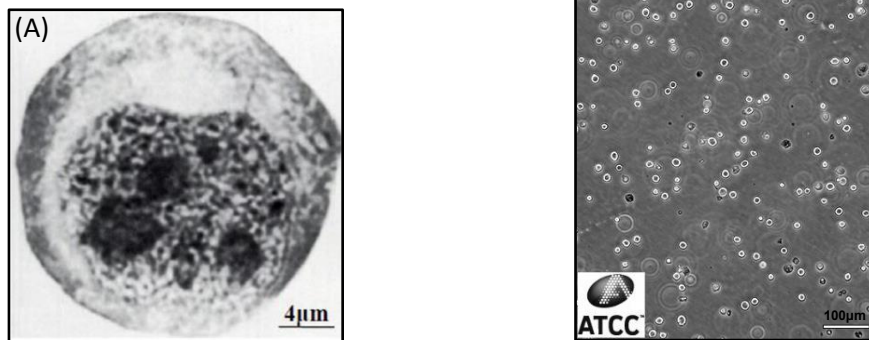
A cultura de células é, hoje em dia, a base de inúmeras descobertas científicas (58). Esta técnica, concebida com o objetivo de estudar o comportamento de células animais *in vitro* (59), permite a expansão e divisão destas em cópias idênticas (58).

Para que se consiga induzir o crescimento das células em meio artificial, é preciso obedecer a um conjunto de condições estabelecidas, complementadas com um meio de cultura suplementado com nutrientes e fatores de crescimento (60). Quando o crescimento das células atinge ~80% do espaço disponível do recipiente de cultura, diz-se que se atingiu o estado de confluência (61). Ao alcançarem esta condição e para continuarem a crescer, as células têm de ser transferidas para um novo recipiente num processo designado de “passagem” (61).

### 3.3.1 Linha celular K562

A linha celular contínua K562, caracterizada por *Lozzio & Lozzio* em 1975 (62), foi isolada de uma paciente de 53 anos com leucemia mieloide crônica (LMC) (63). Estas células exibem uma forma arredondada com cerca de 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro (64) contendo um citoplasma basófilo, sem grânulos e dois ou mais nucléolos proeminentes (64) (**Figura 3.1- A**).

As células K562 crescem em suspensão (**Figura 3.1- B**) e são cultivadas em ambiente húmido (5% (v/v) de  $\text{CO}_2$ ) em frascos próprios contendo meio de cultura (RPMI), suplementado com 10% de soro de bovino fetal e antibiótico (62). Para além disso, têm a capacidade de se diferenciarem em células das linhas megacariocítica (plaquetas), granulocítica/monocítica ou eritróide (glóbulos vermelhos), quando são expostas a diferentes agentes químicos (63).



**Figura 3.1:** (A) Morfologia da célula K562. Adaptado de (64). (B) Células K562 em suspensão com baixa densidade. Adaptado de (65).

A linha celular K562 exibe níveis baixos de hemoglobina (Hb), no entanto quando exposta a compostos indutores da eritropoiese, diferencia-se em células progenitoras eritroides que expressam globina embrionária e fetal (5). A utilização destes compostos, tais como *5-azacytidine* e butirato, na indução da eritropoiese faz aumentar a expressão da hemoglobina fetal (HbF) em células adultas sanguíneas (5). Adicionalmente, esta linha celular tem sido amplamente utilizada tanto como modelo para estudar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação dos genes da globina fetal e embrionária, tanto como para determinar o potencial terapêutico de novos compostos na indução da HbF (62).

### 3.3.2 Descongelamento e Passagem de células em suspensão

A linha celular K562 (Nº ECACC: 89121407) foi comprada na coleção europeia de culturas celulares (ECACC, Reino Unido).

Numa câmara de fluxo laminar (**Figura 3.2- A**) sob condições estéreis e seguindo as boas práticas para uma cultura celular bem-sucedida, descritas em (66), as células foram descongeladas de acordo com o protocolo descrito em anexo (**Anexo 1**).

Posteriormente à descongelamento celular realizou-se o protocolo de passagem de células em suspensão descrito em anexo (**Anexo 2**).

Para ambos os protocolos, o meio de cultura RPMI 1640 (Catalog Number: L0495-500, Biowest) contendo L-Glutamina e 25 mM Hepes (**Figura 3.2- B**) foi suplementado com 10% (v/v) de soro de bovino fetal (FBS) (Product Number: F0926, Sigma-Aldrich) e com 500 µL de antibiótico (200 mM L-Glutamina, 10000 U penicilina e 10 mg/mL de streptomina) (Product Number: G6784, Sigma-Aldrich). Já para o protocolo de passagem celular, foram realizadas lavagens com tampão fosfato salino (PBS) (Catalog Number: 51226, Lonza) e o *pellet* celular foi resuspenso em meio novo.



**Figura 3.2:** (A) Câmara de fluxo laminar (Foto tirada durante o projeto). (B) Meio RPMI (biowest).

As células K562 foram estabilizadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL, realizando-se subculturas a cada três dias, durante os quais foram mantidas num ambiente húmido a 37°C e com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Antes de cada subcultura as células foram visualizadas num microscópio invertido com contraste de fase e parâmetros como confluência, morfologia, proliferação e viabilidade foram analisados.

As células K562 entre as passagens 13 a 18 foram utilizadas nas experiências com os diversos tratamentos.

### 3.4 Tratamentos

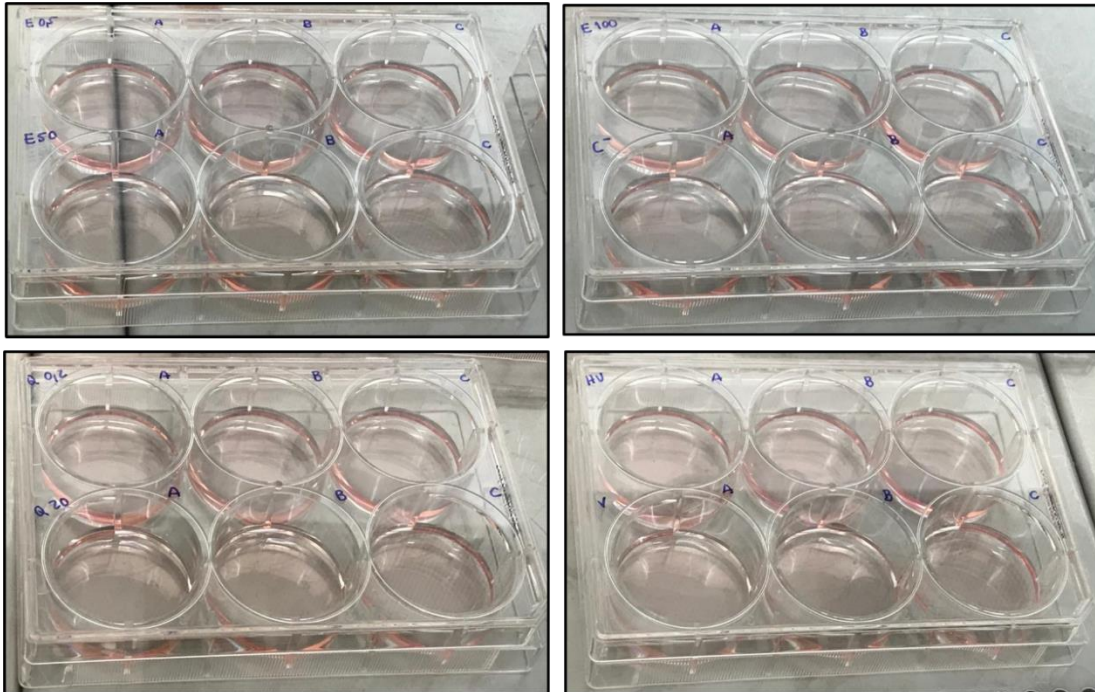
Numa fase inicial deste estudo foi preparada uma solução *stock* de EMFCP com concentração final de 40 mg/mL dissolvendo o extrato vegetal em PBS. Após este procedimento, foram efetuados cálculos para obter as soluções para exposição celular com concentrações finais de 0,5; 50; 100 e 500 µg/mL de EMFCP a partir da solução *stock* previamente preparada. Para a concentração de EMFCP de 0,5 µg/mL fez-se uma diluição seriada a partir da concentração de EMFCP de 500 µg/mL.

Com o intuito de avaliar eventuais contaminações do EMFCP no meio de cultura, começou-se por, numa placa de seis poços (3 mL/poço), expor células K562 a 500 µg/mL deste composto. Após 120h, a placa foi visualizada ao microscópio ótico e analisada quanto à presença de contaminações e quanto à proliferação e viabilidade celular.

A Quercetina (CAS Number: 117-39-5, Sigma-Aldrich) foi comprada em formato de pó amarelo de 10 g. Esta foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (Catalog Number: 23486.297, VWR chemicals), pois apresenta maior solubilidade neste composto do que em PBS (67). A solução *stock*, previamente dissolvida em DMSO, foi diluída em meio RPMI (1:1000) para formar as soluções de trabalho. O volume da solução de trabalho a utilizar para obter-se as soluções para exposição celular com concentrações finais de 0,2 e 20 µM de Quercetina foi calculado com recurso à fórmula  $M_i * V_i = M_f * V_f$ .

Para continuação do estudo, e já com os dados da experiência anterior analisados, as células K562 foram expostas às restantes concentrações do EMFCP (0,5; 50 e 100 µg/mL) e à Quercetina. Para além destes tratamentos, as células K562 foram expostas a 25 µg/mL de hidroxureia (HU) (HYDREA®, USP), utilizado como controlo positivo, uma vez que este composto é um conhecido indutor da HbF (1). Foi ainda utilizado um controlo negativo (C<sup>-</sup>) onde as células proliferaram no meio de cultura padrão e uma solução veículo onde suplementou-se o meio de cultura com DMSO.

Deste modo, as células K562 a uma densidade de  $1 * 10^5$  células/mL foram cultivadas em placas de seis poços (3 mL/poço), onde foram realizadas três réplicas biológicas por cada tratamento (**Figura 3.3**). Estas placas foram posteriormente incubadas num ambiente húmido a 37°C com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após este período as células, expostas aos tratamentos, foram colhidas para análise da proliferação e viabilidade celular e para análise transcricional.

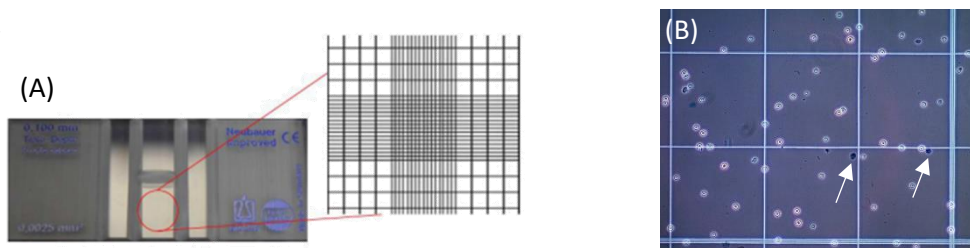


**Figura 3.3:** Tratamentos em placas de seis poços.  
(Fotos tiradas durante o projeto).

### 3.5 Análise da proliferação e da viabilidade celular

Após 24h de exposição aos diversos compostos, as células K562 foram submetidas ao ensaio de exclusão do azul de tripano. Este é realizado segundo o protocolo em anexo **(Anexo 3)** com recurso a uma câmara de Neubauer **(Figura 3.4- A)** à qual foi adicionada, por capilaridade, uma solução de suspensão celular com 0,4% de azul de tripano (CAS Number: 72-57-1, Sigma-Aldrich). Este corante é retido pelas células mortas uma vez que estas, devido à falta de integridade da membrana celular, são permeáveis ao corante apresentando uma coloração azulada **(Figura 3.4- B )** (60).

Utilizando um microscópio invertido com contraste de fase e com recurso à ampliação de 20x, foi possível calcular, através da contagem celular, a taxa de proliferação e a percentagem de viabilidade das células recorrendo às fórmulas apresentadas no protocolo anteriormente mencionado.



**Figura 3.4:** (A) Zoom in de uma câmara de Neubauer e respetiva grelha de contagem. Adaptado de: (68). (B) Visualização das células numa câmara de Neubauer. As setas indicam células mortas. Adaptado de: (69).

### 3.6 Extração de RNA e síntese de DNA Complementar (cDNA)

As células K562 recolhidas pós-tratamento e guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram posteriormente utilizadas para a extração do RNA total do *pellet* celular. A extração foi realizada utilizando o kit “*miRNeasy Mini Kit*” da Quiagen, estando o respetivo protocolo em anexo (Anexo 4).

A quantificação do RNA total das células K562 foi realizada no equipamento NanoDrop-ONE da Thermo Scientific. Este equipamento permite quantificar o RNA e avaliar a sua pureza, utilizando apenas  $1\ \mu\text{L}$  de amostra. As medições efetuadas permitiram conhecer o valor da absorvância a  $260\ \text{nm}$  ( $A_{260}$ ) com o qual foi possível conhecer a concentração do RNA e a absorvância a  $280\ \text{nm}$  ( $A_{280}$ ) e  $230\ \text{nm}$  ( $A_{230}$ ) que são indicadores de possíveis contaminações. Através da razão  $A_{260}/A_{280}$  conseguiu-se avaliar a pureza do RNA. O ideal é obter valores próximos de 2,0, já que valores inferiores ou superiores são indicativos de contaminações. A concentração de RNA, expressa em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , presente em cada amostra encontra-se exposto no **Apêndice I**.

Para a síntese de cDNA retirou-se de cada amostra  $2,0\ \mu\text{g}$  de RNA total. Esta reação foi efetuada utilizando os reagentes “*SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System*” (Catalog Number: 18091050, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.), com *primers* de hexâmeros aleatórios, num volume final de  $20\ \mu\text{L}$ , seguindo as instruções do fabricante. A preparação desta reação juntamente com os volumes dos reagentes a serem utilizados estão descritos no **Apêndice II**.

### **3.7 Amplificação de cDNA por PCR quantitativo em tempo real**

O PCR quantitativo em tempo real foi realizado no equipamento *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad)*, com uso do kit *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)* e dos *primers* específicos para cada gene listados na **Tabela 1**.

Para cada réplica biológica foram feitos triplicados.

O princípio desta técnica e o seu procedimento encontram-se expostos no **Apêndice III**.

**Tabela 3.1.** Sequências dos *primers* e temperaturas de *melting* específicas, que se utilizou na reação de PCR quantitativo em tempo real.

Gene		Sequência do <i>primer</i> (5'→3')		Tamanho do amplicão (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
Referência	GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGTA	295	54,7
		Reverse	GCAGAGATGATGACCCTTTTG		53,7
Globinas	$\alpha$ -globin	Forward	TCCCCACCACCAAGACCTAC	63	64,0
		Reverse	CCTTAACCTGGGCAGAGCC		62,0
	$\beta$ -globin	Forward	GCACGTGGATCCTGAGAACT	117	62,0
		Reverse	GCCACCACCTTTCTGATAGGC		62,0
	$\gamma$ -globin	Forward	TGGATGATCTCAAGGGCAC	258	58,0
		Reverse	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTTGA		47,2
	$\delta$ -globin2	Forward	GATGCCATAAAGCACCTGGATG	274	49,7
		Reverse	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTTGA		47,2
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

<b>Moduladores epigenéticos</b>	<i>DNMT1</i>	<i>Forward</i>	CCTCCAAAAACCCAGCCAAC	101	56,9
		<i>Reverse</i>	TCCAGGACCCTGGGGATTTC		59,0
	<i>DNMT3A</i>	<i>Forward</i>	CCAACATCGAATCCATGAAA	140	50,7
		<i>Reverse</i>	CTTGCGCTTGCTGATGTAGT		55,7
	<i>DNMT3B</i>	<i>Forward</i>	CGAATTTTACCACCTGCTGAATT	59	53,9
		<i>Reverse</i>	AGAACGGCCGGTCATCAC		57,8
	<i>HDAC1</i>	<i>Forward</i>	GGAAATCTATCGCCCTCACA	168	54,3
		<i>Reverse</i>	AACAGGCCATCGAATACTGG		54,8
	<i>HDAC2</i>	<i>Forward</i>	CTGTTAATTGGGCTGGAGGA	94	54,6
		<i>Reverse</i>	AATTCAAGGATGGCAAGCAC		53,9
	<i>HDAC3</i>	<i>Forward</i>	GGACCAGATCCTCCAGACAA	116	56,1
		<i>Reverse</i>	CAGCCTCATCAGTCCTGTCA		56,5
	<i>HDAC8</i>	<i>Forward</i>	TTCCAGAGCTGAGGAGTGGT	165	55,9
		<i>Reverse</i>	ACTTGATGCCCTTGAAAT		58,2

Neste estudo pretendeu-se comparar a expressão génica entre amostras. Desta forma os dados obtidos pelo *software CFX Manager* ( $C_{qs}$ ) foram analisados através da quantificação relativa, que, como descrito em anexo, permite calcular a diferença relativa entre a expressão do gene de referência e a expressão do gene de interesse (70). Para esta análise utilizou-se o gene *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) que permite a normalização de qualquer variabilidade existente entre as reações de PCR (71). Como tal, a análise foi realizada pela normalização dos valores de  $C_q$  do gene de interesse com os valores de  $C_q$  do gene *GAPDH*. Os níveis dos transcritos foram expressos em percentagem relativa e o cálculo da diferença relativa entre as expressões génicas foi realizado através do método  $\Delta\Delta C_q$ .

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

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

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q(\text{amostra})} - \Delta C_{q(\text{referência})}$$

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

\*No tratamento com as duas concentrações de Quercetina a solução veículo (DMSO) foi utilizada como calibrador e, nos restantes tratamentos o calibrador foi o  $C^+$  (células não tratadas).

Como dito anteriormente, cada reação foi realizada em triplicado com o objetivo de aumentar o poder estatístico do valor de  $C_q$  obtido para cada amostra (72).

Os valores obtidos dos três replicados por réplica biológica foram analisados quanto à média e ao desvio padrão.

### 3.8 Análise Estatística

O tratamento dos dados obtidos referentes ao nível de expressão génica nas células K562 foi realizado com recurso ao software Microsoft Excel 365.

As diferenças significativas entre tratamentos e entre concentrações do mesmo tratamento foram avaliadas recorrendo ao teste t, estipulando valores de *p-value* <0,05 como estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Todos os gráficos foram criados utilizando o software Microsoft Excel 365.

### **3.9 Considerações ético-legais**

O presente estudo está incluído num projeto financiado pelo Instituto Politécnico de Lisboa e parcialmente suportado pela FCT/MCTES (UIDB/05608/2020 e UIDP/05608/2020) designado de “*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 e previamente aceite pela Comissão de Ética da Escola Superior da Saúde de Lisboa (ESTeSL). Ainda assim este estudo foi submetido ao Conselho de Ética da ESTeSL, obtendo-se aprovação (CE-ESTeSL-Nº27-2021) para iniciar as tarefas que foram desenvolvidas no *Health & Technology Research Center (H&TRC)*, localizado na ESTeSL.



## Capítulo 4 - Resultados

---

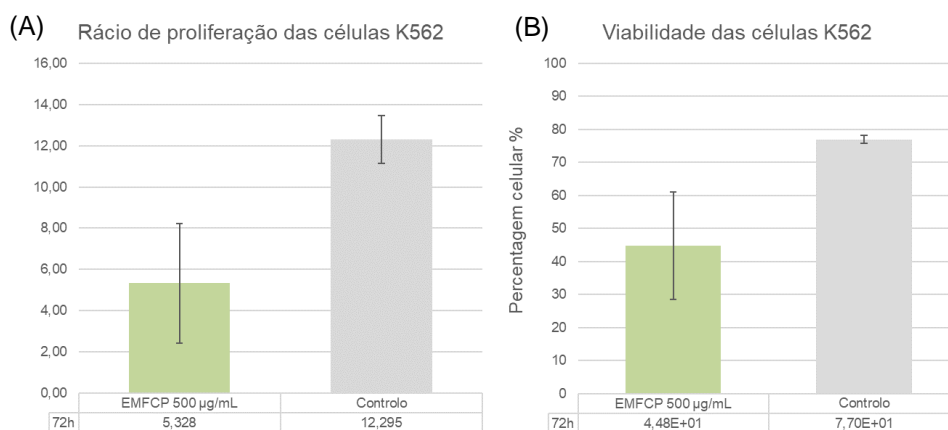
As  $\beta$ -hemoglobinopatias começam a manifestar-se após o nascimento, altura em que ocorre a troca da hemoglobina fetal (HbF) pela hemoglobina adulta (4). Desde a descoberta que a HbF alivia os sintomas dos pacientes que se tenta encontrar soluções para reverter o *switch* entre as duas hemoglobinas. Nesta troca, amplamente estudada pelo comunidade científica, estão envolvidos vários mecanismos genéticos e epigenéticos que regulam a ativação ou a inibição do gene da  $\gamma$ -globina (73). Entre estes, encontram-se os genes: *HBA*, *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *MYB*, *KLF1*, *BCL11A*, *BGLT3*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*.

Neste estudo pretendeu-se avaliar 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 originam a HbF. Para tal, analisou-se os padrões de expressão de genes envolvidos neste processo, como é o caso dos genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), dos genes reguladores/silenciadores da  $\gamma$ -globina (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*) e dos moduladores epigenéticos da mesma globina (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*).

A avaliação dos efeitos destes dois compostos foi investigada em células K562.

### 4.1 Proliferação e viabilidade celular

Numa fase inicial deste estudo, começou-se por expor as células K562 à concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  do EMFCP, durante 72h. Os resultados obtidos (**Figura 4.1**), mostram que a exposição a esta concentração apresenta uma taxa de proliferação de  $5,328 \pm 2,898$ , enquanto para o controlo (células não tratadas) o valor é de  $12,295 \pm 1,159$ . Por outro lado, também se observaram efeitos na viabilidade celular ao apresentar menos de 50% de células viáveis ( $44,8\% \pm 16,2\%$ ). Adicionalmente, não se observaram diferenças significativas entre o EMFCP a 500  $\mu\text{g/mL}$  e o controlo negativo em ambos os parâmetros. Os resultados da proliferação e da viabilidade celular fizeram com que esta concentração do EMFCP fosse excluída dos ensaios transcricionais, uma vez que apresentou evidências de citotoxicidade.



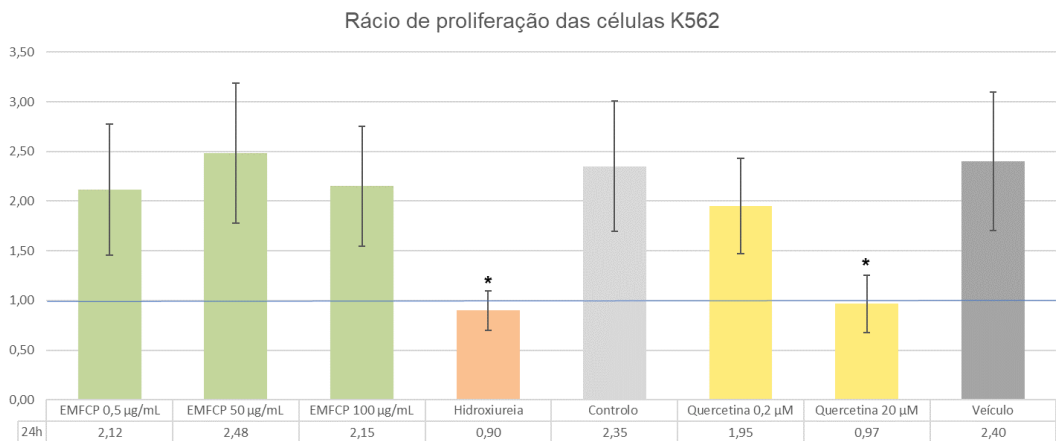
**Figura 4.1:** Efeitos do EMFCP na proliferação (A) e na viabilidade (B) das células K562.

Proliferação e viabilidade celular após 72 horas de exposição ao controlo (meio de cultura) e ao EMFCP com concentração final de 500 µg/mL. A taxa de proliferação é calculada como o rácio entre o número de células viáveis após o ensaio e o número de células inicialmente colocado ( $6,1 \cdot 10^3$ ). A viabilidade celular é calculada ao dividir o número de células viáveis pelo número total de células e multiplicar por 100.

Seguidamente, as células K562 a  $1 \cdot 10^5$  células/mL foram expostas, 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). Neste estudo, a hidroxureia (HU) a 25 µg/mL foi utilizada como agente indutor de expressão de HbF (controlo positivo). Após o tempo de exposição determinado foram analisadas a proliferação e viabilidade celular. Os resultados presentes na **Figura 4.2** mostram que os rácios de proliferação para as concentrações de EMFCP de 0,5; 50 e 100 µg/mL foram de 2,12; 2,48 e 2,15, respetivamente. Já 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 foi observado na concentração do EMFCP a 50 µg/mL.

O tratamento com HU ( $p=0,021$ ) e com Quercetina a 20 µM ( $p=0,031$ ), apresentou efeitos significativos, no que se refere à diminuição da proliferação celular, em relação ao controlo negativo e à solução veículo, respetivamente.

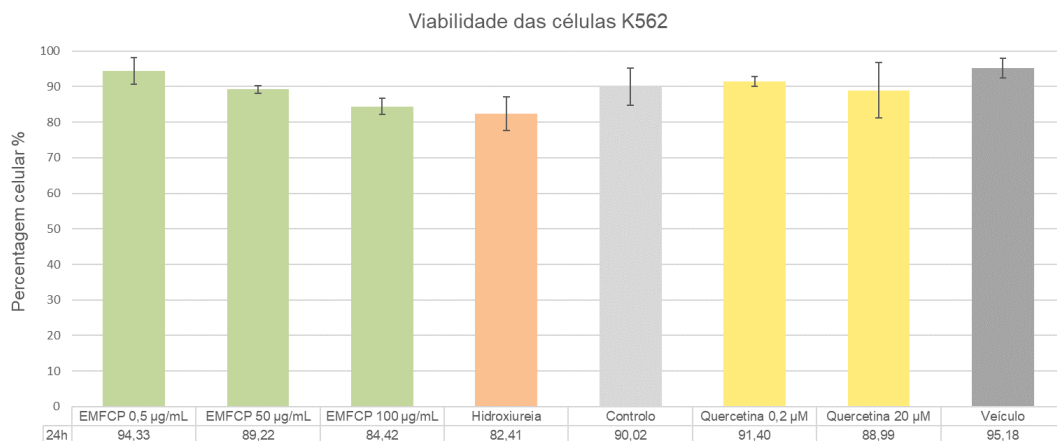
Por outro lado, não se observaram diferenças significativas na proliferação celular associada ao aumento da dose quer para a exposição com EMFCP quer para a exposição com Quercetina.



**Figura 4.2:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina na proliferação de células K562.

Proliferação das células K562 após 24 horas de exposição ao controlo (meio de cultura), veículo (meio de cultura suplementado com DMSO), 25 µg/mL de HU (controlo positivo), EMFCP com concentração final de 0,5 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL, e Quercetina com concentração final de 0,2 µM e 20 µM. A taxa de proliferação é calculada como o rácio entre o número de células viáveis após o ensaio e o número de células inicialmente colocado ( $1 \cdot 10^5$  células/mL). As diferenças significativas em relação ao controlo são avaliadas pelo teste t e estão apresentadas como \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Os potenciais efeitos citotóxicos do EMFCP e da Quercetina, foram avaliados em células K562 recorrendo ao ensaio de exclusão por azul de tripano apresentados na **Figura 4.3**. A análise dos dados demonstrou que não existem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na viabilidade celular entre as várias doses do mesmo tratamento. Para além disso, também não existem diferenças significativas entre o EMFCP e o controlo negativo, nem entre a Quercetina e o veículo. A solução veículo apresenta a maior taxa de viabilidade celular com  $95,18\% \pm 2,76\%$ . Esta última, demonstra não afetar a viabilidade celular durante o estudo. Por outro lado, a viabilidade das células K562 diminui quando sujeitas ao tratamento com HU ( $82,41\% \pm 4,69\%$ ).



**Figura 4.3:** Efeito do EMFPCP e da Quercetina na viabilidade das células K562.

Viabilidade celular após 24 horas de exposição ao controlo (meio de cultura), veículo (meio de cultura suplementado com DMSO), 25 µg/mL de HU (controlo positivo), EMFPCP com concentração final de 0,5 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL, e Quercetina com concentração final de 0,2 µM e 20 µM. A viabilidade celular é calculada ao dividir o número de células viáveis pelo número total de células e multiplicar por 100.

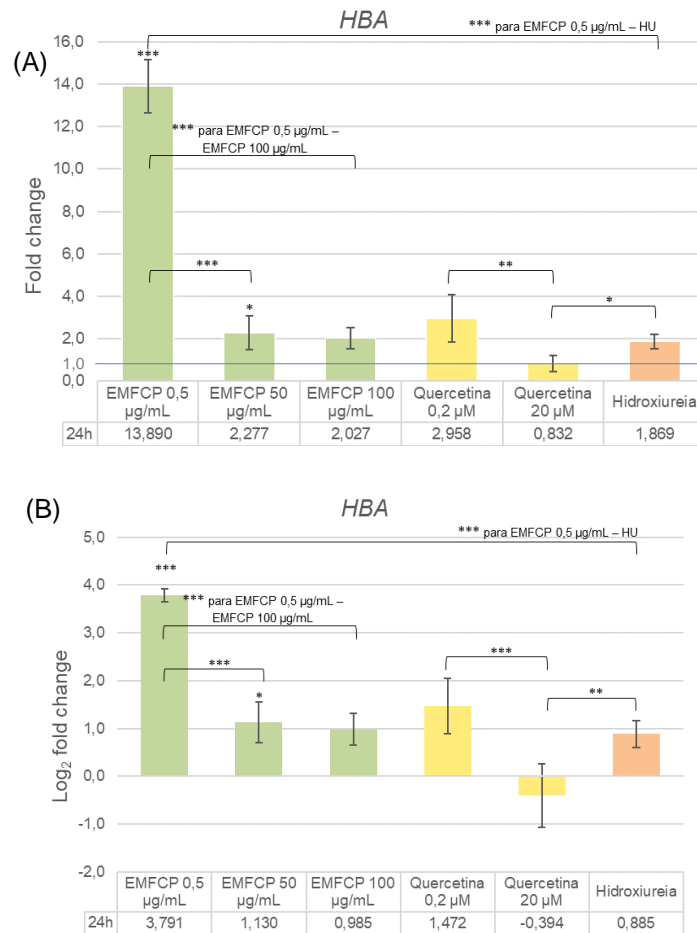
## 4.2 Análise do perfil de expressão de genes das globinas

### 4.2.1 Gene *HBA*

Após análise dos resultados (**Figura 4.4- A**) verifica-se que houve um aumento da expressão do gene da  $\alpha$ -globina na maioria das células, com exceção das expostas à Quercetina a 20 µM que diminuiu a expressão deste gene aproximadamente 1,2 vezes.

A expressão relativa do gene *HBA* encontra-se apresentada na **Figura 4.4- B**. Os dados apresentados demonstram que todas as concentrações do EMFPCP induzem aumento da expressão do gene *HBA*, sendo este aumento significativo para o EMFPCP a 0,5 µg/mL com  $p < 0,0001$  e a 50 µg/mL com  $p = 0,040$ . O maior aumento transcricional observa-se nas células expostas ao EMFPCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFPCP 0,5 µg/mL) =  $3,791 \pm 0,135$ ), sendo superior ao valor obtido para o controlo positivo ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $0,885 \pm 0,275$ ). Para além disso, observam-se diferenças significativas ao nível de expressão do gene *HBA* entre diferentes concentrações do EMFPCP, sendo as mais significativas as verificadas entre o EMFPCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFPCP 0,5 µg/mL) =  $3,791 \pm 0,135$ ) e o EMFPCP a 50 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFPCP 50 µg/mL) =  $1,130 \pm 0,420$ ) com  $p < 0,001$ , entre o EMFPCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFPCP 0,5 µg/mL) =  $3,791 \pm 0,135$ ) e o EMFPCP a 100 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFPCP 100 µg/mL) =  $0,985 \pm 0,337$ ) com EMFPCP com  $p < 0,001$ , entre as duas concentrações de Quercetina ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (Q 0,2 µM) =  $1,472$

$\pm 0,584$ ) e ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 } \mu\text{M)} = -0,394 \pm 0,661$ ) com  $p < 0,001$  e entre o EMFCP a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 } \mu\text{g/mL)} = 3,791 \pm 0,135$ ) e a Hidroxiureia ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,885 \pm 0,275$ ) com  $p < 0,001$ .



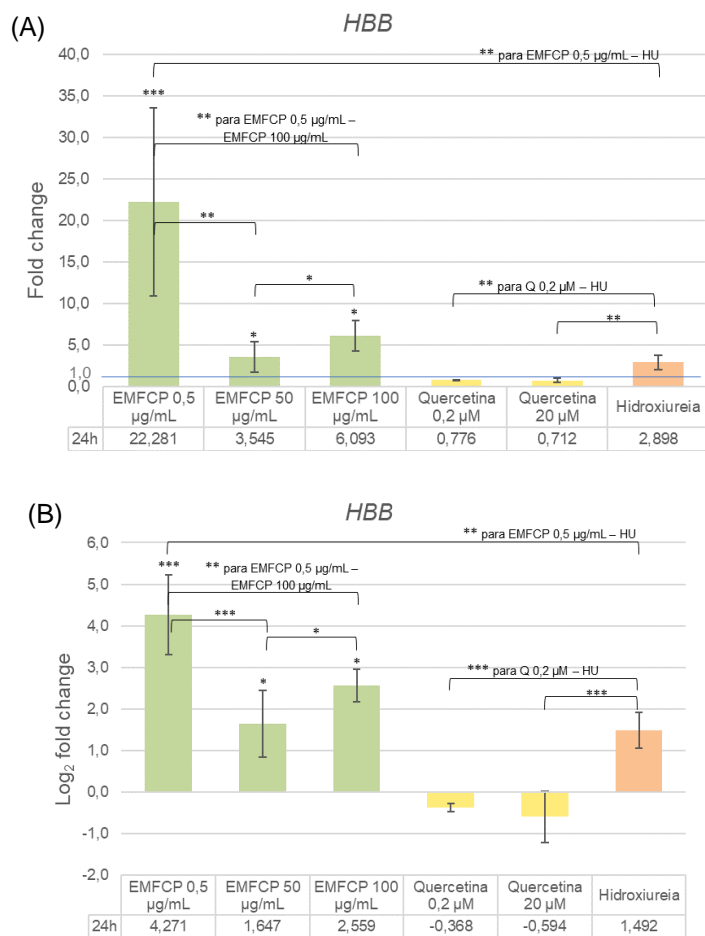
**Figura 4.4:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HBA*.

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)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  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  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.2.2 Gene *HBB*

De acordo com os resultados apresentados (**Figura 4.5- A**) observa-se o aumento da transcrição do gene da  $\beta$ -globina nas células sujeitas aos tratamentos com as três concentrações de EMFCP e com HU. No entanto, uma diminuição da expressão deste gene é observada após exposição com Quercetina em ambas as concentrações. A exposição com Quercetina a 0,2  $\mu$ M reduz a expressão deste gene aproximadamente 1,3 vezes, enquanto o mesmo composto na concentração de 20  $\mu$ M, apresenta uma inibição do gene *HBB* de aproximadamente 1,4 vezes.

A análise da expressão relativa do gene *HBB*, (**Figura 4.5- B**) demonstrou que todas as concentrações do EMFCP aumentam a transcrição deste gene. Estas são significativas nas células expostas ao EMFCP a 0,5  $\mu$ g/mL ( $p < 0,0001$ ), ao EMFCP a 50  $\mu$ g/mL ( $p = 0,029$ ) e ao EMFCP a 100  $\mu$ g/mL ( $p = 0,016$ ). O EMFCP a 0,5  $\mu$ g/mL apresenta o maior aumento transcricional do gene *HBB* ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 } \mu\text{g/mL)} = 4,271 \pm 0,954$ ). Este último valor é maior do que aquele que se obteve para a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,492 \pm 0,424$ ). Adicionalmente, observam-se diferenças significativas na expressão deste gene. Estas têm mais impacto entre o EMFCP a 0,5  $\mu$ g/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 } \mu\text{g/mL)} = 4,271 \pm 0,954$ ) e o EMFCP a 50  $\mu$ g/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 50 } \mu\text{g/mL)} = 1,647 \pm 0,803$ ) com  $p < 0,001$ ; entre a Quercetina a 0,2  $\mu$ M ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 } \mu\text{M)} = -0,368 \pm 0,092$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,492 \pm 0,424$ ) com  $p < 0,001$  e entre a Quercetina a 20  $\mu$ M ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 } \mu\text{M)} = -0,594 \pm 0,608$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,492 \pm 0,424$ ) com  $p < 0,001$ .

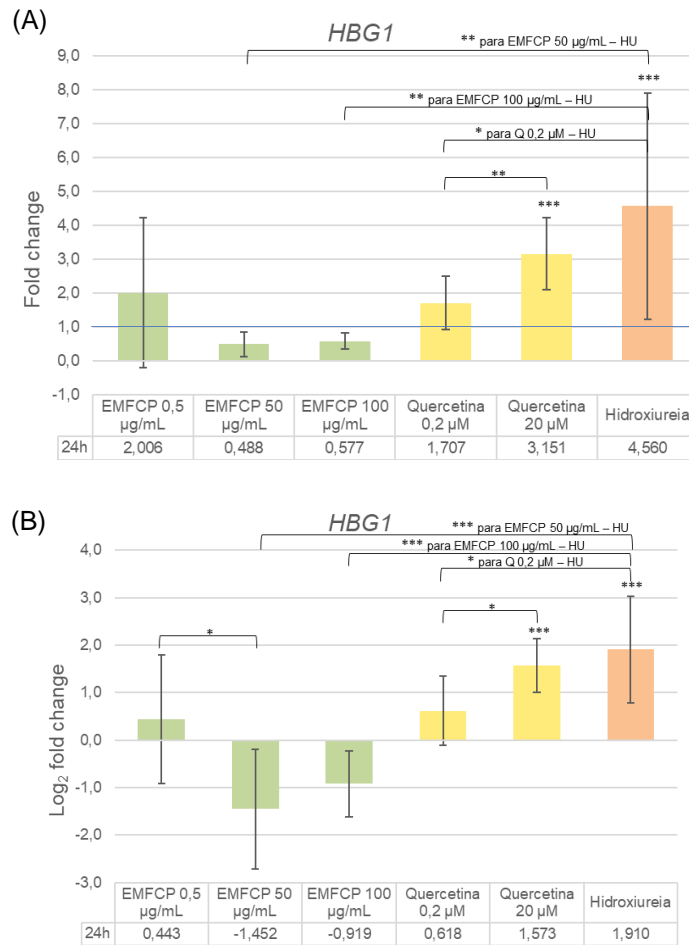


**Figura 4.5:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HBB*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBB* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

### 4.2.3 Gene *HBG1*

Em relação ao gene *HBG1* (**Figura 4.6- A**), a análise de dados transcricionais demonstra que, este apresenta um aumento da expressão nas células expostas aos tratamentos com EMFCP na concentração de 0,5 µg/mL, com Quercetina em ambas as concentrações e com HU. Pelo contrário, concentrações de EMFCP de 50 µg/mL e 100 µg/mL demonstram ter um efeito inibitório na transcrição deste gene, apresentando redução da expressão gênica de aproximadamente 2,1 vezes e 1,7 vezes, respectivamente.

Relativamente à análise estatística dos efeitos da exposição na transcrição do gene *HBG1* (**Figura 4.6- B**) observa-se que estes são significativos nas células expostas à Quercetina a 20 µM ( $p < 0,0001$ ) e à HU ( $p < 0,0001$ ), sendo este último tratamento aquele que tem o maior aumento em relação à expressão deste gene ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,910 \pm 1,123$ ). Paralelamente, é possível constatar a existência de diferenças significativas na expressão do gene da  $\gamma$ -globina, sendo as mais significativas aquelas entre o EMFCP a 50 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 50 µg/mL)} = -1,452 \pm 1,254$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,910 \pm 1,123$ ) com  $p < 0,001$  e entre o EMFCP a 100 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 100 µg/mL)} = -0,919 \pm 0,694$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,910 \pm 1,123$ ) com  $p < 0,001$ .



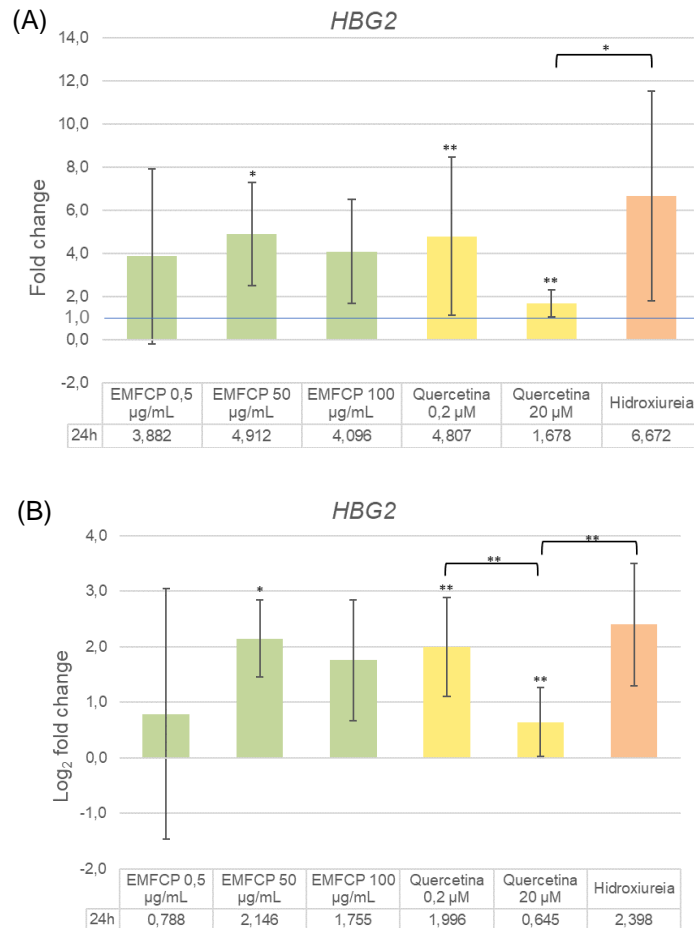
**Figura 4.6:** Efeitos do EMFPCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HBG1*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBG1* após exposição ao EMFPCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)** Log<sub>2</sub> ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFPCP a 0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/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 do Fold change e do Log<sub>2</sub> fold change, representadas como \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001, foram calculadas através do teste t.

#### 4.2.4 Gene *HBG2*

De acordo com os resultados observados (**Figura 4.7- A**), todos os tratamentos induziram o aumento da expressão do gene *HBG2*.

Com base na análise de dados da expressão relativa do gene *HBG2* (**Figura 4.7- B**), verifica-se que o aumento do nível de expressão deste gene é significativo nas células sujeitas ao tratamento com EMFPCP a 50 µg/mL (p=0,031) e nas células sujeitas ao tratamento com ambas as concentrações de Quercetina (Q 0,2 µM p=0,005) e (Q 20 µM

p=0,002). O maior aumento transcricional é observado após exposição à HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,398 \pm 1,107$ ). Adicionalmente, observam-se diferenças significativas na expressão do gene *HBG2* entre as duas concentrações de Quercetina ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 } \mu\text{M)} = 1,996 \pm 0,886$ ) e ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 } \mu\text{M)} = 0,645 \pm 0,617$ ) com  $p < 0,01$  e entre a Quercetina a 20  $\mu\text{M}$  ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 } \mu\text{M)} = 0,645 \pm 0,617$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,398 \pm 1,107$ ) com  $p < 0,01$ .



**Figura 4.7:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HBG2*.

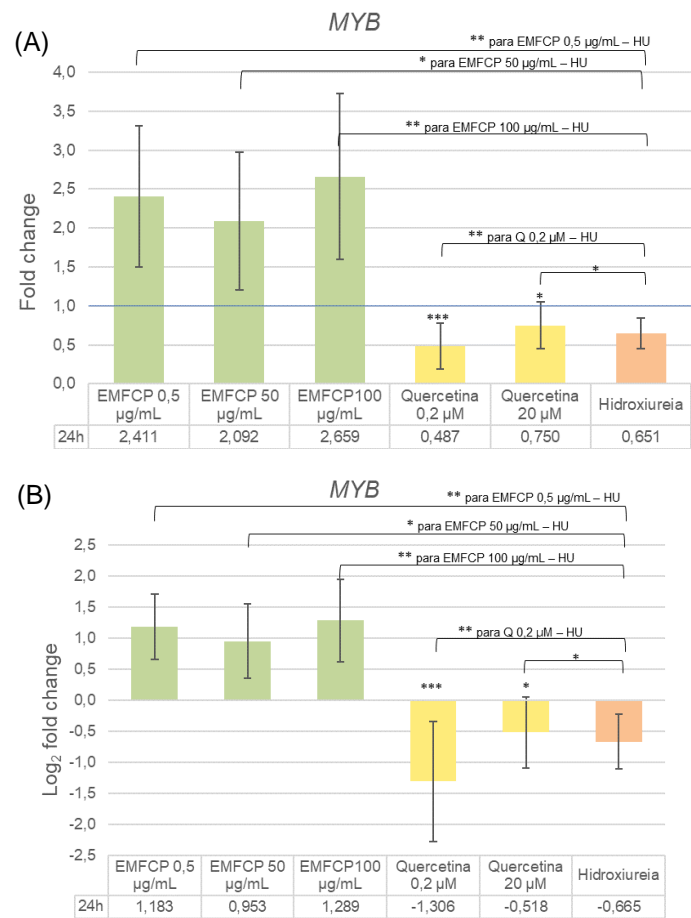
Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBG2* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica 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  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

### 4.3 Análise do perfil de expressão de genes reguladores da $\gamma$ -globina

#### 4.3.1 Gene *MYB*

No que se refere à análise transcricional do gene *MYB* (**Figura 4.8- A**), verifica-se aumento de expressão nas células sujeitas ao tratamento com todas as concentrações de EMFCP. Por outro lado, as expostas à Quercetina e à HU apresentam uma diminuição na expressão deste gene de aproximadamente 2,1 vezes para a Quercetina a 0,2  $\mu$ M, aproximadamente 1,3 vezes para a Quercetina a 20  $\mu$ M e aproximadamente 1,5 vezes para a HU.

A expressão relativa do gene *MYB* encontra-se apresentada na **Figura 4.8- B**. Após 24 horas de exposição, a Quercetina afeta o nível transcricional das células expostas a ambas as concentrações deste composto (Q 0,2  $\mu$ M  $p < 0,0001$ ) e (Q 20  $\mu$ M  $p = 0,043$ ). O tratamento com EMFCP a 100  $\mu$ g/mL apresenta o maior aumento da transcrição do gene *MYB* ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 100  $\mu$ g/mL) =  $1,289 \pm 0,663$ ), sendo este valor maior do que o verificado nas células expostas à HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $-0,665 \pm 0,443$ ). Adicionalmente, é possível observar que existem diferenças significativas na expressão deste gene, sobretudo entre o EMFCP a 0,5  $\mu$ g/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5  $\mu$ g/mL) =  $1,183 \pm 0,528$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $-0,665 \pm 0,443$ ), com  $p < 0,01$ ; entre o EMFCP a 100  $\mu$ g/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 100  $\mu$ g/mL) =  $1,289 \pm 0,663$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $-0,665 \pm 0,443$ ) com  $p < 0,01$  e entre a Quercetina a 0,2  $\mu$ M ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (Q 0,2  $\mu$ M) =  $-1,306 \pm 0,972$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $-0,665 \pm 0,443$ ) com  $p < 0,01$ , que representam as diferenças mais relevantes para este gene.

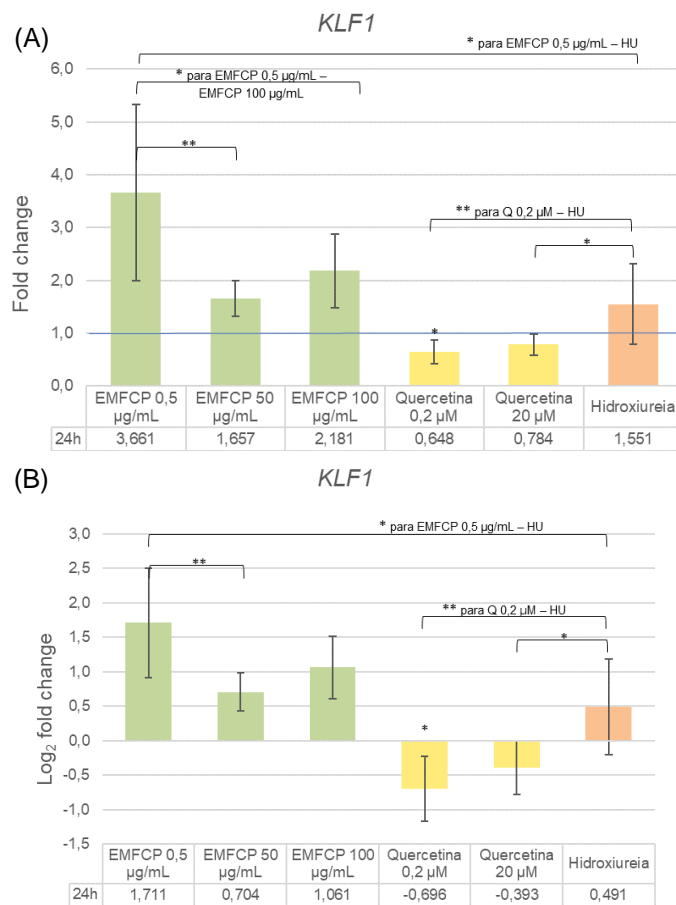


**Figura 4.8:** Efeitos do EMFPCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *MYB*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *MYB* após exposição ao EMFPCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFPCP a 0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/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 do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

### 4.3.2 Gene *KLF1*

De forma semelhante ao gene *MYB*, verifica-se um aumento da expressão deste gene nos tratamentos com todas as concentrações do EMFCP (**Figura 4.9- A**). Adicionalmente, observa-se um aumento da transcrição deste gene nas células expostas à HU (**Figura 4.9- A**). Pelo contrário, nota-se uma diminuição da transcrição nas expostas à Quercetina em ambas as concentrações (**Figura 4.9- A**). Esta diminuição é de aproximadamente 1,5 vezes para a concentração de Quercetina a 0,2 µM e de aproximadamente 1,3 vezes para a concentração a 20 µM deste mesmo composto.

De acordo com a análise da expressão relativa do gene *KLF1* (**Figura 4.9- B**), observa-se efeito significativo na inibição do gene *KLF1* no tratamento com Quercetina a 0,2 µM ( $p=0,013$ ). A concentração de EMFCP a 0,5 µg/mL apresenta o aumento mais elevado de transcrição do gene *KLF1* ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 µg/mL)} = 1,711 \pm 0,795$ ), sendo este valor maior do que o obtido para a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,491 \pm 0,695$ ). Pela análise dos dados ainda se constata a existência de diferenças significativas na expressão deste gene, sendo as mais relevantes aquelas entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 µg/mL)} = 1,711 \pm 0,795$ ) e o EMFCP a 50 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 50 µg/mL)} = 0,704 \pm 0,275$ ) com  $p < 0,01$  e entre a Quercetina a 0,2 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 µM)} = -0,696 \pm 0,470$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,491 \pm 0,695$ ) com  $p < 0,01$ .

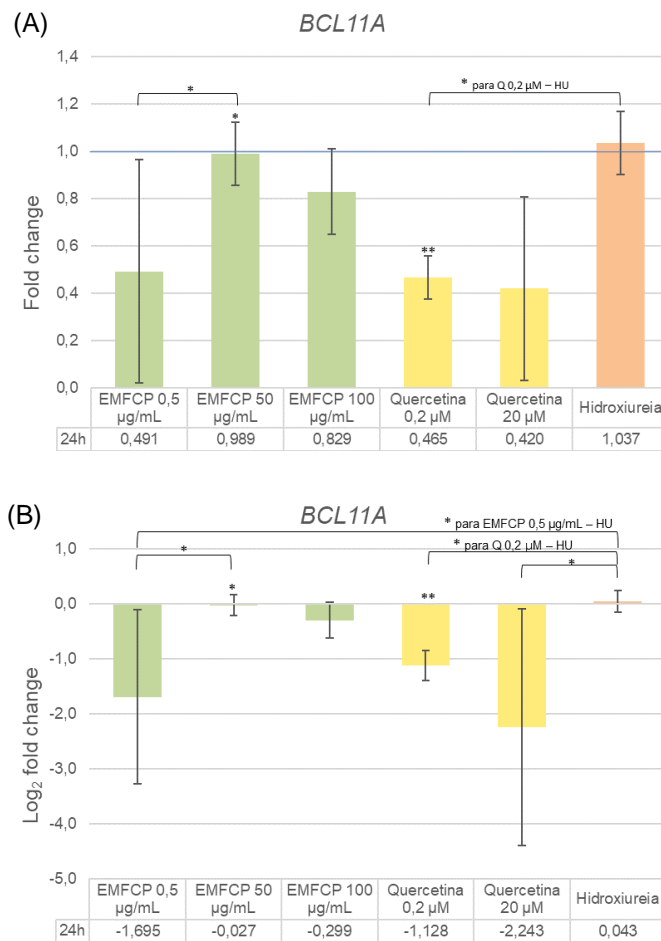


**Figura 4.9:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *KLF1*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *KLF1* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

### 4.3.3 Gene *BCL11A*

Em relação ao gene *BCL11A* (**Figura 4.10- A**), verifica-se uma diminuição na expressão deste gene na maioria das células excetuando nas expostas à HU. Esta diminuição é de aproximadamente 2,0 vezes nas células expostas ao EMFCP a 0,5 µg/mL; de aproximadamente 1,0 vez nas células expostas ao EMFCP a 50 µg/mL; de aproximadamente 1,2 vezes nas células expostas ao EMFCP a 100 µg/mL; de aproximadamente 2,2 vezes nas células expostas ao tratamento com Quercetina a 0,2 µM e de aproximadamente 2,4 vezes nas células expostas ao tratamento com Quercetina a 20 µM.

Com base na análise de dados da expressão relativa do gene *BCL11A* (**Figura 4.10- B**), verifica-se que a diminuição da expressão deste gene é significativa nas células após exposição ao EMFCP a 50 µg/mL ( $p=0,021$ ) e à Quercetina a 0,2 µM (Q 0,2 µM  $p=0,004$ ). O maior aumento na expressão é observado após exposição com HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,043 \pm 0,194$ ). Adicionalmente, verificam-se diferenças significativas na expressão deste gene, entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 µg/mL)} = -1,695 \pm 1,581$ ) e o EMFCP a 50 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 50 µg/mL)} = -0,027 \pm 0,192$ ) com  $p<0,05$ ; entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,5 µg/mL)} = -1,695 \pm 1,581$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,043 \pm 0,194$ ), com  $p<0,05$ ; entre a Quercetina a 0,2 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 µM)} = -1,128 \pm 0,272$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,043 \pm 0,194$ ) com  $p<0,05$  e entre a Quercetina a 20 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 µM)} = -2,243 \pm 2,147$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,043 \pm 0,194$ ) com  $p<0,05$ .

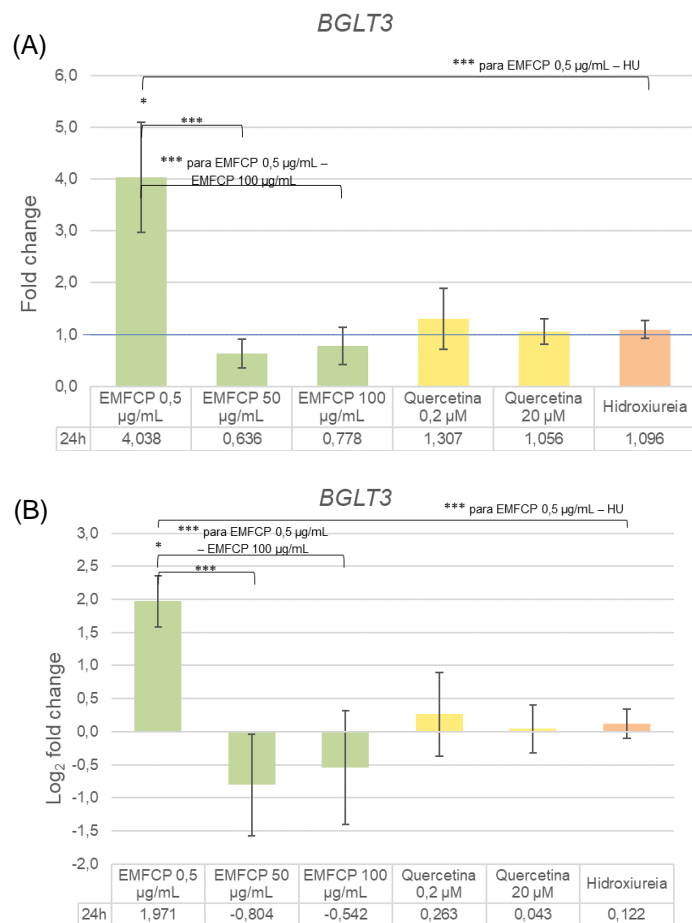


**Figura 4.10:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *BCL11A*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *BCL11A* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.3.4 Gene *BGLT3*

Relativamente à expressão do gene *BGLT3*, nos dados obtidos observa-se um aumento da expressão do mesmo nas células expostas ao EMFCP a 0,5 µg/mL, a ambas as concentrações da Quercetina e à HU (**Figura 4.11- A**). Pelo contrário, verifica-se uma diminuição da expressão do gene *BGLT3* nas restantes concentrações do EMFCP (50 e 100 µg/mL), com uma inibição de aproximadamente 1,6 vezes e de 1,3 vezes, respetivamente.

A análise da expressão relativa do gene *BGLT3* (**Figura 4.11- B**), demonstra que, após 24 horas de exposição, a concentração mais baixa de EMFCP aumentou significativamente a transcrição deste gene (0,5 µg/mL  $p = 0,020$ ). Esta concentração apresenta ainda o maior aumento transcricional deste gene ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $1,971 \pm 0,389$ ), sendo superior ao observado nas células expostas à HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $0,122 \pm 0,217$ ). Simultaneamente, verificam-se diferenças significativas na expressão deste gene entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $1,971 \pm 0,389$ ) e o EMFCP a 50 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 50 µg/mL) =  $-0,804 \pm 0,768$ ) com  $p < 0,001$ ; entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $1,971 \pm 0,389$ ) e o EMFCP a 100 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 100 µg/mL) =  $-0,542 \pm 0,856$ ) com  $p < 0,001$  e entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $1,971 \pm 0,389$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $0,122 \pm 0,217$ ), com  $p < 0,001$ .



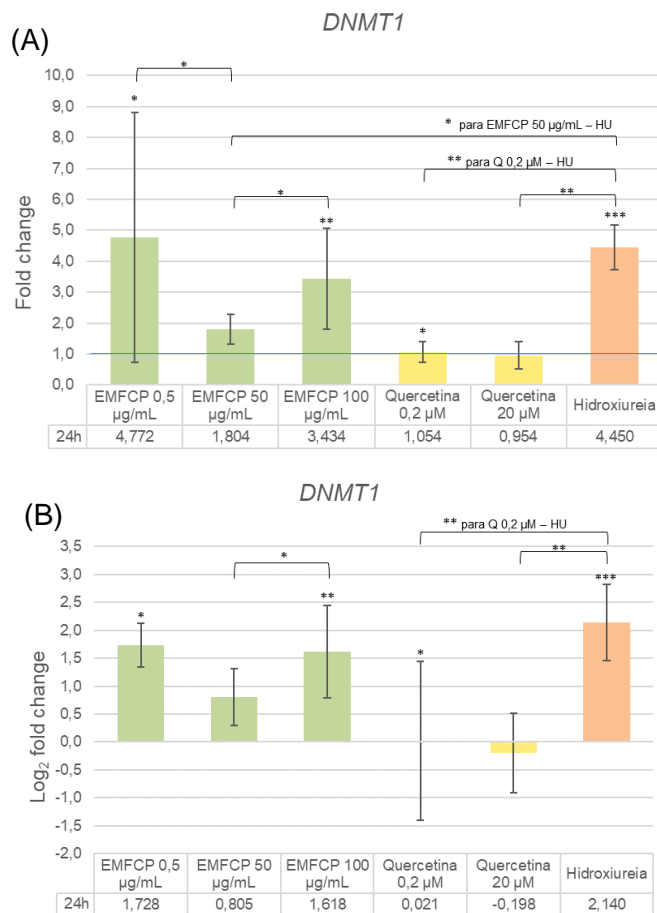
**Figura 4.11:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *BGLT3*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *BGLT3* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

## 4.4 Análise do perfil de expressão de moduladores epigenéticos da $\gamma$ -globina

### 4.4.1 Gene *DNMT1*

A análise dos resultados obtidos demonstrou que na grande maioria das exposições efetuadas, se observou um aumento da expressão do transcrito com exceção da exposição à Quercetina a 20  $\mu$ M (**Figura 4.12- A**). Neste tratamento observou-se uma diminuição da transcrição do gene *DNMT1* de aproximadamente 1 vez.

A expressão relativa do gene *DNMT1* (**Figura 4.12- B**), apresenta efeitos significativos na transcrição deste gene nas células sujeitas ao tratamento com EMFCP a 0,5  $\mu$ g/mL ( $p=0,023$ ), com EMFCP a 100  $\mu$ g/mL ( $p=0,004$ ), com Quercetina a 0,2  $\mu$ M ( $p=0,031$ ) e com HU ( $p=0,001$ ). Este último tratamento apresenta o maior aumento transcricional do gene *DNMT1* ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,140 \pm 0,248$ ). Para além disto, são observadas diferenças significativas na expressão deste gene. Estas têm mais impacto entre tratamentos, especificadamente, entre a Quercetina a 0,2  $\mu$ M ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 } \mu\text{M)} = 0,021 \pm 0,432$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,140 \pm 0,248$ ) com  $p<0,01$  e entre a Quercetina a 20  $\mu$ M ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 } \mu\text{M)} = -0,198 \pm 0,675$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,140 \pm 0,248$ ) com  $p<0,01$ .



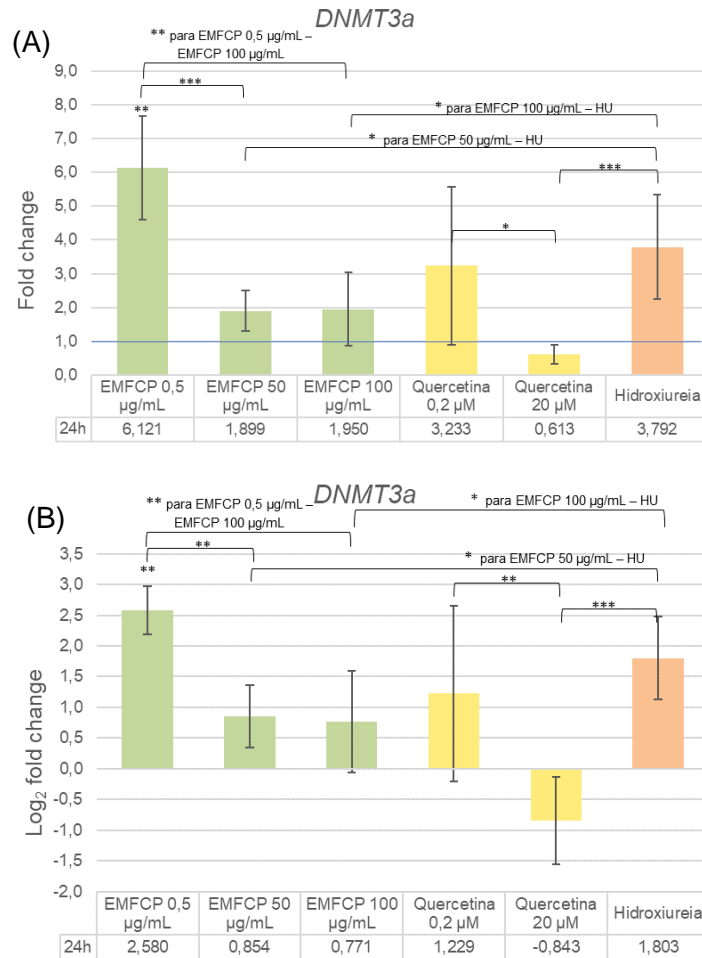
**Figura 4.12:** Efeitos do EMFPCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *DNMT1*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *DNMT1* após exposição ao EMFPCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFPCP a 0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/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 do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.4.2 Gene *DNMT3a*

Em concordância com a análise transcricional do *DNMT1*, observa-se um aumento na expressão do gene *DNMT3a* em todos os tratamentos, com exceção das células sujeitas ao tratamento com Quercetina a 20 µM (**Figura 4.13- A**) onde se observou uma redução da expressão deste gene em aproximadamente 1,6 vezes.

A expressão relativa do gene *DNMT3a* encontra-se apresentada na **Figura 4.13- B**. Pela análise dos dados observa-se que a concentração de EMFPCP a 0,5 µg/mL induz

significativamente o aumento da expressão deste gene (0,5 µg/mL  $p=0,002$ ). Este último tratamento exibe o maior aumento da expressão relativa de ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $2,580 \pm 0,392$ ), sendo superior ao obtido para o controlo positivo ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $1,803 \pm 0,676$ ). Fora isto, constata-se diferenças significativas na expressão deste gene, sendo a mais significativa aquela entre a Quercetina a 20 µM ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (Q 20 µM) =  $-0,843 \pm 0,706$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $1,803 \pm 0,676$ ) com  $p<0,001$ .

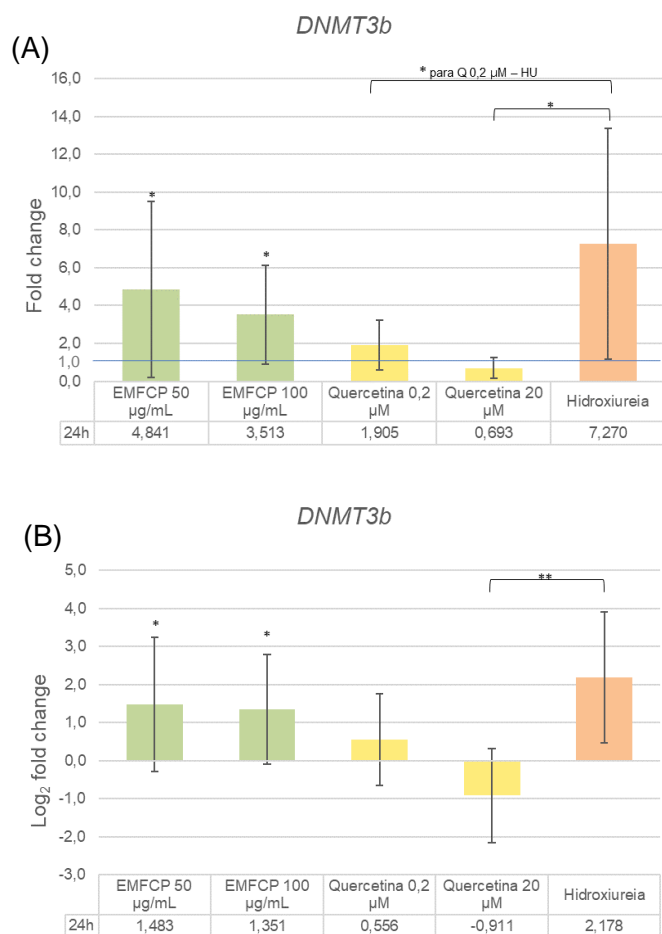


**Figura 4.13:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *DNMT3a*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *DNMT3a* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.4.3 Gene *DNMT3b*

Novamente, em concordância com as análises transcricionais anteriores efetuadas para os genes *DNMT1* e *DNMT3a*, a expressão do gene *DNMT3b* também aumenta nas células expostas ao EMFCP a 50 µg/mL e a 100 µg/mL, nas células expostas à Quercetina a 0,2 µM e nas células expostas à HU (**Figura 4.14- A**). Pelo contrário, observa-se um decréscimo na expressão do gene *DNMT3b* no tratamento com Quercetina a Q 20 µM (**Figura 4.14- A**) de aproximadamente 1,4 vezes. Não se obteve resultados para a concentração mais baixa de EMFCP (0,5 µg/mL).

De acordo com a análise da expressão relativa do gene *DNMT3b* (**Figura 4.14- B**), observa-se que o EMFCP a 50 e a 100 µg/mL aumentam significativamente a transcrição deste gene, obtendo valores significativos de ( $p=0,014$ ) e de ( $p=0,033$ ), respectivamente. O tratamento com HU exibe o maior aumento transcricional deste gene ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,178 \pm 1,721$ ). Paralelamente, constata-se a presença de diferenças significativas na expressão deste gene entre a Quercetina a 20 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 µM)} = -0,911 \pm 1,237$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 2,178 \pm 1,721$ ) com  $p < 0,01$ .



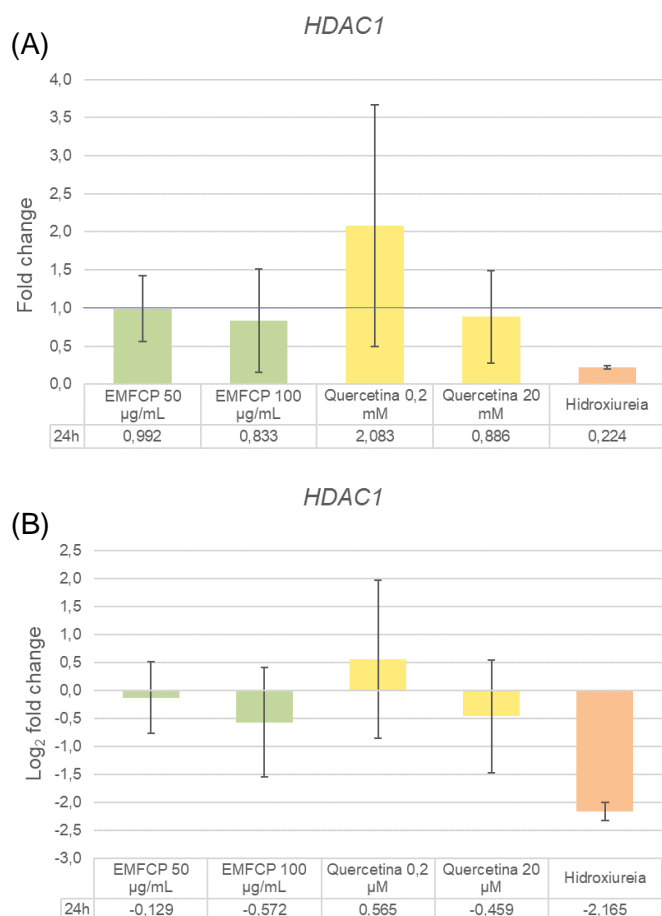
**Figura 4.14:** Efeitos do EMFPCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *DNMT3b*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *DNMT3b* após exposição ao EMFPCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica após 24 horas de exposição ao EMFPCP a 0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/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 do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.4.4 Gene *HDAC1*

A análise dos resultados apresentados na **Figura 4.15- A**, demonstra o decréscimo da expressão do gene *HDAC1* na maioria das células, com exceção das sujeitas ao tratamento com Quercetina a 0,2 µM. Nas restantes a diminuição da expressão foi de aproximadamente 1,0 vez e de 1,2 vezes para o EMFPCP a 50 e 100 µg/mL, respetivamente; de aproximadamente 1,1 vezes na amostra sujeita ao tratamento com Quercetina a 20 µM e de aproximadamente 4,5 vezes nas células expostas à HU.

Semelhante ao gene *DNMT3b*, não se obteve resultados no tratamento com EMFCP a 0,5 µg/mL.

A análise da expressão relativa do gene *HDAC1* (**Figura 4.15- B**), demonstra que, após 24 horas de exposição, as células expostas à Quercetina a 20 µM apresentam maior transcrição referente a este gene. Para além disso, ainda é possível observar que não existem diferenças significativas a reportar.



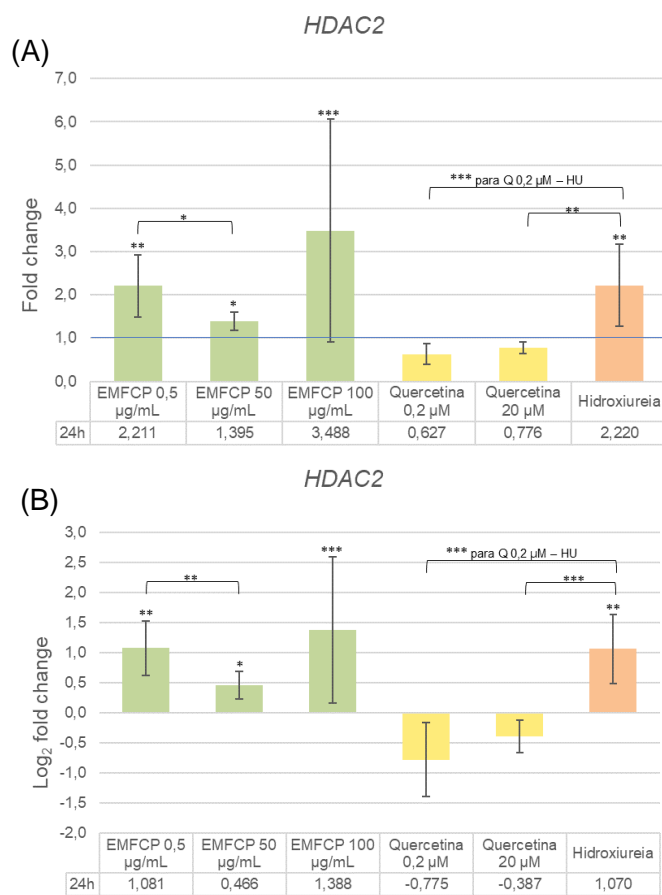
**Figura 4.15:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HDAC1*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC1* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência.

#### 4.4.5 Gene *HDAC2*

A análise transcricional demonstrou, em relação ao gene *HDAC2* um aumento da expressão nas células expostas às três concentrações do EMFCP (0,5 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL) e nas células expostas à HU (**Figura 4.16- A**). Em contrapartida, nas células sujeitas à Quercetina em ambas as concentrações (Q 0,2 µM e Q 20 µM) observa-se uma diminuição do nível de expressão deste transcrito, aproximadamente de 1,6 e de 1,3 vezes, respetivamente.

Com base na análise transcricional do gene *HDAC2* (**Figura 4.16- B**), observa-se que as células sujeitas ao tratamento com todas as concentrações do EMFCP e com HU induzem o aumento da expressão deste gene de forma significativa (EMFCP 0,5 µg/mL  $p=0,005$ ), (EMFCP 50 µg/mL  $p=0,020$ ), (EMFCP 100 µg/mL  $p=0,001$ ) e (HU  $p=0,005$ ). O maior aumento da expressão génica relativa é exibido nas células expostas ao EMFCP a 100 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 100 µg/mL)} = 1,388 \pm 1,220$ ), sendo superior ao aumento obtido para a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,070 \pm 0,574$ ). Adicionalmente, observam-se diferenças significativas na expressão deste gene, sendo as mais relevantes aquelas entre a Quercetina a 0,2 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 µM)} = -0,775 \pm 0,616$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,070 \pm 0,574$ ) com  $p<0,001$  e entre Quercetina a 20 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 µM)} = -0,387 \pm 0,268$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,070 \pm 0,574$ ) com  $p<0,001$ .



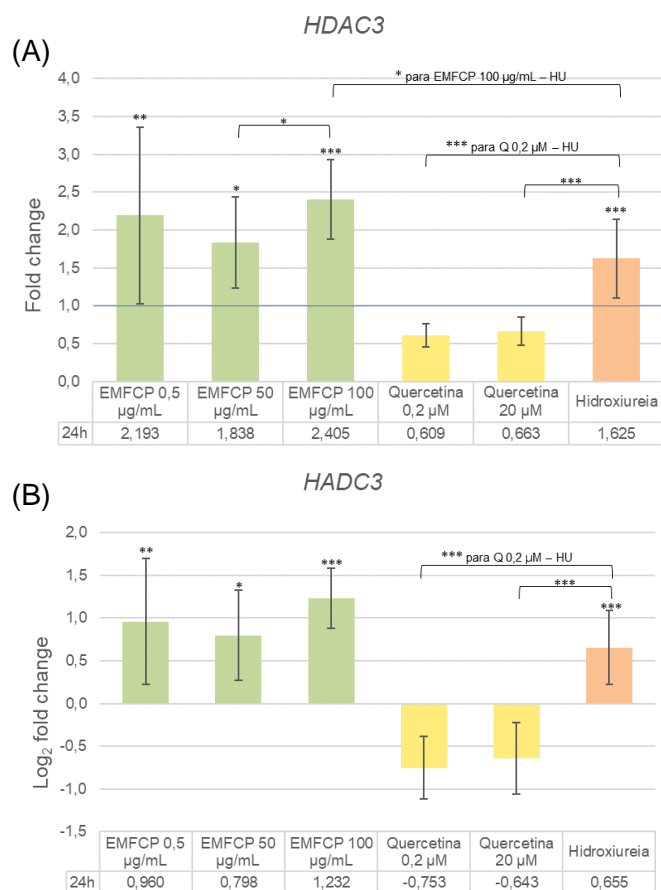
**Figura 4.16:** Efeitos do EMFACP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HDAC2*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC2* após exposição ao EMFACP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFACP a 0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/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 do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.4.6 Gene *HDAC3*

Novamente, em concordância com as análises transcricionais anteriores efetuadas para o gene *HDAC2*, a expressão do gene *HDAC3* também aumenta após o tratamento com todas as concentrações do EMFACP e com HU, e diminui quando as células são expostas a ambas as concentrações de Quercetina (**Figura 4.17- A**). A redução da expressão deste gene é de aproximadamente 1,6 vezes para o tratamento com Quercetina a 0,2 µM e de aproximadamente 1,5 vezes para o tratamento com Quercetina a 20 µM.

A expressão relativa do gene *HDAC3* encontra-se apresentada na **Figura 4.17- B**. Os dados apresentados demonstram que todos os tratamentos com EMFCP, juntamente com o tratamento com HU aumentam a expressão do gene *HDAC3*. Estes são significativos após a exposição ao EMFCP a 0,5 (p=0,003), 50 (p=0,017) e 100 µg/mL (p<0,0001) e à HU (p=0,001). O maior aumento transcricional é observado após exposição ao EMFCP a 100 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 100 µg/mL)} = 1,232 \pm 0,348$ ), sendo superior ao observado para o controlo positivo ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,655 \pm 0,435$ ). Por outro lado, existem diferenças significativas na expressão deste gene entre diferentes tratamentos, com maior significância entre a Quercetina a 0,2 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 0,2 µM)} = -0,753 \pm 0,365$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,655 \pm 0,435$ ) com p<0,001 e entre Quercetina a 20 µM ( $\text{Log}_2\text{FC (Q 20 µM)} = -0,643 \pm 0,422$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,655 \pm 0,435$ ) com p<0,001.



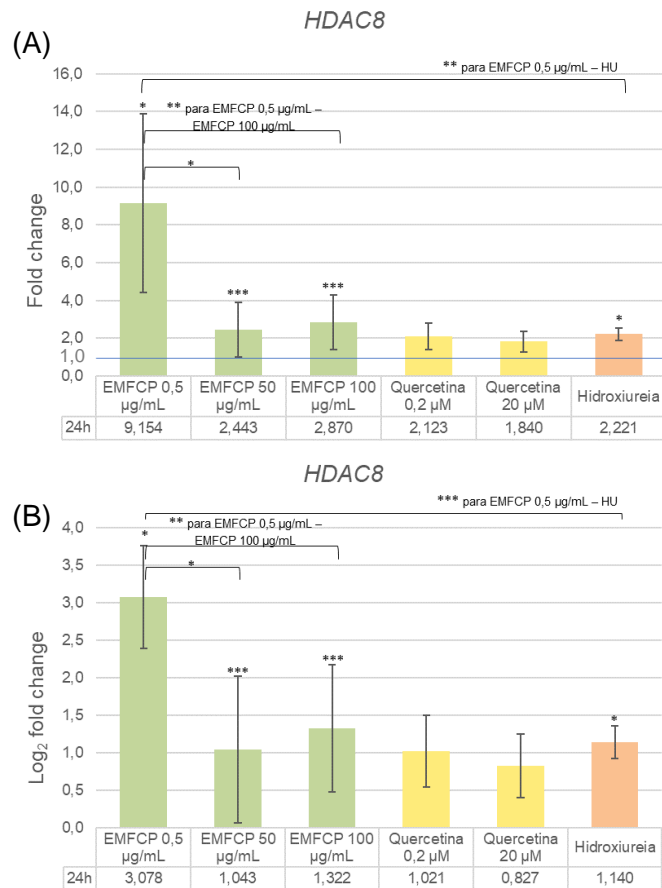
**Figura 4.17:** Efeitos do EMFACP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HDAC3*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC3* após exposição ao EMFACP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica após 24 horas de exposição ao EMFACP a 0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/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 do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.4.7 Gene *HDAC8*

Por fim, a análise transcricional efetuada ao gene *HDAC8*, demonstrou que este apresenta um aumento de expressão após todas as exposições efetuadas neste trabalho. **(Figura 4.18- A).**

Com base na análise dos dados da expressão relativa do gene *HDAC8* **(Figura 4.18- B)**, mais uma vez verifica-se impacto estatístico na expressão deste gene nas células expostas ao tratamento com HU e ao tratamento com todas as concentrações do EMFACP ( $p = 0,050$  para HU,  $p = 0,038$  para EMFACP a 0,5 µg/mL,  $p = 0,001$  para EMFACP a 50 µg/mL, e  $p < 0,0001$  para EMFACP a 100 µg/mL). É possível observar que o EMFACP a

0,5 µg/mL exibe o maior aumento transcricional deste gene ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $3,078 \pm 0,686$ ). Este, por sua vez, é maior do que o observado para a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $1,140 \pm 0,220$ ). Para além disto, observam-se diferenças significativas na expressão deste gene, sendo a mais relevante aquela entre o EMFCP a 0,5 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (EMFCP 0,5 µg/mL) =  $3,078 \pm 0,686$ ) e a HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) =  $1,140 \pm 0,220$ ), com  $p < 0,001$ .



**Figura 4.18:** Efeitos do EMFCP e da Quercetina no padrão de expressão do gene *HDAC8*. Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC8* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), **(B)**  $\text{Log}_2$  ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica 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 *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do  $\text{Log}_2$  fold change, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.



## Capítulo 5 - Discussão

---

Dada a alta incidência, morbidade e mortalidade das  $\beta$ -hemoglobinopatias, que a procura por novos compostos mais eficazes na indução da hemoglobina fetal (HbF) e com menos efeitos secundários têm estado sob o escrutínio da comunidade científica (74). Este facto associado ao défice de tratamentos médicos e de recursos em países subdesenvolvidos faz com seja importante desenvolver novas abordagens terapêuticas que sejam acessíveis a todos, de forma a melhorar a qualidade e esperança de vida destes doentes (74).

Atualmente, um dos tratamentos promissores para as  $\beta$ -hemoglobinopatias recaí sobre a indução da hemoglobina fetal através de agentes farmacológicos, como é o caso da hidroxiureia (HU) (1). Contudo, o facto de o seu mecanismo de ação não ser totalmente conhecido, aliado à existência de não respondedores e à complicação do tratamento com o aparecimento de efeitos secundários graves (1), leva à identificação de novos compostos indutores da HbF que consigam ultrapassar esta problemática. Numa revisão científica conduzida por Mukherjee e colaboradores (2), estes investigadores sumarizam algumas moléculas isoladas de fontes naturais, como é o exemplo o resveratrol e a quercetina, como compostos indutores da HbF eficazes e com efeitos adversos reduzidos.

No presente estudo foi avaliado o potencial de dois compostos naturais (extrato metanólico de folhas de *Carica papaya* L. (EMFCP) e Quercetina) na regulação da expressão de genes das globinas, de genes reguladores/silenciadores da  $\gamma$ -globina, assim como moduladores epigenéticos da mesma globina, em células K562, expostas ao EMFCP a 0,5; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , à Quercetina a 0,2 e 20  $\mu\text{M}$  e a 25  $\mu\text{g/mL}$  de HU, durante 24 horas.

Os extratos de folhas de *C.papaya* têm-se revelado potenciais aliados no tratamento de várias doenças na medicina tradicional (31) como é o caso da malária e do dengue (51). Neste sentido, torna-se importante avaliar o perfil de segurança deste produto medicinal de forma a prever a sua citotoxicidade e de forma a “selecionar” uma dose segura para uso humano (75). Como tal no nosso estudo começou-se por avaliar a proliferação e a viabilidade do EMFCP em células K562. Os resultados demonstraram que o EMFCP a 500  $\mu\text{g/mL}$  aparentava ser citotóxico e como tal foi excluído. Por outro lado, as restantes

concentrações não demonstram efeitos citotóxicos, o que permitiu a continuação do estudo.

Adicionalmente, estudos realizados por Ismail e colaboradores (75) revelam que concentrações de extratos de folhas de *C.papaya* até 2g/kg, que correspondem a doses 14 vezes superiores às usadas na medicina tradicional, não demonstram efeitos tóxicos quando administradas oralmente em ratos durante 13 semanas.

A Quercetina é um flavonóide abundante em frutas e vegetais (45) que foi reportado como indutor da HbF, um vez que promove a expressão do gene da  $\gamma$ -globina (2). Após a sua ingestão, através da dieta, a quantidade total desta molécula no plasma encontra-se em concentrações nanomolares (100nM), contudo, com a suplementação da quercetina essa quantidade pode aumentar alcançando concentrações nanomolares elevadas ou até mesmo concentrações micromolares baixas deste composto (45).

No nosso estudo as células foram expostas à Quercetina a 0,2 e a 20  $\mu$ M. Os resultados demonstraram que a exposição à Quercetina a 0,2  $\mu$ M não afeta a proliferação celular, contudo o crescimento celular é afetado quando as células são expostas a 20  $\mu$ M do mesmo composto. Os resultados da Quercetina a 20  $\mu$ M parecem ir de encontro aos reportados por Srivastava e colaboradores (76) que demonstram uma diminuição da proliferação celular à medida que a concentração da Quercetina aumenta. Adicionalmente, não se observam efeitos citotóxicos nas células expostas aos dois compostos, o que demonstra ser vantajoso quando comparado com outros indutores da HbF, tais como a HU.

Mais ainda, estudos realizados por Brisdelli e colaboradores (77), em células K562, mostraram que a Quercetina a 25  $\mu$ M (concentração superior às utilizadas no nosso estudo), teve um grande impacto na proliferação celular apresentando também uma ligeira citotoxicidade para esta concentração.

A regulação da expressão da hemoglobina está assente em mecanismos genéticos e epigenéticos, que controlam a expressão das várias globinas ao longo do desenvolvimento humano (1). Neste sentido, no nosso estudo começou-se por analisar os padrões de expressão dos genes referentes às globinas. Ao analisar os resultados, estes demonstram que todas as concentrações do EMFCP aumentam a transcrição dos genes *HBA*, *HBB* e *HBG2*, sendo semelhantes aos respetivos resultados das células expostas à HU. Por outro lado, o mesmo composto aumenta a transcrição do gene *HBG1* para a concentração de 0,5  $\mu$ g/mL, enquanto concentrações mais altas (50 e 100

µg/mL) tendem a inibir a expressão deste gene. A concentração de 0,5 µg/mL apresenta o único resultado da expressão do gene *HBG1* semelhante com a HU.

Já os resultados demonstram que a Quercetina a 20 µM afetou os níveis de mRNA da *α-globina*, tendo efeito distinto quando comparado com os dados obtidos para a HU. Por outro lado, ao analisar os dados referentes ao gene da *β-globina* ambas as concentrações deste composto inibem a sua transcrição, apresentando também efeitos distintos aos obtidos para a HU. Adicionalmente, ao analisar a expressão dos genes *HBG1* e *HBG2* observa-se que as duas concentrações de Quercetina aumentam a transcrição destes genes, sendo parecidos com os dados obtidos para a HU. Para além disso são também parecidos com dados de estudos realizados por Pabuprapap e colaboradores (35), que salientam o potencial indutor deste composto na HbF.

Até à data, múltiplos fatores têm sido descobertos como potenciais intervenientes na regulação da *γ-globina*. Neste processo estão envolvidos diversos genes, salientando-se, o *MYB* (6), o *KLF1* (7) e o *BCL11A* (1) descritos na literatura como silenciadores da *γ-globina* e o gene não codificante *BGLT3* descrito como ativador da expressão desta globina (16).

Ao observar os resultados dos genes silenciadores da HbF verifica-se que o EMFCP induz a expressão dos genes *MYB* e *KLF1* para todas as concentrações analisadas. Os dados correspondentes ao gene *MYB* são diferentes dos obtidos para a HU. Por outro lado, são discordantes com estudos realizados por Jiang e colaboradores (15), que demonstram que, em células K562, o aumento da expressão do *MYB* inibe a *γ-globina*.

Em relação aos resultados do EMFCP referentes ao gene *KLF1*, estes são idênticos aos obtidos para a HU. Contudo estes resultados, contrariam observações feitas por Zhou e colaboradores (11), que mostram que a diminuição, deste gene induz a expressão da *γ-globina*, uma vez que, tal como o *MYB*, é um inibidor desta globina.

No que se refere ao gene *BCL11A*, observa-se a inibição da transcrição deste gene nas células expostas a todas as concentrações do EMFCP. Estes resultados são diferentes aos obtidos para a HU. Por outro lado, estão de acordo com De Martino e colaboradores (7), que referem que a diminuição do *BCL11A* leva ao aumento da expressão da *γ-globina*, porque tal como o *MYB* e tal como *KLF1*, é também um repressor desta globina.

Os resultados do gene *BGLT3* demonstram que o EMFCP aumenta a transcrição deste gene na concentração de 0,5 µg/mL e diminui a expressão quando as células são expostas a concentrações mais elevadas deste composto (50 e 100 µg/mL). Os dados

referentes à concentração de 0,5 µg/mL são parecidos com os obtidos para a HU. Além do mais, são concordantes com observações feitas por Ivaldi e colaboradores (16), que referem que a inibição deste gene diminui a expressão da  $\gamma$ -globina em células K562, uma vez que é um ativador da expressão desta globina.

Pela análise dos resultados da Quercetina, observa-se que esta diminui a transcrição dos genes silenciadores da  $\gamma$ -globina (*MYB*, *KLF1* e *BCL11A*) para ambas as concentrações e aumenta a transcrição do gene ativador da expressão da  $\gamma$ -globina (*BGLT3*). Os resultados para o *MYB* são semelhantes aos obtidos para a HU. Além disso, parecem ir de acordo com o que está descrito na literatura, que refere que os compostos bioativos da dieta, como é o caso dos flavonóides (incluindo a Quercetina) podem modular alguns microRNAs (miRNAs) (22), neste caso o miRNA 26b (78), que por sua vez inibe o *MYB* conduzindo assim à ativação da  $\gamma$ -globina (79). Já os resultados referentes aos genes *KLF1* e *BCL11A* são diferentes aos obtidos para os controles positivos respectivos. Em oposição, os dados obtidos para o *BGLT3* são semelhantes aos obtidos para a HU.

Os resultados do *KLF1* e do *BCL11A* mostram que estes atuam na mesma via de inibição da  $\gamma$ -globina. Estes resultados vão de acordo com resultados anteriores que mencionam que o *KLF1* é um ativador do *BCL11A* (6).

Evidências pré-clínicas e clínicas sugerem que as modificações epigenéticas mediadas por DNA metiltransferases (DNMTs) e desacetilases de histonas (HDACs) possam estar envolvidas na indução da HbF (6). Neste sentido no presente estudo foram analisados os padrões de expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*, envolvidos na metilação do DNA e os genes *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* envolvidos na desacetilação das histonas.

Em relação ao gene *DNMT1* verifica-se que todas as concentrações de EMFCP aumentam a transcrição deste gene, sendo semelhantes com os resultados obtidos para o controlo positivo. Já os genes referentes às DNA metiltransferases *de novo* (*DNMT3a* e *DNMT3b*) aumentam a sua transcrição nas células expostas a este composto. Os resultados para estes dois genes são idênticos com os obtidos para os controles positivos respectivos.

Ao analisar os resultados referentes aos genes *DNMT1* e *DNMT3a*, observa-se um aumento da expressão destes genes nas células expostas à Quercetina a 0,2 µM. Pelo contrário os resultados das células expostas a uma maior concentração deste composto

demonstram a inibição da expressão destes genes. Os resultados para a concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  em ambos os genes são similares com os respectivos resultados obtidos para a HU.

Relativamente ao gene *DNMT3b*, este apresenta um aumento da expressão após exposição das células à Quercetina a 0,2  $\mu\text{M}$  e uma diminuição após exposição das células à Quercetina a 20  $\mu\text{M}$ . Os resultados da Quercetina a 0,2  $\mu\text{M}$  são semelhantes aos obtidos no controlo positivo.

Estudos realizados por Sundaram e colaboradores (80), indicam que a quercetina atua, de maneira dose dependente, como inibidor competitivo interagindo com resíduos da subunidade catalítica das DNMTs e impedindo estas de ficarem ativas. Da mesma forma, esta inibição traduz-se na redução dos níveis dos transcritos da *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* (80). Os resultados obtidos no presente estudo para o gene *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* são discordantes com o estudo em cima mencionado, uma vez que para a concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  todos apresentam um aumento transcricional. No entanto, para a concentração de 20  $\mu\text{M}$  os resultados obtidos corroboram com o mesmo estudo. Isto pode ser devido ao facto de que os investigadores utilizam concentrações mais próximas às utilizadas no nosso estudo (entre 25 a 50  $\mu\text{M}$ ).

Em relação aos genes que codificam as HDACs nucleares, observa-se que as três concentrações do EMFCP aumentam a transcrição dos genes *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* e que as concentrações mais elevadas do EMFCP (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) diminuem a transcrição do gene *HDAC1*. Os resultados obtidos de todos os genes são semelhantes aos obtidos para os respetivos controlos positivos.

A Quercetina demonstra uma resposta idêntica ao EMFCP para o gene *HDAC8*, uma vez que aumenta a sua expressão. Por outro lado, ao analisar os resultados dos genes *HDAC2* e *HDAC3* observa-se que este composto inibe a transcrição destes genes em ambas as concentrações, o que é diferente dos respetivos resultados para a HU. Já em relação ao gene *HDAC1* as concentrações deste composto têm efeitos divergentes. Enquanto a Quercetina a 0,2  $\mu\text{M}$  aumenta a transcrição deste gene, o mesmo composto a 20  $\mu\text{M}$  diminui a sua transcrição.

A diminuição da transcrição dos genes *HDAC2* e *HDAC3* vai de acordo com resultados obtidos por Sundaram e colaboradores (80), que demonstram que a Quercetina reduz a atividade das HDACs nucleares levando à diminuição dos seus transcritos.

Adicionalmente, de acordo com resultados obtidos por Bradner e colaboradores (81), a inibição da *HDAC2* induz a expressão da  $\gamma$ -globina.

O desafio dos dias de hoje passa por desvendar os mecanismos por detrás dos compostos indutores da HbF. Neste sentido ao estudar potenciais intervenientes das vias de regulação da  $\gamma$ -globina pode-se prever de que forma é que estes são modulados pelos compostos indutores da HbF em estudo e supor uma eventual via de ação.

A HU é um conhecido indutor da HbF, sendo o único fármaco aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para a indução da HbF em pacientes com anemia falciforme (2). Embora o mecanismo por detrás da indução permaneça desconhecido, esta parece ativar a expressão da  $\gamma$ -globina ao ativar a via de resposta ao stress p38 MAPK (2).

Para além do mecanismo de ativação da expressão da  $\gamma$ -globina mencionado anteriormente existem outros, como é o caso da via NRF2/ARE que centra-se na existência do elemento de resposta antioxidante (ARE) no promotor no gene da  $\gamma$ -globina (35). A sequência ARE interage com fatores transcricionais, como o *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2) induzindo a defesa celular contra o stress oxidativo (2).

Os compostos bioativos da dieta influenciam a expressão génica através de alterações na estrutura da cromatina (modulação epigenética), RNAs não codificantes (ncRNAs), ativação de fatores de transcrição envolvidos em diversas vias de sinalização ou ligação a recetores nucleares (22).

No presente estudo foram analisados dois compostos naturais (EMFCP e Quercetina). Os resultados transcricionais demonstram que o EMFCP transcreve os genes *HBA* e *HBB*, podendo desta forma inibir a  $\gamma$ -globina. Por outro lado, a transcrição do gene *HBG1* nas células expostas ao EMFCP a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e a transcrição do gene *HBG2* nas células expostas a todas as concentrações do EMFCP, levam à expressão da HbF. Já a Quercetina a 20  $\mu\text{M}$  inibe o gene *HBA*, levando à expressão da HbF. Por outro lado, a inibição da expressão do gene *HBB* e a transcrição dos genes *HBG1* e *HBG2* por ambas as concentrações da Quercetina podem conduzir à transcrição da  $\gamma$ -globina.

Relativamente aos genes *MYB*, *KLF1* e *BCL11A* todas as concentrações do EMFCP transcrevem os dois primeiros genes e inibem o último. Os resultados do *MYB* e do *KLF1* levam à inibição da  $\gamma$ -globina, enquanto o resultado do *BCL11A* leva a ativação da mesma. Já o tratamento com Quercetina ao inibir os genes *MYB*, *KLF1* e *BCL11A*, pode levar à expressão da HbF.

No que se refere ao gene *BGLT3*, a transcrição deste gene nas células expostas ao EMFCP a 0,5 µg/mL e nas expostas a ambas as concentrações de Quercetina pode levar ao incremento da expressão da HbF, uma vez que é um ativador da expressão da  $\gamma$ -globina.

Em relação aos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*, estes são transcritos por todas as concentrações do EMFCP (para as quais há resultados) juntamente com a Quercetina a 0,2 µM. A sua função está descrita como moléculas que metilam o promotor da  $\gamma$ -globina, silenciando-o (6). Neste sentido, a transcrição observada destes três genes pelos compostos em estudo vai inibir a expressão da  $\gamma$ -globina. Por outro lado, o tratamento com Quercetina a 20 µM aparenta inibir a expressão destes mesmos genes, levando à eventual transcrição da  $\gamma$ -globina.

Em relação aos genes *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* todos são transcritos por todas as concentrações de EMFCP. As duas primeiras enzimas (*HDAC2* e *HDAC3*) são descritas na literatura como inibidoras da  $\gamma$ -globina (81) (82). Já a *HDAC8* aparenta ter ainda um papel desconhecido na regulação da HbF (83). Neste sentido, a transcrição dos genes *HDAC2* e *HDAC3* observadas nas células expostas ao EMFCP conduz à inibição da expressão da  $\gamma$ -globina. Por outro lado, o gene *HDAC1* é inibido nas células expostas às concentrações mais elevadas do EMFCP (50 e 100 µg/mL) e à Quercetina a 20 µM. A inibição deste gene induz a expressão da HbF, uma vez que, tal como o *HDAC2* e o *HDAC3*, é também um repressor do gene da  $\gamma$ -globina (81). Por outro lado, o tratamento com Quercetina em ambas a concentração inibe os genes *HDAC2* e *HDAC3* contribuindo também para a expressão da HbF.

Os resultados demonstram que os efeitos do EMFCP, especialmente da concentração de 0,5 µg/mL, aparentam ser semelhantes com os efeitos da HU, sugerindo a atuação na mesma via de sinalização. Por outro lado, os efeitos da Quercetina aparentam serem divergentes dos obtidos com o EMFCP e com a HU, sugerindo eventuais vias de sinalização diferentes. Esta possibilidade vai de encontro à hipótese proposta por Pabuprapap e colaboradores (35) que diz que a Quercetina pode induzir a expressão do gene da  $\gamma$ -globina ao sinalizá-lo através da via NRF2/ARE.

A possibilidade de o EMFCP atuar na mesma via em que a HU participa e o facto de que a Quercetina, embora siga vias diferentes, aparente inibir a transcrição de certos inibidores da  $\gamma$ -globina e aumentar a transcrição de genes ativadores da HbF, faz com que ambos os compostos sejam promissores para um futuro tratamento das  $\beta$ -hemoglobinopatias.



### 6.1 Conclusões:

Neste estudo, tentou-se analisar os efeitos de dois compostos naturais (extrato metanólico de folhas de *Carica papaya* L. (EMFCP) e Quercetina) no padrão de expressão de genes envolvidos na regulação transcricional dos genes *HBG1* e *HBG2* (*HBA*, *HBB*, *MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*) e de moduladores epigenéticos desses mesmos genes (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*).

Resumidamente, obtiveram-se os seguintes resultados no presente estudo:

- A proliferação das células, apenas é afetada quando expostas ao tratamento com Quercetina a 20  $\mu$ M.
- Os compostos parecem não apresentar evidências de citotoxicidade.
- Todas as concentrações do EMFCP afetam a expressão da hemoglobina fetal (HbF), contudo a concentração do EMFCP a 0,5  $\mu$ g/mL parece ser aquela que afeta mais a transcrição da HbF.
- Ambas as concentrações de Quercetina afetam a transcrição da  $\gamma$ -globina. No entanto a concentração da Quercetina a 20  $\mu$ M aparenta ter um maior efeito na expressão da HbF.

Em suma este estudo preliminar traz uma nova perspectiva sob compostos naturais como potenciais moduladores da  $\gamma$ -globina. Os resultados promissores de ambos os compostos no aumento da transcrição de genes ativadores da  $\gamma$ -globina e na inibição dos inibidores da mesma globina, abrem as portas para que se continue a avaliar o seu potencial numa futura terapia acessível e eficaz para o tratamento das  $\beta$ -hemoglobinopatias.

### 6.2 Estudos futuros:

Recentemente, vários estudos reportam o potencial terapêutico dos microRNAs (miRNAs) no tratamento das  $\beta$ -hemoglobinopatias, ao terem a capacidade de ligarem-se aos repressores da  $\gamma$ -globina, inibindo-os (6). Deste modo, num futuro estudo podem-se estudar os efeitos do EMFCP e da Quercetina ao nível da expressão génica dos miRNAs, e avaliar a expressão proteica dos genes estudados em células expostas a

estes compostos, com o intuito de entender de forma mais abrangente os mecanismos moleculares por detrás de cada um.

A utilização de outras concentrações e de outros tempos de exposição com um maior número de amostras poderá ser útil num estudo futuro para que se encontrem potenciais doses seguras e eficazes na reativação da  $\gamma$ -globina que permitam a continuação do estudo para células precursoras eritrocitárias humanas e daí, caso haja resultados promissores, serem utilizadas em ensaios clínicos.

Por último, também seria interessante analisar os vários componentes do EMFCP para descobrir qual/quais o/os componente/s que se traduzem nos efeitos reportados no presente estudo.

## Capítulo 7 - Referências Bibliográficas

---

1. Mussolino C, Strouboulis J. Recent Approaches for Manipulating Globin Gene Expression in Treating Hemoglobinopathies. *Front Genome Ed* [Internet]. 2021;3(August):1–9. Available from: doi: 10.3389/fgeed.2021.618111
2. 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* [Internet]. 2021;49(3):2359–73. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06977-8>
3. Zittersteijn HA, Hartevelde CL, Klaver-Flores S, Lankester AC, Hoeben RC, Staal FJT, et al. A Small Key for a Heavy Door: Genetic Therapies for the Treatment of Hemoglobinopathies. *Front Genome Ed* [Internet]. 2021;2. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.617780>
4. Barbarani G, Labeledz A, Stucchi S, Abbiati A, Ronchi AE. Physiological and Aberrant  $\gamma$ -Globin Transcription During Development. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021;9(April):1–10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640060>
5. Diepstraten ST, Hart AH. Modelling human haemoglobin switching. *Blood Rev* [Internet]. 2019;33:11–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.06.001>
6. Starlard-Davenport A, Fitzgerald A, Pace BS. Exploring epigenetic and microRNA approaches for  $\gamma$ -globin gene regulation. *Exp Biol Med* [Internet]. 2021;246(22):2347–57. Available from: <https://doi.org/10.1177/15353702211028195>
7. 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* [Internet]. 2020. p. 1–13. Available from: doi: 10.5772/intechopen.90762
8. Basak A, Sankaran VG. Regulation of the fetal hemoglobin silencing factor BCL11A. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2016;1368(1):25–30. Available from: doi: 10.1111/nyas.13024
9. Tallack MR, Perkins AC. Three fingers on the switch: Krüppel-like factor 1 regulation of  $\gamma$ -globin to  $\beta$ -globin gene switching. *Curr Opin Hematol* [Internet].

- 2013;20(3):193–200. Available from: doi: 10.1097/MOH.0b013e32835f59ba
10. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: New therapeutic opportunities. *Blood* [Internet]. 2011;117(15):3945–53. Available from: doi: 10.1182/blood-2010-11-316893
  11. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and  $\gamma$ - to  $\beta$ -globin gene switching. *Nat Genet* [Internet]. 2010;42(9):742–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.637>
  12. Masuda T, Wang X, Maeda M, Canver MC, Sher F, Funnell APW, et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. *Science* (80- ) [Internet]. 2016;351(6270):285–9. Available from: doi:10.1126/science.aad3312.
  13. Weber L, Frati G, Felix T, Hardouin G, Casini A, Wollenschlaeger C, et al. Editing a  $\gamma$ -globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype. *Sci Adv* [Internet]. 2020;6(7):1–15. Available from: doi: 10.1126/sciadv.aay9392
  14. Lohani N, Bhargava N, Munshi A, Ramalingam S. Pharmacological and molecular approaches for the treatment of  $\beta$ -hemoglobin disorders. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018;233(6):4563–77. Available from: doi: 10.1002/jcp.26292
  15. Jiang J, Best S, Menzel S, Silver N, Lai MI, Surdulescu GL, et al. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood* [Internet]. 2006;108(3):1077–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-01-008912>
  16. Ivaldi MS, Diaz LF, Chakalova L, Lee J, Krivega I, Dean A. Fetal  $\gamma$ -globin genes are regulated by the BGLT3 long noncoding RNA locus. *Blood* [Internet]. 2018;132(18):1963–73. Available from: doi: 10.1182/blood-2018-07-862003
  17. Blobel GA, Crossley M. Charting a noncoding gene for  $\gamma$ -globin activation. *Blood* [Internet]. 2018;132(18):1865–7. Available from: doi: 10.1182/blood-2018-09-873620
  18. Kumari A, Bhawal S, Kapila S, Yadav H, Kapila R. Health-promoting role of dietary bioactive compounds through epigenetic modulations: a novel prophylactic and therapeutic approach. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2020;62(3):619–39. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1825286>
  19. Fatima N, Baqri SSR, Bhattacharya A, Koney NKK, Husain K, Abbas A, et al. Role of Flavonoids as Epigenetic Modulators in Cancer Prevention and Therapy. *Front Genet*. 2021;12(November):1–17.

20. Russo GL, Ungaro P. Epigenetic Mechanisms of Quercetin and Other Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention. In: *Epigenetics of Cancer Prevention* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. p. 187–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00009-3>
21. Busch C, Burkard M, Leischner C, Lauer UM, Frank J, Venturelli S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2015;7(1):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-015-0095-z>
22. Mierziak J, Kostyn K, Boba A, Czemplik M, Kulma A, Wojtasik W. Influence of the bioactive diet components on the gene expression regulation. *Nutrients* [Internet]. 2021;13(11):1–33. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13113673>
23. Khan H, Belwal T, Efferth T, Farooqi AA, Sanches-Silva A, Vacca RA, et al. Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2021;61(10):1616–39. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1763910>
24. Lavelle D, Engel JD, Sauntharajah Y. Fetal Hemoglobin Induction by Epigenetic Drugs. *Semin Hematol* [Internet]. 2018;55(2):60–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.04.008>
25. Bouyahya A., Mechchate H., Oumeslakht L., Zeouk I., Aboulghras S., Balahbib A., et al. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. *Biomolecules* [Internet]. 2022;12(3):367. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom12030367>
26. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* [Internet]. 2012;7(10):1098–108. Available from: <https://doi.org/10.4161/epi.21975>
27. Akone SH, Ntie-Kang F, Stuhldreier F, Ewonkem MB, Noah AM, Mouelle SEM, et al. Natural Products Impacting DNA Methyltransferases and Histone Deacetylases. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020;11(August):1–26. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00992>
28. Carden MA, Little J. Emerging disease-modifying therapies for sickle cell disease. *Haematologica* [Internet]. 2019;104(9):1710–9. Available from: [doi: 10.3324/haematol.2018.207357](https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207357)
29. Venkatesan V, Srinivasan S, Babu P, Thangavel S. Manipulation of Developmental Gamma-Globin Gene Expression: an Approach for Healing

- Hemoglobinopathies. *Mol Cell Biol*. 2020;41(1).
30. Nurain IO, Bewaji CO, Johnson JS, Davenport RD, Zhang Y. Potential of Three Ethnomedicinal Plants as Antisickling Agents. *Mol Pharm* [Internet]. 2017;14(1):172–82. Available from: doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00767
  31. 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* [Internet]. 2020;28(2):735–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00348-7>
  32. Gardner R V. Sick cell disease: Advances in treatment. *Ochsner J* [Internet]. 2018;18(4):377–89. Available from: doi: 10.31486/toj.18.0076
  33. Ng NYH, Ko CH. Natural Remedies for the Treatment of Beta-Thalassemia and Sick Cell Anemia—Current Status and Perspectives in Fetal Hemoglobin Reactivation. *Int Sch Res Not* [Internet]. 2014;1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/123257>
  34. Barbarani G, Łabedz A, Ronchi AE.  $\beta$ -Hemoglobinopathies: The Test Bench for Genome Editing-Based Therapeutic Strategies. *Front Genome Ed* [Internet]. 2020;2(December):1–10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.571239>
  35. 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* [Internet]. 2019;28(10):1755–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-019-02412-7>
  36. Lh M, Cm T, El C, C N, Pace BS. Fetal Hemoglobin Induction to Treat  $\beta$ -Hemoglobinopathies: From Bench to Bedside. *Cent J Hematol Transfus* Cite this *J Hematol Transfus*. 2014;2(2):1–12.
  37. Yu L, Myers G, Engel JD. Small molecule therapeutics to treat the  $\beta$ -globinopathies. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2020;27(3):129–40. Available from: doi: 10.1097/MOH.0000000000000579
  38. Wang Y, Yu L, Engel JD, Singh SA. Epigenetic Activities in Erythroid Cell Gene Regulation Seminars in Hematology. *Semin Hematol* [Internet]. 2021;58(1):1–14. Available from: doi: 10.1053/j.seminhematol.2020.11.007.
  39. Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: Achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8(MAR):1–15. Available from: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00092>

40. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* [Internet]. 2016;21(5):1–18. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>
41. Robinson MM, Zhang X. *The World Medicines Situation 2011 Traditional Medicines : Global Situation , Issues and Challenges*. World Health Organization. 2011.
42. Mawalagedera SMUP, Callahan DL, Gaskett AC, Rønsted N, Symonds MRE. Combining Evolutionary Inference and Metabolomics to Identify Plants With Medicinal Potential. *Front Ecol Evol* [Internet]. 2019;7:1–11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00267>
43. Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites* [Internet]. 2019;9(11):1–13. Available from: <https://doi.org/10.3390/metabo9110258>
44. Septembre-Malaterre A, Boumendjel A, Seteyen A-LS, Boina C, Gasque P, Guiraud P, et al. Focus on the high therapeutic potentials of quercetin and its derivatives. *Phytomedicine Plus*. 2022;2(1):100220.
45. Torello CO, Alvarez MC, Olalla Saad ST. Polyphenolic flavonoid compound quercetin effects in the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Molecules* [Internet]. 2021;26(19). Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules26195781>
46. Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, Verma AK, Aloliqi A, Allemaillem KS, et al. Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways. *Molecules* [Internet]. 2021;26(5):1–38. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules26051315>
47. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20(13):1–19. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms20133177>
48. El-Saber Batiha G, Beshbishy AM, Ikram M, Mulla ZS, Abd El-Hack ME, Taha AE, et al. The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods* [Internet]. 2020;9(3). Available from: [doi:10.3390/foods9030374](https://doi.org/10.3390/foods9030374)
49. Islam MS, Quispe C, Hossain R, Islam MT, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, et al. Neuropharmacological Effects of Quercetin: A Literature-Based Review. *Front*

- Pharmacol [Internet]. 2021;12(June):1–16. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.665031>
50. Karunamoorthi K, Kim H-M, Jegajeevanram K, Xavier J, Vijayalakshmi J. Papaya: A gifted nutraceutical plant - a critical review of recent human health research. Tang [Humanitas Med [Internet]. 2014;4(1):2.1-2.17. Available from: doi:10.5667/tang.201
  51. Hariono M, Julianus J, Djunarko I, Hidayat I, Adelya L, Indayani F, et al. The future of carica papaya leaf extract as an herbal medicine product. *Molecules*. 2021;26(22).
  52. Vij T, Prashar Y. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. *Asian Pacific J Trop Dis* [Internet]. 2015;5(1):1–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60617-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60617-4)
  53. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. [cited 2022 Mar 30]. Available from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
  54. Kong YR, Jong YX, Balakrishnan M, Bok ZK, Weng JKK, Tay KC, et al. Beneficial role of carica papaya extracts and phytochemicals on oxidative stress and related diseases: A mini review. *Biology (Basel)* [Internet]. 2021;10(4):1–20. Available from: <https://doi.org/10.3390/biology10040287>
  55. Khor BKK, Chear NJY, Azizi J, Khaw KY. Chemical composition, antioxidant and cytoprotective potentials of carica papaya leaf extracts: A comparison of supercritical fluid and conventional extraction methods. *Molecules* [Internet]. 2021;26(5). Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules26051489>
  56. A Alli L, P Okoh M. Phyto-Medicine in Gene(s) Targeting Future Direction for Sickle Cell Disease Management. *Hered Genet* [Internet]. 2016;5(2). Available from: doi: 10.4172/2161-1041.1000169
  57. Lim XY, Chan JSW, Japri N, Lee JC, Tan TYC. *Carica papaya* L. Leaf: A Systematic Scoping Review on Biological Safety and Herb-Drug Interactions. *Evidence-based Complement Altern Med* [Internet]. 2021;2021. Available from: doi: 10.1155/2021/5511221
  58. Oyeleye OO, Ogundeji ST, Ola SI, Omitogun OG. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnol Mol Biol Rev* [Internet]. 2016;11(2):6–16. Available from: doi: 10.5897/BMBR2016.0261
  59. Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell culture, technology: Enhancing the culture of diagnosing human diseases. *J Clin Diagnostic Res* [Internet]. 2016;10(3):DE01–5. Available from: doi: 10.7860/JCDR/2016/15837.7460

60. Verma A, Verma M, Singh A. Animal tissue culture principles and applications [Internet]. 2020. 269–293 p. Available from: <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>
61. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In: Basic Science Methods for Clinical Researchers [Internet]. Elsevier Inc.; 2017. p. 151–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
62. Gambari R. The human erythroleukemia K562 cell culture system for identification of inducers of fetal hemoglobin. *Minerva Biotechnol.* 2003;15(2):123–8.
63. Phelan SA, Szabo E. Undergraduate lab series using the K562 human leukemia cell line: Model for cell growth, death, and differentiation in an advanced cell biology course. *Biochem Mol Biol Educ* [Internet]. 2019;47(3):263–71. Available from: DOI 10.1002/bmb.21222
64. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: A review. *Blood* [Internet]. 1980;56(3):344–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V56.3.344.344>
65. American Type Culture Collection (ATCC) [Internet]. [cited 2022 Mar 30]. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-243>
66. Sigma-Aldrich Co. LLC. Fundamental techniques in cell culture. Laboratory Handbook [Internet]. 3rd ed. Sigma Aldrich. 2016. 80 p. Available from: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf)
67. 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* [Internet]. 2020;8(4):2553–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.21533/pen.v8i4.1746>
68. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2019;7(147). Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>
69. Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2022 Feb 5]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/imaging-analysis-and-live-cell-imaging/cell-viability-and-proliferation>
70. Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT- qPCR. Portl Press Ltd [Internet]. 2020;0(June):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>

71. Jalali M, Zaborowska J, Jalali M. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR [Internet]. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc.; 2017. 1–18 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>
72. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. 2005;39(1):75–85. Available from: <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
73. Iarovaia O V., Kovina AP, Petrova N V., Razin S V., Ioudinkova ES, Vassetzky YS, et al. Genetic and Epigenetic Mechanisms of  $\beta$ -Globin Gene Switching. *Biochem* [Internet]. 2018;83(4):381–92. Available from: doi: 10.1134/S0006297918040090
74. Ribeiro E, Delgado M, Matos E, Santos R, Sousa D, Galante H, et al. Epigenetic and Transcriptional Modulator Potential of Epigallocatechin-3-gallate and Genistein on Fetal Hemoglobin Reactivators Genes. *Clin Complement Med Pharmacol* [Internet]. 2022;1–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccmp.2022.100034>
75. 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. *Evidence-based Complement Altern Med* [Internet]. 2014;2014. Available from: doi: 10.1155/2014/741470
76. 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* [Internet]. 2016;6(April 2015):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep24049>
77. Brisdelli F, Coccia C, Cinque B, Cifone MG, Bozzi A. Induction of apoptosis by quercetin: Different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2007;296(1–2):137–49. Available from: doi: 10.1007/s11010-006-9307-3
78. Wang D, Sun-Waterhouse D, Li F, Xin L, Li D. MicroRNAs as molecular targets of quercetin and its derivatives underlying their biological effects: A preclinical strategy. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019;59(14):2189–201. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1441123>
79. Habara AH, Shaikho EM, Steinberg MH. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: The Arab-Indian Haplotype and New Therapeutic Agents. *Am J Hematol* [Internet]. 2017;92(11):139–48. Available from: doi:10.1002/ajh.24872

80. Kedhari Sundaram M, Hussain A, Haque S, Raina R, Afroze N. Quercetin modifies 5'CpG promoter methylation and reactivates various tumor suppressor genes by modulating epigenetic marks in human cervical cancer cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019;120(10):18357–69. Available from: doi: 10.1002/jcb.29147
81. Bradner JE, Mak R, Tanguturi SK, Mazitschek R, Haggarty SJ, Ross K, et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(28):12617–22. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1006774107>
82. Mankidy R, Faller D V., Mabaera R, Lowrey CH, Boosalis MS, White GL, et al. Short-chain fatty acids induce  $\gamma$ -globin gene expression by displacement of a HDAC3-NCoR repressor complex. *Blood* [Internet]. 2006;108(9):3179–86. Available from: DOI 10.1182/blood-2005-12-010934.
83. Santos RSA. Uso de Epigallocatequina-3-galato e Genisteína como potenciais indutores epigenéticos da hemoglobina fetal. 2021.
84. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction : Methods , Principles and Application. *Int J Biomed Res* [Internet]. 2010;1(5):81–97. Available from: doi: 10.5772/intechopen.86491
85. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. DPCR: A technology review. *Sensors (Switzerland)* [Internet]. 2018;18(4):1–27. Available from: <https://doi.org/10.3390/s18041271>
86. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* [Internet]. 2009;55(4):611–22. Available from: doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
87. Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(5):1–27. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
88. Laboratories B-R. Real-Time PCR Applications Guide. 2006. 1–105 p.
89. Freitas FCP, Depintor TS, Agostini LT, Luna-Lucena D, Nunes FMF, Bitondi MMG, et al. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53544-0>

### Anexo I: 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 1000;
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 cm<sup>2</sup> (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 cm<sup>2</sup> (T-75) na estufa a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>;
9. Após 24 a 48 horas, verificar a confluência celular e realizar a mudança do meio.

## **Anexo II: 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 cm<sup>2</sup> (T-75) colocar 10 mL de meio novo;
8. Retirar do Falcon 100 µL para um *ependorf* 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 III: 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. Deixar a ponta da pipeta no *eppendorf*;
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:

- **Contagem de células viáveis (células/mL) =**

$$= \frac{\text{Número de células viáveis em cada quadrante}}{\text{Número de quadrantes onde se contaram as células viáveis}} * \text{Fator de diluição (2)} * 10^4 \#$$

# Sabendo que a câmara de Neubauer está dividida em 9 quadrados principais, cada um com 0,1 mm<sup>2</sup> de área e que a profundidade desta é de 0,1 mm, cada um dos quadrados onde se contam as células terá 0,1 mm<sup>3</sup> pelo que o fator de conversão para mL é de 10000 (ou 10<sup>4</sup>).

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

## Anexo IV: 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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Procedimento adaptado de:

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

## Capítulo 9 - Apêndices

### Apêndice I: Quantificação do RNA

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

Amostra	Concentração (ng/ $\mu$ L)	A260/A280	A260/A230
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 <sup>-</sup> A	412,486	2,038	1,752
C <sup>-</sup> B	397,621	2,043	1,872
C <sup>-</sup> 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 de síntese do cDNA

### 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 <i>random hexamers</i>	1
10 mM dNTP <i>mix</i> (10 mM <i>each</i> )	1
<i>Template RNA</i>	<i>up to 11</i>
<i>DEPC-treated water</i>	<i>to 13</i>

- 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 <i>Buffer</i>	4
100 mM DTT	1
<i>Ribonuclease Inhibitor</i>	1
<i>SuperScript™ IV Reverse Transcriptase</i> (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 obtenção de cDNA.

<b>Temperatura</b>	<b>Tempos</b>
<b>23°C</b>	10 minutos
<b>50°C</b>	10 minutos
<b>80°C</b>	10 minutos

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

### Princípio da técnica

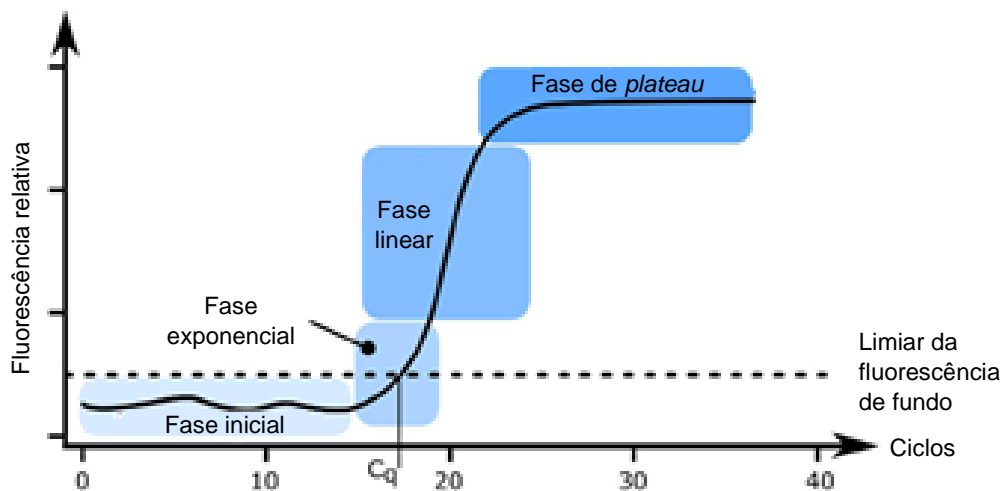
A técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) desenvolvida por Kary Mullis em 1984 é uma técnica rápida, barata e simples que é bastante utilizada nos laboratórios (84). Este processo, que consiste numa série de repetições de ciclos de temperaturas (20 a 40 vezes) (85), envolve vários componentes, designadamente, dNTPs (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados), uma enzima para a síntese de DNA, *primers* específicos (*forward* e *reverse*) e por último os fragmentos de cDNA ou DNA que se pretende amplificar (84).

Esta técnica envolve três etapas que ocorrem a diferentes temperaturas e designam-se por desnaturação (separação das cadeias), *annealing* (união dos *primers*) e extensão (síntese das novas cadeias) (71).

Até ao presente foram várias as técnicas desenvolvidas com base no PCR original (71). Uma dessas técnicas é designada de PCR quantitativo em tempo real que, de acordo com as *guidelines* MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), é representado pelo acrónimo qPCR (86).

O qPCR é descrito como uma técnica que permite quantificar a expressão de genes de interesse em tempo real de um largo espectro de amostras, tais como culturas celulares (87). Para tal é necessário, numa fase inicial, extrair o RNA que, após ser convertido em cDNA numa reação designada de transcrição reversa, é utilizado como molde na reação de qPCR (87). Esta técnica, quando comparada ao PCR tradicional, apresenta vantagens como: maior sensibilidade e precisão, redução do tempo de experiência e redução de possíveis contaminações uma vez que as corridas e os dados dessas são analisados num sistema fechado (88).

A reação de qPCR pode ser dividida em 4 fases (**Figura 9.1**): fase inicial- caracterizada por baixos níveis de fluorescência; fase exponencial- caracterizada pelo duplicar da quantidade do produto de PCR em cada ciclo; fase linear- caracterizada pela limitação dos componentes da reação; fase *plateau*- caracterizada pelo abrandamento da reação (85).

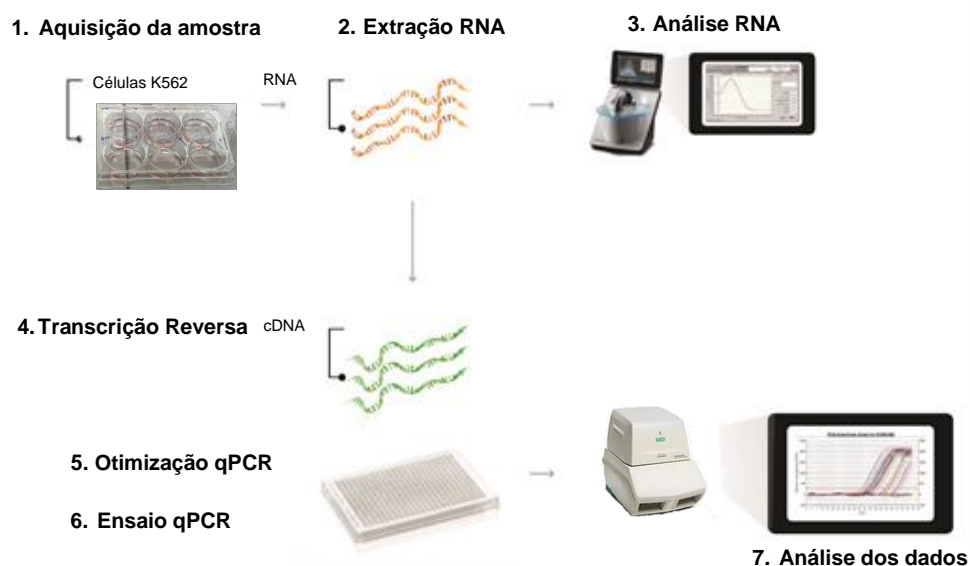


**Figura 9.1:** Fases da curva de amplificação do qPCR (inicial, exponencial, linear e *plateau*) da quantidade relativa de fluorescência emitida em função do número de ciclos.

O ciclo de quantificação ( $C_q$ ) representa o número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente ultrapasse a fluorescência de fundo, sendo inversamente proporcional à quantidade da amostra inicial. Adaptado de (85).

À medida que a reação ocorre, e com recurso a um sistema com um corante fluorescente e um termociclador com capacidade para detetar essa mesma fluorescência (87), é possível detetar e quantificar o DNA de interesse (71). A intensidade da fluorescência, emitida quando o corante se liga à cadeia dupla de DNA, aumenta de forma proporcional à quantidade do produto de PCR dentro dos tubos (71).

Esta técnica, corriqueira entre biólogos moleculares, apresenta-se como simples, eficiente e tendo um baixo custo (89), no entanto a qualidade dos resultados pode ser afetada pela forma como a experiência é desenhada (87). Como tal, é importante estabelecer um *workflow* (**Figura 9.2**) adequado à questão em estudo, de forma a prevenir potenciais problemas a nível da preparação da amostra, qualidade do RNA extraído, genes de referência e métodos de análise de dados (87).



**Figura 9.2:** Etapas do *workflow* do qPCR para este estudo.

As células K562 foram sujeitas a diversos tratamentos durante 24h. Após este período o RNA foi extraído e analisado quanto à sua concentração. O RNA foi posteriormente convertido em cDNA que foi utilizado como molde no ensaio do qPCR. Por fim com recurso a um *software* associado a um termociclador foi possível analisar os dados resultantes usando os métodos de análise adequados. Adaptado de (87).

A normalização dos dados é um passo crítico no *workflow* do qPCR (87). Existem dois métodos para normalizar os ensaios desta técnica: quantificação absoluta e quantificação relativa (71). A quantificação absoluta permite quantificar a concentração de amostras desconhecidas (70), já a quantificação relativa permite calcular a diferença relativa entre a expressão do gene de referência e a expressão do gene de interesse (70). Esta última análise depende do gene de referência, um fator crucial para uma quantificação precisa (70) e que funciona como controlo endógeno, cujo nível de expressão é constante em todas as amostras e cuja expressão não é afetada pelo tratamento da amostra (88).

#### Preparação da mistura de reação

- 1) Preparou-se a mistura conforme descrito na **Tabela 9.5**. Para cada amplificação dos diferentes genes, colocou-se na mistura de reação todos os componentes exceto o cDNA. Foi também utilizado um controlo positivo com água (NTC- *No Template Control*) de forma a validar os resultados.

**Tabela 9.5:** Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação.

Reagentes	Volume (µL)
<i>iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)</i>	10
<i>Primer Forward (200/300 nM)</i>	0,6
<i>Primer Reverse (200/300 nM)</i>	0,6
H <sub>2</sub> O	8,3
cDNA	0,5
<b>Volume FINAL</b>	<b>20</b>

**Nota:** O reagente *iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)* é uma solução comercial pronta a ser usada em ensaios de qPCR, que incorpora um corante fluorescente (SYBR Green), a enzima *iTaq DNA polymerase*, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>. Ao utilizar esta solução basta apenas adicionar, em cada reação, a cadeia molde de cDNA a amplificar e os *primers* específicos para o gene de interesse.

- 2) Após adicionar-se o volume correspondente da mistura de reação em cada *strip*, procedeu-se à adição do cDNA nos tubos de PCR correspondentes.
- 3) O volume de cada tubo de PCR foi dividido por 3 poços (triplicados) de uma placa de 96 poços. Esta, após estar preenchida de acordo com o desenho da experiência, 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.

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