

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Regulação epigenética dos genes da globina gama (HBG1 e HBG2).

Efeito de compostos naturais na estimulação da hemoglobina fetal

Vera Gomes Pinto

Orientador : Miguel Brito (ESTeSL)

Co-orientadora : Edna Ribeiro (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa 2021

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Regulação epigenética dos genes da globina gama (HBG1 e HBG2).

Efeito de compostos naturais na estimulação da hemoglobina fetal

Vera Gomes Pinto

Orientador : Miguel Brito (ESTeSL)

Co-orientadora : Edna Ribeiro (ESTeSL)

Júri

Elsa Rodrigues

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa 2021



Mestrado em
Tecnologias
Moleculares
em Saúde

**Regulação epigenética dos genes da globina gama (HBG1 e HBG2).
Efeito de compostos naturais na estimulação da hemoglobina fetal**

Vera
Pinto

2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Miguel Brito e à Professora Edna Ribeiro pelo voto de confiança e pela oportunidade de participar neste estudo.

Quero também agradecer às minhas colegas de laboratório Mariana Delgadinho, Catarina Ginete e Raquel Santos sem as quais o meu trabalho não seria possível.

Não poderia também deixar de agradecer à minha família, em especial aos meus avós pelo apoio incondicional e monetário que me permitiram sempre estudar e estar cada vez mais perto de atingir os meus objetivos e seguir os meus sonhos. Um amor e carinho imensurável.

À minha mãe pela compreensão quando não pude estar tão presente, pelo carinho e pelas palavras de motivação que não faltaram ao longo deste caminho. Por ser o alento à minha alma irrequieta. A melhor mãe é a minha.

À minha irmã Rita, pelas chamadas a fazer companhia quando saía do laboratório, pelas gargalhadas e piadas que me faziam sempre esquecer os problemas e adversidades. A irmã mais nova que cuida da irmã mais velha sem se aperceber. Adoro-te.

Ao Oleksandr Zaleskyy (Sacha), por ter sido uma das presenças mais importantes na minha vida este ano e por isso fazer sentido estar a agradecer pelo ombro amigo sempre disponível, pelas mensagens de quilómetros repletas de compreensão, por partilhar do meu humor e sermos a melhor dupla de irmãos pastilhados.

Um obrigado especial ao meu padrinho e melhor amigo David, pela ajuda que me deu durante estes anos, a nível pessoal e pela amizade, que sem ele este ano seria muito diferente e não conseguiria imaginá-lo sem as chamadas e desabafos de intermináveis horas. Um dos poucos alicerces que tenho para a minha saúde mental, das pessoas mais *awesome*, que tenho a sorte de ter na minha vida.

Em último, por merecer um lugar de destaque, quero agradecer à **Susana (Su)**. Obrigado pelas inúmeras conversas e paciência, por nunca me deixares desistir, por acreditares sempre mais em mim que eu mesma, pelas extensas horas a escrevermos na cozinha, as quais acabavam sempre em conversas profundas que me faziam questionar se não somos a mesma pessoa, pela amizade, irmandade e apoio dado durante estes 5 últimos anos inesquecíveis. Se há coisas que fazem sentido, sei que ter-te para sempre na minha vida é uma delas. A minha pessoa.

Resumo

As β -hemoglobinopatias são as doenças genéticas recessivas mais impactantes pelo mundo e os tratamentos disponíveis são dispendiosos com efeitos secundários graves associados, um dos mecanismos para a terapêutica é a reativação da hemoglobina fetal através de mecanismos regulação epigenética.

São necessários novos agentes, com capacidade de induzir hemoglobina fetal, com baixa citotoxicidade, que controlem a expressão genética sem alterar o material genético e que sejam de fácil acesso para os países em desenvolvimento, como compostos naturais.

Neste projeto avaliou-se os efeitos induzidos por dois compostos naturais, numa linhagem de células precursoras eritroides assim como numa linhagem celular imortalizada para avaliar os efeitos nos genes reguladores epigenéticos.

As linhagens celulares foram expostas por 24, 48 e 72 horas à concentração 100 ng/ml de genisteína, epigallocatequina-3-galato e genisteína mais epigallocatequina-3-galato que reproduzem a exposição celular *in vivo* após suplementação, e 25 μ g/ml de HU foi utilizada como controlo positivo. A viabilidade celular foi medida para os precursores eritróides e avaliou-se os efeitos transcricionais dos compostos nos genes *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* nas células imortalizadas.

Os resultados demonstraram que os compostos afetam a viabilidade das células precursoras eritroides sem se concluir sobre a citotoxicidade, e que os compostos afetam a regulação dos genes epigenéticos, causando a diminuição da expressão de *DNMT1*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*.

Este estudo retrata pela primeira vez o potencial desses compostos isoladamente ou em conjunto para a regulação epigenética numa linhagem celular de precursores eritroides, como promissores reguladores epigenéticos.

Palavras-chave: Genisteína; Epigallocatequina-3-galato; precursores eritroides; *DNMTs*; *HDACs*

Abstract

β -hemoglobinopathies are the most impactful recessive genetic diseases in the world and despite this well-known fact, the treatments available are expensive with

serious side effects, one of the strategies for therapy is reactivating fetal hemoglobin through epigenetic regulation mechanisms.

It is crucial to investigate new agents, with fetal hemoglobin-inducing capacity, that demonstrate low cytotoxicity, control genetic expression without altering genetic material and are easily accessible to developing countries, such as natural compounds.

This project evaluated the effects induced by two natural compounds, in a lineage of erythroid precursor cells as well as in an immortalized cell line to evaluate the effects on epigenetic regulatory genes related to fetal hemoglobin.

Both cell lines were exposed for 24, 48 and 72 hours at concentration of 100 ng/ml of genistein, epigallocatechin-3-gallate and genistein plus epigallocatechin-3-gallate, that reproduce cell exposure *in vivo* after supplementation, and 25 µg/ml of HU was used as positive control. Cell viability was measured for the erythroid precursor cell lineage and the transcriptional effects of the compounds in the *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* and *HDAC8* genes was evaluated in the immortalized cell line.

The results showed that the compounds affect the viability of erythrocyte precursor cells without concluding about cytotoxicity levels, and that the natural compounds affect the epigenetic regulation, decreasing the expression of *DNMT1*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*.

This was a study that portrayed for the first time the potential of these compounds alone or together, for epigenetic regulation in a cell line of erythroid precursor cells, as promising epigenetic regulators.

Keywords: Genistein; Epigallocatechin-3-gallate; Erythroid precursors; *DNMTs*; *HDACs*

Índice

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA	I
Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	III
Índice	V
Índice de Tabelas	VII
Índice de Figuras	VII
Índice de Gráficos.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento teórico	2
1.1.1. Patofisiologia da hemoglobina.....	2
1.1.2. Contexto epidemiológico	4
1.1.3. <i>Switch</i> da hemoglobina.....	5
1.1.4. Persistência da hemoglobina fetal	7
1.1.5. Epigenética	9
1.1.6. Regulação epigenética	12
1.1.7. Alvos terapêuticos	13
1.1.8. Antioxidantes e quelatação	16
1.1.9. Polifenóis do chá	17
1.1.10. Genisteína.....	20
1.1.11. EGCG e Genisteína	22
2. Objetivos	23
3. Materiais e métodos.....	25
3.1. Linhas celulares	25
3.2. Cultura celular e reagentes	27
3.3. Compostos e exposição	28
3.4. Ensaio de viabilidade celular	29
3.5. Extração de RNA total	29
3.6. Quantificação de RNA total e conversão em cDNA.....	31
3.7. PCR quantitativo em tempo real	32
3.8. Métodos estatísticos	35
4. Resultados.....	35
4.1. Primeira exposição dos precursores eritróides.....	35

4.2.	Segunda exposição dos precursores eritróides.....	36
4.3.	Terceira exposição dos precursores eritróides.....	37
4.4.	Análise Estatística das contagens.....	39
4.5.	Resultados de qRT-PCR da Epigenética das linhagem K562.....	44
4.5.1.	Gene <i>DNMT1</i>	44
4.5.2.	Gene <i>DNMT3a</i>	45
4.5.3.	Gene <i>DNMT3b</i>	46
4.5.4.	Gene <i>HDAC1</i>	47
4.5.5.	Gene <i>HDAC2</i>	48
4.5.6.	Gene <i>HDAC3</i>	49
4.5.7.	Gene <i>HDAC8</i>	50
5.	Discussão.....	51
5.1.	Precursos eritróides.....	51
5.2.	Influência dos compostos naturais nos reguladores epigenéticos.....	53
6.	Conclusão.....	57
7.	Perspetivas futuras.....	59
	Referências bibliográficas.....	59

Índice de Tabelas

Tabela 3-1 Primers específicos para qRT-PCR	34
Tabela 4-1 Resultados das contagens para o primeiro ensaio em células eritróides	36
Tabela 4-2 Resultados das contagens para o segundo ensaio em Células Eritróides.....	36
Tabela 4-3 Resultados das contagens para o terceiro ensaio em Células Eritróides.....	38
Tabela 4-4 Teste de Shapiro dador 1	39
Tabela 4-5 Teste de Shapiro dador 2	39
Tabela 4-6 Teste de Bartlett dador 1	39
Tabela 4-7 Teste de Bartlett dador 2	40
Tabela 4-8 Teste ANOVA dador 1	40
Tabela 4-9 Teste ANOVA dador 2	40
Tabela 4-10 Teste de Tukey dador 1	41
Tabela 4-11 Teste de Tukey dador 2	42
Tabela 4-12 Teste de Levene dador 1	42
Tabela 4-13 Teste de Levene dador 2	42
Tabela 4-14 Teste de Kruskal-Wallis dador 1	43
Tabela 4-15 Teste de Kruskal-Wallis dador 2	43
Tabela 4-16 Teste emparelhado de Wilcoxon	43
Tabela 0-1 Reagentes e volumes do Protocolo Básico 1	69
Tabela 0-2 Reagentes e Volumes do Protocolo Básico 2	70
Tabela 0-3 Quantificação de RNA	74

Índice de Figuras

Figure 1-1 Danos e disfunção da membrana do eritrócito causada pela HbS.	3
Figure 1-2 Maturação das hemácias e switch dos genes das HbS.	6
Figure 1-3 Nutrigenómica e epigenética.....	12
Figure 1-4 Mecanismo de ação EGCG.	18
Figure 1-5 Mecanismo de ação da genisteína.	21
Figure 3-1 Células eritróides captadas com um microscópio invertido de contraste de fase, em ampliação x 20 após a primeira cultura.	26
Figure 3-2 Imagem de microscópio de contraste de fase de células K562 ampliação x400 (adaptado de Xu et al., 2015)	27
Figure 0-1 Contagem de células de acordo com o método tradicional	72
Figure 0-2 Quadrantes para contagem	73

Índice de Gráficos

Gráfico 4-I Análise qRT-PCR de DNMT1	44
Gráfico 4-II Análise qRT-PCR de DNMT3a.....	45
Gráfico 4-III Análise qRT-PCR para DNMT3b.....	46
Gráfico 4-IV Análise qRT-PCR para HDAC1	47
Gráfico 4-V Análise qRT-PCR para HDAC2.....	48
Gráfico 4-VI Análise qRT-PCR para HDAC3.....	49
Gráfico 4-VII Análise qRT-PCR para HDAC8.....	50

Lista de abreviaturas

ARC - Contagem absoluta de reticulócitos

BCL11A - Gene que codifica a proteína BCL11A

BSA - Albumina Sérica Bovina

EC -Epicatequina

EGC - Epigallocatequina

EGCG - Epigallocatequina galato

EPO- Eritropoietina humana

FBS – Soro Bovino Fetal

GN - Genisteína

H₂O₂- Peróxido de hidrogénio

HATs - Acetilases de histonas

HbF - Hemoglobina fetal

HbS - Hemoglobina S

HDACs- Deacetilases de histonas

HPFH - Persistência da hemoglobina fetal

HU - Hidroxiureia

KDM1A/LSD1- Desmetilase 1A de lisina

KLF1 - Fator de transcrição Krüppel-Like

LCR - Região de controlo de *locus*

lncRNA- RNA não codificante de cadeia longa ou *long non coding RNA*

MBD - Domínio de Ligação Metil

miRNA- RNA não codificante de cadeia curta ou *micro RNA*

NO - Óxido Nítrico

NuRD- Complexo de remodelação da cromatina

P. falciparum - *Plasmodium falciparum*

PBS – Tampão Fosfato Salino

ROS - Espécies reativas de oxigénio

RTC- Reticulócitos

SCD – Anemia das células falciformes

SCF - Fator recombinante de células estaminais humanas

DAMP - Moléculas de padrão molecular associadas ao dano

NOS - Sintase de NO

TLR - Recetor do tipo Toll

$\zeta 2\epsilon 2$ - Hb Gower 1

$\alpha 2\epsilon 2$ - Hb Gower 2

$\zeta 2\gamma 2$ - Hb Portland

$\psi\beta$ - Genes delta e beta

PRMT5 - Proteína arginina metiltransferase 5

EHMT2/G9a - Politransferase de histona e quesina 2

CHD4 - Proteína de ligação ao cromodomínio helicase DNA 4

CpG - Citosina seguida de uma guanina na mesma cadeia de DNA, ligadas por um fosfato

cGMP - Monofosfato de guanosina cíclica

DNMTs - DNA metiltransferases

MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos

JAK/STAT - Via de sinalização Janus/transdutores de sinais

H2AX- Histona da família H2A

PI3K/AKT - Proteína cinase B

FDA - Food and Drug Administration

K-Cl - Co-transporte cloro-potássio

AP-1 - Proteína ativadora 1

DNA - Ácido desoxirribonucleico

PTEN - Homólogo da tensina e fosfatase

CYCD - Proteína Cinase dependente da ciclina

FOXO3A - Gene da família forkhead

SIRT1 - Gene sirtuina 1A

H3-K9 - Histona acetilada no nono resíduo de lisina da proteína histona H3

RT - Transcriptase reversa

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

Ct - Threshold do ciclo

ANOVA - Análise unidirecional da variação

GM-CSF - Factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos

IL3 - Interleucina 3

SAM - S-Adenossimetionina

1. Introdução

A hemoglobina é um tetrâmero que contém duas cadeias diferentes de polipéptidos, as cadeias alfa e beta. As cadeias alfa globina são codificadas por genes com o mesmo nome, que estão normalmente duplicados e localizados na região telemérica no braço curto do cromossoma 16 (Cui & Engel, 2017; Perrine & Faller, 1993). O comprimento do aglomerado de genes alfa globina é de 26 kB e inclui o gene embrionário zeta (ζ), o gene alfa1 adulto e os genes alfa2 (Kato et al., 2018; Kukreja, Tandon, Mishra, & Tiwari, 2013). Os genes globina que codificam as cadeias beta globinas estão localizados no cromossoma 11 e contêm genes embrionários, fetais ($G\gamma$, $A\gamma$), e genes adultos (δ e β) (Cui & Engel, 2017; Harju-Baker, Costa, Fedosyuk, Neades, & Peterson, 2008; Štefková et al., 2019). A combinação de diferentes cadeias de globina resulta na formação de uma molécula de hemoglobina funcional (Kukreja et al., 2013; Sankaran, Xu, & Orkin, 2010). A hemoglobina fetal (HbF) têm uma maior afinidade para com o oxigénio, em comparação com a hemoglobina adulta (Frenette & Atweh, 2007; Keefer et al., 2006; Wienert, Martyn, Funnell, Quinlan, & Crossley, 2018).

As diferenças na afinidade do oxigénio entre o sangue embrionário e adulto descobertas no início do século XX, enquanto a primeira evidência física de que a hemoglobina embrionária difere da adulta foi obtida na década de 1930. Os interruptores (*switch*) na hemoglobina durante o desenvolvimento de seres humanos e vários animais foram caracterizados em detalhe na década de 1950 (Allen, Wyman, & Smith, 1953), com a introdução de métodos de eletroforese simples para análise da hemoglobina. Nas décadas de 1950 e 1960, foram caracterizadas várias mutações que resultam na continuação da hemoglobina fetal no adulto (persistência hereditária da hemoglobina fetal).

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia qualitativa, porque quando existe o *switch* de hemoglobinas (das fetais para adultas) dá-se origem a uma variante da hemoglobina (HbS), associada a mutações no gene *HBB*, resultante de mutações pontuais que alteram o sexto aminoácido na cadeia β -hemoglobina de ácido glutâmico para valina (Glu6Val) (Feriotto et al., 2018; Field & Nathan, 2014; Orisakwe, Amadi, & Frazzoli, 2020; Perrine & Faller, 1993). Tal mutação acaba por produzir uma hemoglobina com alterações estruturais que promove a polimerização em longas fibrilhas, criando a forma de foice característica associada à anemia falciforme. Estes eritrócitos são desidratados, rígidos e muito mais suscetíveis à hemólise (Kato et al., 2018), tendendo a ocluir a micro vasculatura, levando a uma possível isquemia e outras consequências

típicas associadas a esta patologia (Field & Nathan, 2014; Harju-Baker et al., 2008; Sauntharajah, Lavelle, & DeSimone, 2004). Os doentes com anemia falciforme (SCD) têm 2 tipos de eritrócitos: células F com maior tempo de semivida, que contêm tanto hemoglobina com a alteração falciforme (HbS) como hemoglobina fetal (HbF) e células F com menor tempo de semivida que são constituídas por HbS mas não tem HbF em níveis detetáveis (Cui & Engel, 2017; Franco et al., 2006; Sauntharajah et al., 2004).

Esta doença caracteriza-se pela presença de anemia hemolítica crónica, eventos vaso-oclusivos intermitentes, isquemia do tecido (que conduz à dor aguda e crónica), acidente vascular cerebral isquémico e hemorrágico, também se associando a morbilidades crónicas como a doença cerebrovascular, hipertensão pulmonar, osteonecrose, nefropatia, e falência de órgãos. Em crianças, existe um estado inflamatório crónico característico diagnosticado com recurso a análise da proteína C-reativa, um marcador de inflamação e de crises vaso-oclusivas (Orisakwe et al., 2020).

1.1. Enquadramento teórico

1.1.1. Patofisiologia da hemoglobina

A investigação sobre a alteração da hemoglobina baseou-se essencialmente na descrição dos fenótipos da hemoglobina. No entanto, o estudo dos mecanismos de patogénese foi iniciado na década de 1970 com a introdução de culturas hematopoiéticas (Papayannopoulou, Brice, & Stamatoyannopoulos, 1976) de células e métodos de recombinação DNA na investigação deste fenómeno (Stamatoyannopoulos, 2010).

Os danos e a disfunção da membrana do eritrócito (Figure 1-1) causada pela HbS polimerizada, conduzem a um processo designado por hemólise, no qual ocorre o rompimento da membrana das hemácias e o conseqüente lançamento no meio de hemoglobina e outras substâncias.

As proteínas da membrana oxidada possuem antígenos que se ligam aos anticorpos existentes, e as membranas expõem fosfatidilserina, o que promove a fagocitose dos eritrócitos por macrófagos, processo comumente designado por hemólise extracelular. A hemólise intravascular resulta num processo de libertação do conteúdo dos eritrócitos no plasma, através dos *scavengers* de óxido nítrico (NO) (Kato et al., 2018). A membrana falciforme tem uma permeabilidade de iões anormalmente elevada que induz a desidratação das hemácias, principalmente, através do efluxo de potássio (K⁺) ativado por cálcio (Ca²⁺) e cotransporte de potássio-cloro (K-Cl) (Ohnishi, Ohnishi, & Ogunmola, 2001). A desidratação provoca um aumento da densidade citoplasmática e forma o que chamamos de "células densas". Nas células densas, a concentração de hemoglobina aumenta e, assim, promove a polimerização da hemoglobina e a falciformação das

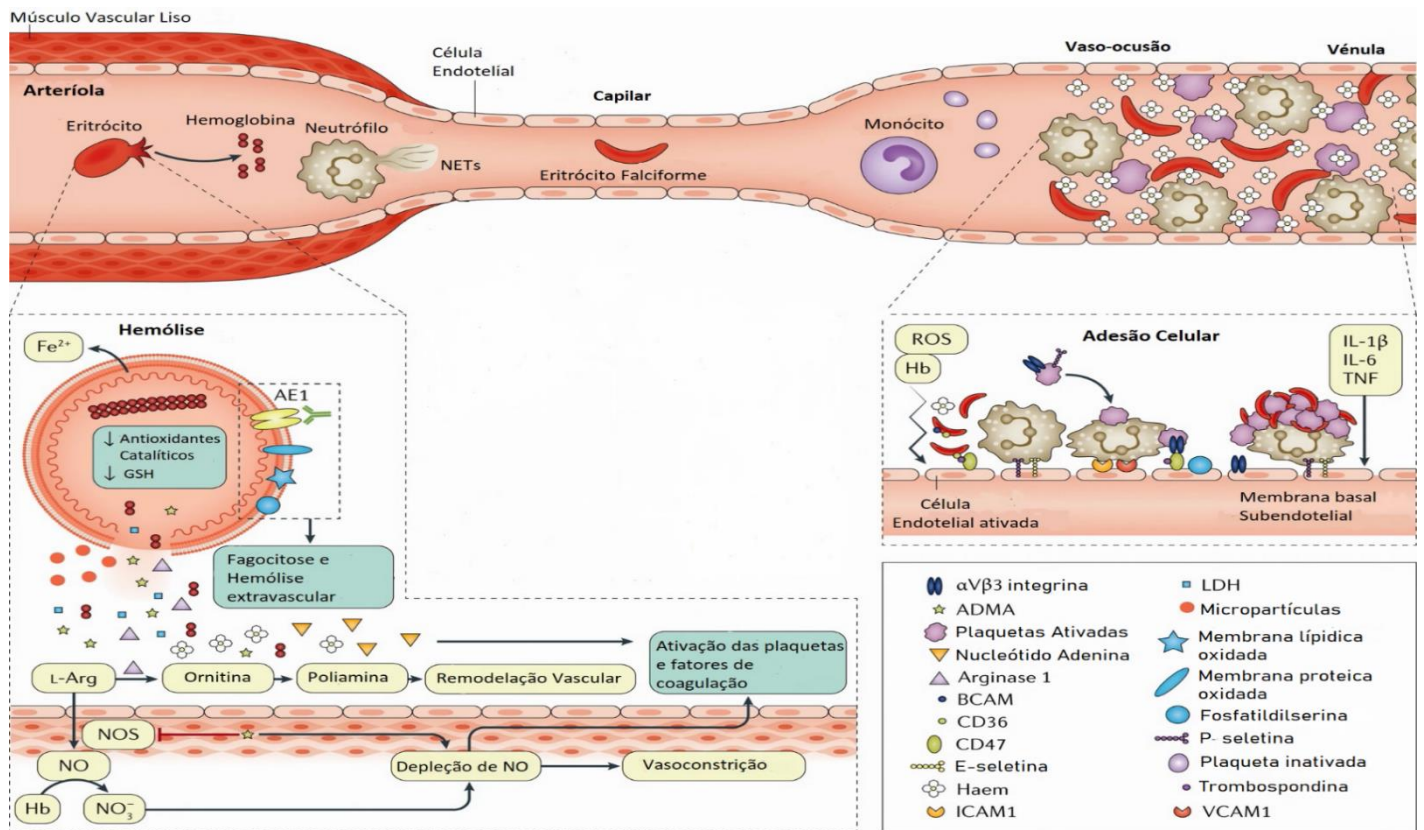


Figure 1-1 Danos e disfunção da membrana do eritrócito causada pela HbS.

As proteínas da membrana oxidada revelam antígenos que se ligam aos anticorpos existentes e as membranas expõem fosfatidilserina promovendo a fagocitose dos eritrócitos por macrófagos - hemólise extracelular. A hemólise intravascular promove a libertação do conteúdo dos eritrócitos no plasma. O NO dos *scavengers* esgota o substrato L-arginina de NO sintase (NOS) e a dimetilarginina assimétrica (ADMA) inibe a NOS. As ROS esgotam ainda mais o NO, levando à vasoconstrição e à remodelação vascular, especialmente no pulmão. Os nucleótidos de adenina e a deficiência em NO promovem a ativação de proteínas de coagulação sanguínea. As moléculas de padrão molecular associadas ao dano (DAMP) ativam o sistema imune inato. O TLR4 e TLR2 ativam monócitos e macrófagos para libertar citocinas inflamatórias, que promovem um estado inflamatório e ativação de células endoteliais. A ativação TLR4 nas plaquetas promove a sua adesão aos neutrófilos, que por sua vez libertam DNA para formar NETs. As células sanguíneas circulantes aderem entre si e ao endotélio ativado, contribuindo e potencialmente até iniciando a vaso-occlusão. Em vénulas pós-capilares, as células endoteliais ativadas que expressam P-seletina e E-seletina podem ativar neutrófilos e o seu movimento. As plaquetas ativadas e os eritrócitos em foice podem aderir a neutrófilos circulantes ou ligados ao endotélio e formar agregados. Os eritrócitos falciformes também podem ligar-se diretamente ao endotélio ativado. AE1, proteína de transporte de aniões da banda 3 (Adaptado de G. J. Kato et al., 2018).

hemácias, o que agrava os danos membranares que deram início ao processo, estamos portanto na presença de um ciclo (Franco et al., 2006; Ohnishi et al., 2001).

1.1.2. Contexto epidemiológico

O número de bebês nascidos com anemia falciforme em todo o mundo deverá aumentar um terço em 2050 (Biswas, 2013; Sauntharajah et al., 2004). A nível regional, a África Subsariana foi responsável por 79% dos recém-nascidos com anemia falciforme em 2010, proporção que pode subir para 88% em 2050 (Biswas, 2013; Sauntharajah et al., 2004). Em todo o mundo, mais de 1% dos casais estão em risco de terem descendência que sofre de doenças relacionadas com malformação das hemoglobinas, a maioria tem pelo menos uma criança afetada, e os casos mais graves morrem na primeira infância. Embora a taxa de mortalidade na África Ocidental em crianças com menos de 5 anos seja de 18,4%, a taxa é de 16,5% para as crianças nascidas em casais que não estão em risco, comparativamente a 40% para as crianças nascidas em casais que estão em risco (Modell & Darlison, 2008).

A distribuição geográfica do alelo βS é essencialmente impulsionada por dois fatores: a distribuição endémica da malária e os movimentos populacionais (Kato et al., 2018). A sobreposição entre a distribuição geográfica do alelo β e a distribuição endémica da malária na África Subsariana levou na década de 1950 à hipótese de que indivíduos com HbAS poderiam ser protegidos contra a malária provocada por *Plasmodium falciparum*. Existem agora evidências claras de que o HbAS fornece uma proteção notável contra a malária grave de *P. falciparum* (na verdade, os indivíduos com HbAS são 90% menos propensos a experimentar malária grave do que indivíduos com apenas Hb normal), o que explica as altas frequências do alelo βS observado em toda a África Subsariana e partes do Mediterrâneo, Médio Oriente e Índia (Kato et al., 2018; Ware et al., 2002). Os movimentos populacionais, incluindo o tráfico de escravos nos séculos XVI, XVII e XVIII, conduziram a uma distribuição ampla do alelo βS , particularmente na América do Norte e na Europa Ocidental. O mapeamento detalhado da frequência do alelo βS salientou que heterogeneidades geográficas de distúrbios de Hb herdados podem ocorrer em curtas distâncias (Kato et al., 2018). Por exemplo, estudos de micro mapeamento realizados no Sri Lanka (De Silva et al., 2000) sugerem que, mesmo nesta população insular relativamente pequena, as frequências de β talassémia e hemoglobina E variam bastante em diferentes regiões. As frequências muito altas destes genes podem ser devido à proteção concedida pela heterozigotia contra a malária (Weatherall, 2010).

Os mapas das áreas da distribuição de alta transmissão da malária indicam uma heterogeneidade considerável na sua distribuição. Por exemplo, mapas deste tipo

produzidos no Sri Lanka antes dos programas de erradicação da malária terem sido implementados, mostram uma correlação entre a frequência de β talassémia e hemoglobina E em distâncias geográficas consideravelmente pequenas (De Silva et al., 2000; Weatherall, 2010). Apesar de existirem outros fatores que possam contribuir para tal, como a deriva genética e os efeitos de fundadores, assim como uma alta prevalência de casamentos consanguíneos, parece provável que a distribuição heterogênea da malária, possa ser um fator importante na determinação da distribuição regional da frequência das doenças de hemoglobinas nas populações tropicais, uma conclusão que é compatível com alguns dos primeiros estudos populacionais da β talassémia, que remontam ao ano de 1940 (Weatherall, 2010).

1.1.3. *Switch* da hemoglobina

Durante a síntese das globinas humanas ocorrem duas comutações ou *switches* essenciais: a passagem da hemoglobina embrionária para a hemoglobina fetal (Hb F), por volta das 6 semanas de gestação e a troca da hemoglobina fetal pela hemoglobina do adulto, após o parto (Cui & Engel, 2017). Durante o desenvolvimento eritróide humano há uma mudança sequencial da expressão do gene embrionário ϵ -globina para o gene γ -globina fetal no útero e, pós-parto, o gene γ -globina é silenciado à medida que o gene β -globina se torna predominantemente expresso (Ginder, 2015). Mais especificamente, a linhagem eritróide primitiva origina-se no saco vitelino extraembrionário, correspondendo às primeiras células com hemoglobina, e sofre maturação final na corrente sanguínea, fígado fetal e outros órgãos reticuloendoteliais. Esta população é transitória e substituída pela linhagem definitiva que gera eritrócitos anucleados mais pequenos que desempenham o papel predominante no transporte de oxigénio ao longo da gestação e desenvolvimento pós-natal.

O *switch* da hemoglobina fetal começa a ocorrer a partir dos genes *HBG1* e *HBG2* (γ -globina) para o gene *HBB* adulto (β -globina) (**Figure 1-2**) (Vahid, Zand, Nosrat-Mirshekarlou, Najafi, & Hekmatdoost, 2015). Estas alterações estruturais são normalmente concluídas durante a infância e duram até aproximadamente 6 meses de idade (Cui & Engel, 2017). Os adultos saudáveis, por exemplo, continuam a expressar um baixo nível de HbF (Bianchi, Zuccato, Lampronti, Borgatti, & Gambari, 2009), que é concentrado em grande parte numa pequena percentagem de eritrócitos referidos como células F (Keefer et al., 2006; Sankaran et al., 2010; Sauntharajah et al., 2004). A região de controlo de *locus* (LCR) foi identificada a montante do *loci* β -globina, como essencial para a expressão de alto nível destes genes (Ginder, 2015; Sankaran et al., 2010). Os mecanismos subjacentes à indução farmacológica de HbF ainda não são

claros, sendo complexos e suscetíveis do envolvimento de várias vias, incluindo a alteração da estrutura da cromatina para aumentar a acessibilidade do fator de transcrição aos promotores dos genes das globinas de interesse, tais como a inibição da atividade de desacetilases de histonas (Theodorou et al., 2020); a hipometilação dos promotores dos genes da hemoglobina fetal e sua ativação transcricional; e a aceleração da diferenciação das células eritróides (Quek & Thein, 2007). Vários estudos confirmam que a mudança do desenvolvimento do *HBG* para o gene β adulto (*HBB*) é

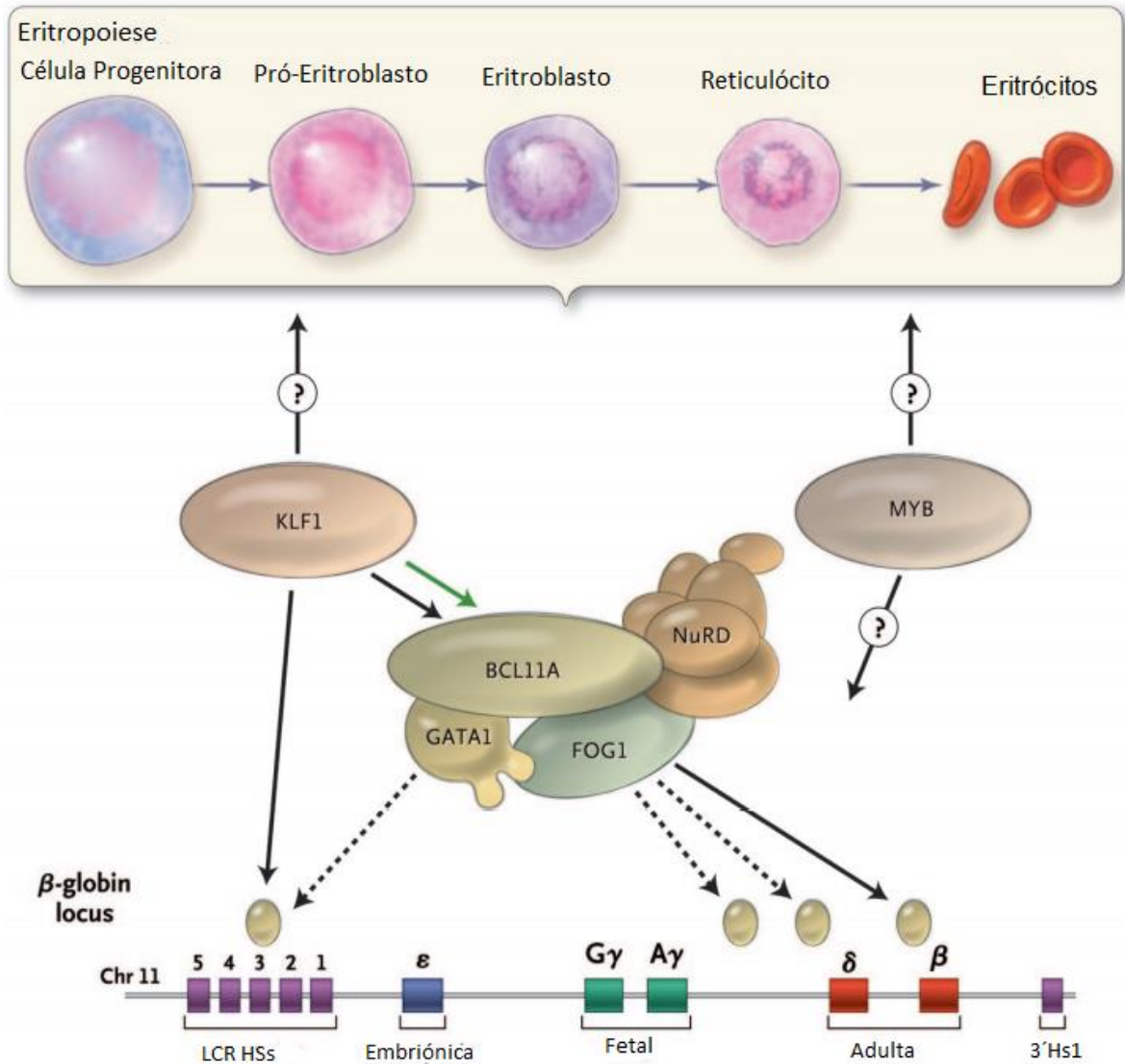


Figure 1-2 Maturação das hemácias e switch dos genes das HbS.

Existe uma mudança para a expressão do gene adulto β -globina por volta da altura do nascimento. O BCL11A e as suas proteínas parceiras, como a proteína de ligação GATA (GATA1), a proteína de zinco multi-tipo 1 (ZFPM1 ou FOG1), e o complexo NuRD, ligam-se às sequências dentro do locus da globina e reprimem a expressão dos genes γ -globina. O KLF1 interage com este processo regulando positivamente a expressão de BCL11A (seta a verde) e ligando-se também e promovendo a transcrição do gene adulto β -globina. O KLF1 pode também afetar a expressão do HbF através de efeitos mais globais na eritropoiese, que também podem ser alvo de outros fatores associados ao HbF (por exemplo, MYB). HSs indica os sítios hipersensíveis DNase I. (Adaptado de V. G. Sankaran, 2011).

repetida durante a eritropoiese adulta (D.S. et al., 2018; Fathallah & Atweh, 2006; Lavelle, Engel, & Sauntharajah, 2018; Starlard-Davenport, Smith, Vu, Li, & Pace, 2019). Ou seja, o *switch* é descartado durante o amadurecimento de progenitores eritróides (o "interruptor de maturação").

Este interruptor maturacional envolve a remoção da ativação e aquisição de marcas epigenéticas repressivas no *HBG*, com migração do LCR do *HBG* para o do *HBB*, criando uma oportunidade de intervenção farmacológica ou bioquímica para evitar este movimento. Ou seja, uma abordagem epigenética da indução de HbF (Sauntharajah et al., 2004) não se baseia tanto no *enhancer* do *HBB*, mas na prevenção de um *switch* do *HBG* para o *HBB* em primeiro lugar, preservando assim uma configuração de cromatina que favorece a ativação do *HBG* (Lavelle et al., 2018).

Uma particularidade distintiva das linhagens primitivas e definitivas é a presença de diferentes padrões de expressão dos genes das globinas. Os primeiros genes a serem expressos correspondem às cadeias ζ (agrupamento génico α) e às cadeias ϵ (agrupamento génico β). A sua síntese ocorre nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, nos eritroblastos primitivos, ainda dentro do saco vitelino, levando à formação da Hb *Gower 1* ($\zeta\epsilon 2$) (Sankaran et al., 2010). Por volta das 6 semanas os eritroblastos primitivos começam a sintetizar as cadeias α , β e γ . É nesta etapa que as das remanescentes hemoglobinas embrionárias, *Gower 2* ($\alpha 2\epsilon 2$) e Hb *Portland* ($\zeta 2\gamma 2$), são identificáveis. Como as células primitivas são progressivamente substituídas no desenvolvimento fetal pelas eritróides definitivas, ocorre uma mudança dos genes da globina embrionária para os genes definitivos (Sankaran et al., 2010; Vahid et al., 2015).

1.1.4. Persistência da hemoglobina fetal

A persistência do HbF é considerada um "traço quantitativo", ou seja, vários genes em conjunto com alguma influência ambiental determinam o valor de HbF em qualquer indivíduo. A conglomeração de múltiplos fatores (ambientais e genéticos) conduz a uma herança "complexa" dentro de famílias e explica a ausência dos padrões claros de herança mendeliana da variabilidade comum do HbF. As formas mendelianas de HPFH existem, mas são raras; sendo causadas por grandes supressões do cluster *HBB* ou mutações nos promotores dos genes *HBG* (*HBG2* ou *HBG1*) (Thein & Menzel, 2009), muitas supressões incluem a perda de genes delta e beta ($\psi\beta$) globina resultando em ($\delta\beta$) talassémia e HPFH (Wienert et al., 2018).

A extensa análise tridimensional da arquitetura cromossômica definiu região $\psi\beta$ como um elemento crítico que interage com outros elementos do *locus* beta-globina para

separar espacialmente os genes fetais e adultos da globina e promove interações de longo alcance com o LCR dependendo da fase de desenvolvimento (Vahid et al., 2015). A HPFH pode ocorrer sem recorrer a deleções, como por exemplo com mutações pontuais ou pequenas supressões no gene gama globina fetal (Vahid et al., 2015). Os genes da gama globina foram duplicados durante a evolução para produzir dois genes altamente homólogos, *HBG1* ($^{\Lambda}\gamma$) e *HBG2* ($^{\beta}\gamma$), e as mutações HPFH foram descritas nos promotores (Vahid et al., 2015). No entanto, quando ocorrem em combinação com outras desordens genéticas do *locus* da beta-globina, como o SCD e a β -talassémia, tornam-se benéficos porque os pacientes apresentam quadro clínico menos severo devido aos altos níveis de HbF (Vahid et al., 2015).

A percentagem de células F no sangue depende de 2 fatores: um aumento variável na produção de células F na medula óssea, que também é observada na presença de stress durante a eritropoiese (Theodorou et al., 2020; Wienert et al., 2018); e a vantagem das células F terem um maior tempo de vida, que leva a um aumento do seu número relativo à medida que as hemácias envelhecem na circulação (Franco et al., 2006). Os níveis de linha de base de HbF ditam os níveis finais. Existe uma grande variação nos níveis de linha de base de HbF em pacientes com SCD e até mesmo na população geral, refletindo a influência de vários polimorfismos genéticos na regulação deste *locus* (Lavelle et al., 2018; Wienert et al., 2018). A HbF impede o processo de formação de eritrócitos falciformes, sendo um alvo clínico para a criação de terapêuticas que estimulem a sua produção (Cui & Engel, 2017; Franco et al., 2006). Mesmo que uma terapia de segmentação molecular fosse suficiente para garantir taxas semelhantes de aumento na percentagem de HbF (percentagem da hemoglobina total que é HbF) em todos os pacientes, os níveis percentuais finais seriam ditados de acordo com a percentagem inicial de HbF (Lavelle et al., 2018; Wienert et al., 2018).

De acordo com estudos anteriores, o *HBF* induzido por estratégia epigenética é distribuído na população de eritrócitos e, apesar de um menor gradiente nas taxas de aumento da percentagem de HbF, as taxas de aumento das hemácias enriquecidas com *HBF* (percentagem de células F) foi maior em pacientes com uma linha base inferior, isto significa que existe um momento em que após o início da terapêutica potencia-se o aumento das células F e este mantém-se. Assim, as células F que entram na circulação serão combinadas com um número semelhante de células F que deixam a circulação, produzindo *plateaus* nas percentagens de HbF e células F (Lavelle et al., 2018).

Logicamente, as enzimas epigenéticas alvo para a indução de HbF são aquelas que são diretamente implicadas no silenciamento do *locus HBG*. Estes complexos co-

repressores contêm componentes partilhados: enzimas de silenciamento epigenética DNMT1 (Keith D. Robertson & Alan P. Wolffe, 2000; Sauntharajah et al., 2004); várias deacetilases de histona (Bradner et al., 2010; Vahid et al., 2015); KDM1A/LSD1; e proteína de ligação ao cromodomínio helicase DNA 4 (CHD4). As enzimas epigenéticas implicadas no silenciamento do *HBG* noutros estudos incluem a politransferase de histona e quesina 2 (EHMT2/G9a) e a proteína arginina metiltransferase 5 (PRMT5). Outra abordagem para a identificação dos alvos enzimáticos de silenciamento de candidatos *HBG* tem sido através da utilização de sondas inibidoras conhecidas por inibir alvos epigenéticos específicos (Lavelle et al., 2018).

O *BCL11A* (linfoma/leucemia da célula B 11 A) é um gene indispensável para o desenvolvimento normal dos tecidos linfóides como um grande regulador da alteração e silenciamento da HbF em seres humanos (Sankaran et al., 2009). A variante genética dentro do *locus BCL11A* associa-se a níveis mais elevados de HbF assim como com a expressão reduzida de *BCL11A* mRNA (Harju-Baker et al., 2008; Wienert et al., 2018). O *BCL11A* interage fisicamente com o complexo de remodelação da cromatina (NuRD) (Sankaran et al., 2009), e os fatores de transcrição eritróide, GATA1 e FOG1 (Sankaran et al., 2010).

O fator de Krüppel-Like (*KLF1*), originalmente conhecido como *EKLF*, foi demonstrado como crítico para a transcrição do gene adulto β -globina, e de aumentar a capacidade do promotor para competir com o promotor da γ -globina para a função potenciadora da região LCR específica do eritróide. Um papel mais direto do *KLF1* no silenciamento do gene γ -globina ocorre através da estimulação da expressão *BCL11A* (Ginder, 2015; Sankaran et al., 2009). Assim estes genes tornam-se indispensáveis à compreensão de mecanismo de indução de HPFH, devido ao seu poder regulador sobre *HBF*.

1.1.5. Epigenética

O termo Epigenética refere-se às modificações pós-traducionais de DNA e histonas que afetam a expressão dos genes e podem ser herdadas através da replicação de células somáticas (Ginder, 2015), ou seja, ao controlo da expressão genética sem alterar a sequência do DNA e compreende as seguintes marcas epigenéticas: metilação do DNA, modificações covalentes de histonas, mecanismos de RNA não codificantes e complexos de remodelação de cromatina. Embora todos os componentes do epigenoma pareçam regular a expressão genética, principalmente de forma concertada, acredita-se que a metilação do DNA seja crucial para estabilizar as alterações sinalizadas na expressão genética (Beetch et al., 2020). A não propagação da informação epigenética resulta em desvios do padrão normal de expressão genética (Sarkies & Sale, 2012).

Usa-se o termo instabilidade epigenética para descrever a manutenção de expressão genética anormal quando ocorre a ruptura da transmissão de informação epigenética (Sarkies & Sale, 2012).

Um processo epigenético celular deve seguir os seguintes critérios: apresentar uma diferença de expressão observável entre duas células com o mesmo genótipo; esta diferença deve persistir na ausência do sinal inicial e deve ser passada através da divisão mitótica. Algumas marcas epigenéticas também podem ser herdadas através da meiose (Sarkies & Sale, 2012).

A metilação do DNA é uma modificação química que se observa pela ligação de um grupo metil ao carbono 5 da citosina e suprime a transcrição de determinados genes, assim como é responsável pela alteração da estrutura da cromatina para formas mais condensadas (Paula et al., 2015). As modificações covalentes de histonas consistem na acetilação das histonas pelas acetiltransferases de histonas gerando um estado mais ativo da cromatina (maiores níveis de transcrição), por oposição, a desacetilação de histonas associa-se ao silenciamento transcricional de genes (Williams, 2013). A metilação de histonas pelas metiltransferases de histonas pode participar na ativação ou no silenciamento de genes, dependendo da posição da marca de metilação. A posição, a natureza das modificações das histonas e as suas consequências constituem o código das histonas (Paula et al., 2015; Williams, 2013). As marcas das histonas encontram-se normalmente abreviadas e incluem o nome da histona, a posição da marca, e a natureza e número de marcas (Williams, 2013). Os RNAs não codificantes não são traduzidos em proteínas e podem ser divididos em reguladores ou “*housekeeping*” (ou de manutenção, são genes constitutivos, expressos em todas as células em quaisquer condições e essenciais para a manutenção da função celular básica) (J. W. Wei, Huang, Yang, & Kang, 2017). O RNA que tem um papel regulador é ainda dividido em duas categorias, com base no tamanho: RNAs de cadeia curta (miRNA) e RNA de cadeia longa (lncRNA). Nos últimos anos, os RNAs não codificantes têm mostrado desempenhar um papel significativo na regulação epigenética, podendo até regular a expressão ao nível do gene e do cromossoma, para controlar a diferenciação celular (J. W. Wei et al., 2017).

Os mecanismos epigenéticos ocorrem endogenamente após a fertilização, sendo inicialmente marcado por uma desmetilação no embrião. A quantidade de metilação no esperma (cerca de 86%) e no ovócito (72%) reduz rapidamente e atinge o seu nível mínimo (43%) na massa celular interna dos embriões na fase do blastocisto (32 a 64 células). Neste processo, os primeiros padrões de metilação específicos do gâmeta

herdados dos pais, bem como modificações epigenéticas adquiridas, são apagados, enquanto as regiões metiladas em genes com *imprinting* (mecanismo de regulação epigenética no qual certos genes são expressos apenas por um alelo parental, enquanto o outro é metilado) são mantidas com precisão, o que é crucial para o estabelecimento da pluripotência (Li, Tollefsbol, Li, & Chen, 2019). Antes da desmetilação em todo o genoma, a transformação notável do genoma paterno ocorre no citoplasma dos ovos, onde a protamina da cromatina do esperma é substituída por histonas acetiladas, sendo das primeiras sugestões estudadas de que a desmetilação pode estar ligada à remodelação da cromatina (Li et al., 2019).

Os genes que sofrem *imprinting* são uma classe de genes de mamíferos, em que as ilhas CpG (CpG simboliza uma citosina seguida de uma guanina na mesma cadeia de DNA, ligadas por um fosfato, existem zonas do genoma particularmente ricas em CpG, denominadas de ilhas de CpG, que estão próximas de genes permanentemente expressos em todas as células) nos seus promotores se tornam metiladas e em que o silenciamento depende da estabilidade epigenética a longo prazo (Reik, 2007). Para que a transcrição genética ocorra, os fatores de transcrição, a RNA polimerase II e outros elementos da maquinaria transcricional devem ser capazes de acessar e ligar-se às regiões promotoras ou potenciadoras do gene. As ilhas de CpG não metiladas nestas regiões reguladoras permitem a ligação da maquinaria transcricional e o gene é ativamente transcrito. Por outro lado, a metilação das ilhas CpG nas regiões promotora ou potenciadora leva ao recrutamento de complexos de repressores que impedem a ligação dos elementos à maquinaria transcricional, o que resulta em silenciamento de genes (Beetch et al., 2020; Keith D. Robertson & Alan P. Wolffe, 2000). A metilação do CpG pode ocorrer devido à capacidade reforçada destas células de corrigir o padrão de metilação definido pelo menos eficiente de novo metiltransferase (Keith D. Robertson & Alan P. Wolffe, 2000).

A nutrigenômica é uma área de epigenômica que explora e define o campo da dieta em rápida evolução e as suas interações com o genoma. O estilo de vida e a dieta podem influenciar significativamente os mecanismos epigenéticos, que causam alterações hereditárias na expressão genética sem alterações na sequência de DNA. As variações epigenéticas dependentes dos nutrientes podem afetar significativamente a estabilidade do genoma, a expressão do mRNA e da proteína, e as alterações metabólicas, que por sua vez influenciam a absorção dos alimentos e a atividade dos seus constituintes. O aumento mediado pela deacetilases de histonas (HDACs) na afinidade da histona ao DNA causa condensação de DNA, prevenindo a transcrição, enquanto a cromatina

acetilada pela acetilase de histonas (HAT) é transcricionalmente ativa (**Figure 1-3**). (Vahid et al., 2015).

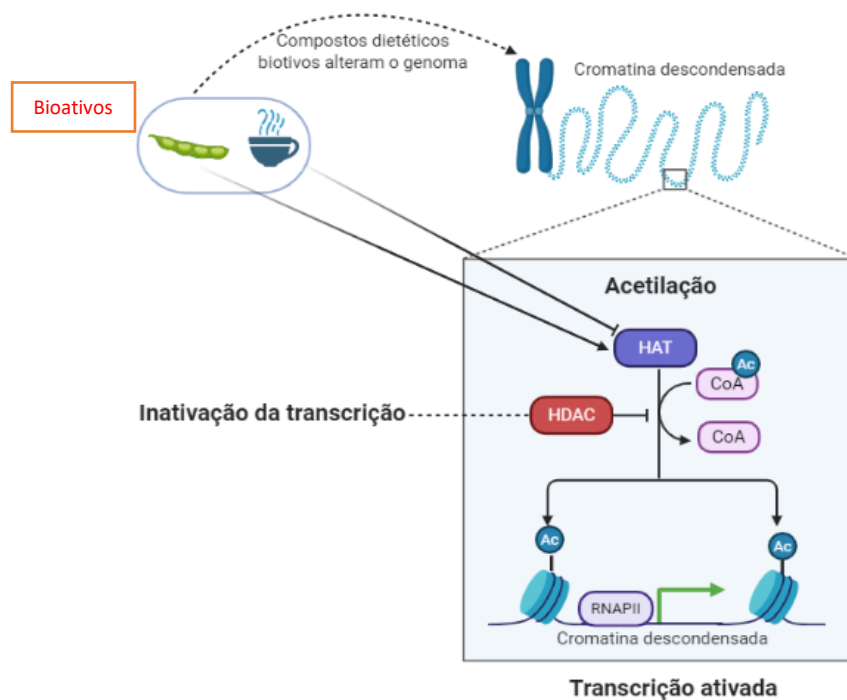


Figure 1-3 Nutrigenômica e epigenética

Os compostos bioativos provenientes da dieta impactam a transcrição dos genes através de alterações epigenéticas como a acetilação das histonas. As HAT permitem a descondensação da cromatina e ativação da transcrição, em oposição as HDAC são as responsáveis por impedir a ligação dos grupos acetil e assim a cromatina permanece no estado condensado característico da inativação de transcrição de genes. Compostos como a soja, mais especificamente a genisteína regulam positivamente as HATs enquanto os polifenóis do chá verde e mais notoriamente a EGCG tem a capacidade de inativar as HATs. (Adaptado de BioRender.com)

1.1.6. Regulação epigenética

A regulação epigenética dos genomas dos eucariotas tem sido cada vez mais evidente como participante na estabilidade na sequência de DNA e na manutenção da integridade da passagem da informação genômica (Putiri & Robertson, 2011). Torna-se essencial identificar mecanismos adicionais que permitam a reprodução de modificações de histona dentro da cromatina do DNA recentemente sintetizado, assim como entender como se pode controlar a expressão dos genes. No entanto, independentemente da sua herdabilidade, estas modificações fornecem informações cruciais à estabilidade genômica e para a metilação adequada do DNA, assim, as modificações da histona são importantes para estabelecer marcas epigenéticas de metilação de DNA que por sua vez aumentam a estabilidade epigenética (Putiri & Robertson, 2011). A hipometilação global do DNA pode levar à instabilidade genômica e às anomalias estruturais nos cromossomas, que é também um fenótipo comum de

cancro e envelhecimento (Li et al., 2019). A modificação epigenética pode também ser reversível, tornando assim o epigenoma continuamente vulnerável. A proporção de células estaminais contribui para a vulnerabilidade epigenética do organismo, indicando que o declínio gradual da estabilidade epigenoma global com o desenvolvimento pode resultar da diminuição da proporção de células estaminais nos tecidos e órgãos (Li et al., 2019).

Na maioria dos casos, as marcas epigenéticas servem como um sinal de reconhecimento para um complexo proteico ou proteína que, desempenha uma função reguladora. Um conceito de organização para identificar potenciais alvos de silenciamento epigenético é o dos escritores e leitores (Ginder, 2015). Os escritores são as enzimas que depositam ou removem uma marca epigenética, enquanto os leitores são as proteínas ou complexos que interpretam essas marcas e executam a função reguladora associada (Ginder, 2015).

Os reguladores epigenéticos, como as acetiltransferases de histonas, metiltransferases, entre outros, desempenham um papel fundamental no controlo da expressão genética modificando o estado da cromatina e estão a emergir como possíveis alvos terapêuticos em várias doenças humanas. A descoberta de um grande número de mutações nas enzimas modificadoras da cromatina, nos genomas do cancro levou ao desenvolvimento de numerosas moléculas que visam atingir enzimas ou proteínas específicas envolvidas na regulação epigenética da expressão genética (Renneville et al., 2015).

Contudo, as enzimas epigenéticas por si só não ditam a ativação dos genes, ou seja, os fatores de ligação ao DNA específicos às sequências direcionam a ativação ou repressão dos genes, mas o trabalho bioquímico real necessário para a ativação ou repressão é executado por um complexo co-regulador. Os complexos co-reguladores que remodelam a cromatina para a ativação de genes são chamados co-ativadores. Os co-ativadores estão em oposição dinâmica, isto é, podem competir pelos mesmos locais de ligação em fatores de transcrição e a atividade transcricional é sensível à estequiometria celular de co-ativadores e co-repressores (Lavelle et al., 2018). Por outras palavras, o padrão de expressão de base dos fatores de transcrição é determinante para a resposta da célula ao descondensar a cromatina.

1.1.7. Alvos terapêuticos

Propõem-se que os agentes farmacológicos que alteram a configuração epigenética dos genes γ -globina possam fornecer uma abordagem terapêutica viável à indução de HbF.

A primeira referência da hidroxiureia (HU) como possível terapia para os eritrócitos falciformes, surgiu em 1984 (Platt et al., 1984), com associação da produção da hemoglobina fetal. Contudo, sabe-se que até cerca de 50% dos pacientes não consegue beneficiar desta terapêutica a longo prazo, pois a taxa de resposta é baixa e possui elevada toxicidade (Field & Nathan, 2014; Platt et al., 1984; Ware et al., 2002). Hidroxiureia é um inibidor de redutase de ribonucleósidos há muito utilizado na farmacoterapia das perturbações mieloproliferativas (crescimento crónico e anómalo das células hematopoiéticas) (Das, Mishra, Khodiar, & Patra, 2018).

Existem três vias moleculares possíveis para induzir a expressão de γ -globina através do uso da hidroxiureia: modificação epigenética; vias de transdução de sinal; vias pós-transcricionais. Nas vias de modificação epigenética, a hidroxiureia diminui a metilação das ilhas CpG, o que resulta no aumento da expressão de γ -globina. Na via de transdução de sinal, espécies reativas de oxigénio (ROS) como o óxido nítrico (NO), aumentam a ativação da via monofosfato de guanósina cíclica (cGMP) e da PKG, estimulando o cianeto solúvel para promover a expressão de γ -globina. Nas vias pós-transcricionais, a expressão miRNA é mediada por hidroxiureia em SCD e constata-se a regulação do miR-15a e miR-16-1, que atua no MYB, um regulador crítico da expressão HbF (Shah & Dwivedi, 2020). Esta terapêutica proporciona múltiplos mecanismos de ação na SCD, incluindo a indução da hemoglobina fetal, redução do número de leucócitos e reticulócitos circulantes, modulação da expressão das moléculas de adesão e melhoria da flexibilidade dos eritrócitos (Das et al., 2018).

As DNA metiltransferases (DNMTs) são uma categoria importante de escritores epigenéticos, uma vez que a metilação do DNA foi o primeiro sinal regulador epigenético bem descrito (Mirza et al., 2013). Os mais caracterizados são as metilases *de novo*, DNMT 3A e 3B, que metilam simetricamente as citosinas no dinucleótidos CpG; e DNMT1, uma metilase de manutenção, que adiciona um grupo de metil ao CpG (Beetch et al., 2020; Ginder, 2015; Keith D. Robertson & Alan P. Wolffe, 2000). A DNMT1 torna-se num alvo para reverter o silenciamento dos genes globinas (Ginder, 2015).

Os leitores de metilação do DNA são um grupo de proteínas que preferencialmente se ligam ao DNA com dinucleótidos de CpG simetricamente metilados. A maior família destes são as proteínas do Domínio de Ligação Metil (MBD) (Keith D. Robertson & Alan P. Wolffe, 2000), que incluem MBD1, MBD2 (Harju-Baker et al., 2008), MECP2 e MBD4 (Mirza et al., 2013). Destes, o MBD2 regula o gene da globina β embrionário/fetal, ao silenciar em células eritróides adultas, através do recrutamento do complexo NuRD para o DNA metilado (Ginder, 2015). Além disso, a presença de MBD2 e MBD3 em

associação com o complexo NuRD parece ser mutuamente exclusiva (Ginder, 2015). O MBD3-NuRD está associado ao promotor do gene γ -globina principalmente através da associação com o fator de transcrição GATA1 (Ginder, 2015). A expressão de genes específicos do tecido está associada a um estado não metilado do promotor do gene. A falta de expressão genética está associada à metilação do DNA. Isto sugere que os agentes hipometilantes do DNA podem reativar a expressão de genes silenciados durante o desenvolvimento, como é o caso do *HBF*, tornando-se numa promessa de intervenção eficaz através do controlo deste processo para doentes com SCD (Sauntharajah et al., 2004).

Por outro lado, a metilação de histonas pode sinalizar a ativação de genes, o silenciamento de genes ou um estado bivalente. Por exemplo, a metilação histona H3K4me3 é geralmente associada com cromatina descondensada e transcrição de genes, enquanto a metilação histona H3K9 e H3K27me3 são mais frequentemente associadas ao silenciamento de genes. A presença de H3K4me3 e H3K27me3 está associada a um estado bivalente de equilíbrio (Ahmadvand et al., 2014). Os principais autores da metilação da histona são as metilases específicas do domínio SET de e a PRMT5 (Ginder, 2015).

Há ainda que ter em consideração que a citotoxicidade deve ser evitada. Alguns alvos epigenéticos, por exemplo, HDACs, têm funções pleiotrópicas nas células, isto é, regulam diferentes fenótipos. Assim, mesmo a inibição do HDAC no alvo pode induzir citotoxicidade, potencialmente limitando o papel desses alvos epigenéticos e seus fármacos na indução de HbF (Lavelle et al., 2018). Sabe-se ainda que a eliminação seletiva de uma HDAC, de forma individual, é capaz de induzir hemoglobina fetal sem alterações na acetilação de histona global, com efeitos menos extensos na expressão genética global e sem inibir o ciclo celular (Bradner et al., 2010). Há muito que o aumento da acetilação das histonas foi associado à cromatina descondensada e conseqüentemente à expressão genética ativa. Os escritores para a acetilação de histona são acetiltransferases, incluindo P300/CBP; PCAF e TAF 88250, bem como desacetilases de histona. O consenso é que a acetilação das lisinas nas caudas de histona resulta na neutralização da carga e na diminuição da interação dos nucleossomas com o seu DNA associado (Ginder, 2015; Vahid et al., 2015).

O ácido butírico e os seus derivados são descritos como silenciadores dos repressores de HbF e acabam por induzir a expressão de genes de globina β embrionária e fetal (Keefer et al., 2006). O aumento da expressão da hemoglobina fetal foi associado com o aumento da acetilação da histona nas proximidades do gene γ -globina. Além disso,

demonstrou-se que o butirato e outros inibidores do HDAC afetam outras vias de sinalização, incluindo os sistemas de cinases STAT5, cAMP e MAP (Ginder, 2015). Para além do mais, o tratamento de doentes com anemia falciforme e β -talassemia com butirato de sódio e ácido butírico induz o aumento da expressão de HbF, identificando os inibidores HDAC1 e HDAC2 como indutores da expressão do gene γ -globina (Renneville et al., 2015), confirmando o provável mecanismo de ação do ácido butírico e de alguns dos seus derivados (Ginder, 2015; Im, Grass, Christensen, Perkins, & Bresnick, 2002).

1.1.8. Antioxidantes e quelatação

Os antioxidantes funcionam como *scavengers* (moléculas que removem ou desativam impurezas e produtos de reações indesejadas) de radicais, dadores de hidrogénio, dadores de eletrões. Adicionalmente tem outras funções como a decomposição de peróxido, extinção de oxigénios quando estes existem na forma de O, sendo também inibidores enzimáticos e quelantes de metais (capacidade de se ligar ao ferro em demasia uma vez que ao se sincronizarem com o ferro intra e extracelular proporcionando a sua excreção e sequente diminuição dos seus níveis séricos) (Carrasqueira, 2017; Orisakwe et al., 2020). Os antioxidantes também podem trabalhar indiretamente através de interações com outras enzimas oxidativas e vias de sinalização celular importantes para controlar o *stress* oxidativo (Beetch et al., 2020).

Os quelantes não removem só o ferro do corpo, mas também limpam e ligam o ferro livre para impedir a formação de ROS (Orisakwe et al., 2020; Perrine & Faller, 1993). O ferro não ligado ou vagamente quelado ajuda a aumentar os problemas associados às espécies reativas de oxigénio e os danos nos tecidos continuam a ser uma característica comum nas doenças relacionadas com sobrecarga de ferro. Portanto, a limpeza eficaz do excesso de ferro é uma forma para conter e suprimir danos nos tecidos mediados por radicais (Carrasqueira, 2017; Orisakwe et al., 2020). A quelatação de ferro está a ganhar terreno na gestão de várias doenças relacionadas com o ferro.

Os isoflavonóides derivados da soja, nomeadamente genisteína e daidzeína, relataram atividades antioxidantes e anticancerígenas que foram ligadas a evidências epidemiológicas de menor risco de cancro e doenças cardíacas (Beetch et al., 2020). Os isoflavonóides de soja também têm demonstrado atenuar os danos oxidativos relacionados com o envelhecimento, assim como os polifenóis presentes no chá (Beetch et al., 2020).

1.1.9. Polifenóis do chá

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo, especialmente em países asiáticos (Chow et al., 2003). Os compostos do chá verde têm demonstrado inibir a carcinogénese induzida por uma grande variedade de agentes cancerígenos em modelos de cancro de roedores (Ohnishi et al., 2001). Os principais polifenóis ativos no chá verde incluem epigallocatequina galato (EGCG,) epigallocatequina (EGC), epicatequina (EC), entre outros (Orisakwe et al., 2020; Thephinlap et al., 2007; Thichanpiang & Wongprasert, 2015) , sendo o EGCG o mais abundante e com maior atividade antioxidante (Chow et al., 2003; Li et al., 2019; Peter, Bosze, & Horvath, 2017). Curiosamente, os polifenóis no chá verde podem agir como pró-oxidantes quando usados em doses altas, dependendo do estado clínico. Os polifenóis partilham vários efeitos terapêuticos contra condições patológicas, incluindo cancro, inflamação, diabetes e doenças cardiovasculares (Hussain, & Ashafaq, 2018). Vários estudos clínicos revelaram que o tratamento por EGCG inibe a incidência tumoral em órgãos, como fígado, estômago, pele, pulmão, glândula mamária e cólon, assim como a capacidade de atrasar o desenvolvimento de doenças crónicas comuns, como doenças cardiovasculares, possivelmente através dos seus efeitos anti-inflamatórios (Hussain, & Ashafaq, 2018).

Numa doença como o cancro, a indução de *stress* oxidativo adicional pelos efeitos pró-oxidantes do EGCG pode levar à morte celular mediada pela ROS de células cancerígenas (Thichanpiang & Wongprasert, 2015), proporcionando um resultado terapêutico benéfico (Beetch et al., 2020; Thephinlap et al., 2007; Vahid et al., 2015).

A estrutura dos compostos polifenóis do chá faz deles bons dadores para a ligação com o hidrogénio (Raschke, Rowland, Magee, & Pool-Zobel, 2006). Por exemplo, a ligação de hidrogénio das moléculas de água ao EGCG cria uma grande camada de hidratação, o que reduz a absorção do EGCG. A capacidade de ligação do hidrogénio permite que estes compostos se liguem fortemente a ácidos nucleicos e proteínas (Peter et al., 2017). Assim, facilita-se a inibição de certos alvos moleculares epigenéticos, tais como DNMTs, HATs e HDACs (**Figure 1-4**), quando bloqueia as DNMTs, devido às suas propriedades de *scavenging* e antioxidantes, ocorre a inibição da metilação do DNA (Singh, Shankar, & Srivastava, 2011). O EGCG indiretamente levar à fragmentação do telómero através da inibição da telomerase. Estudos recentes também demonstraram que o EGCG atua como um agente epigenético reduzindo as atividades de DNMTs, protéases e di-hidrofolato redutase, que afetariam a transcrição dos genes-supressores de tumores e da síntese proteica (Singh et al., 2011).

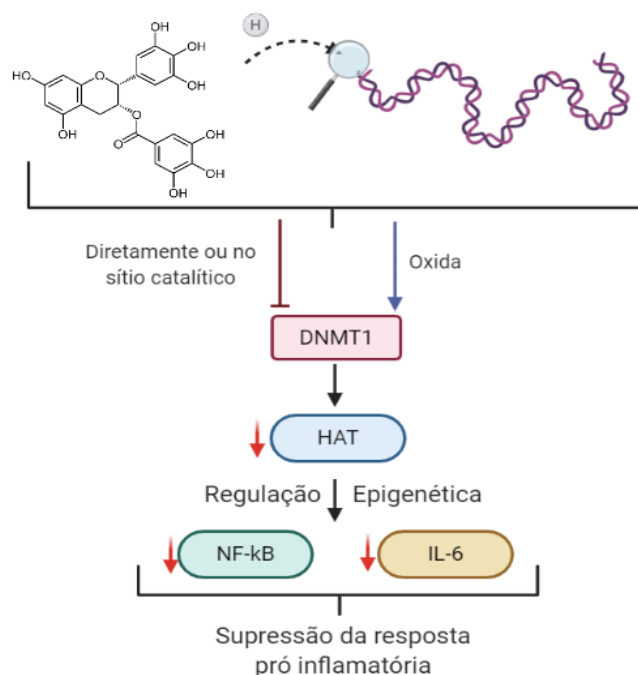


Figure 1-4 Mecanismo de ação

Através da estrutura química do EGCG pode se observar a sua riqueza estrutural e a capacidade de facilmente criar ligações de hidrogénio com proteínas e ácidos nucleicos. A sua ligação a moléculas de ADN inicia reações que podem passar pela inibição direta ou apenas no sítio catalítico, ou então reações de oxidação por exemplo na enzima DNMT1, potenciando regulação epigenética através da subregulação da HAT que culmina em reações de cascata junto de fatores pró inflamatórios, que são subregulados (NF-kB e IL-6) suprimindo a resposta inflamatória e potencialmente aligeirar sintomatologia associada a SCD. (Adaptado de BioRender.com)

O EGCG pode formar ligações de hidrogénio com diferentes resíduos das DNMTs, atuando assim como um inibidor direto do DNMT1 (Hussain, & Ashafaq, 2018). Esta inibição pode impedir a metilação da cadeia de DNA recentemente sintetizada, resultando na reversão da hipermetilação e na expressão dos genes silenciados. O EGCG é também um bloqueador eficiente da di-hidrofolato redutase, que atua através da interação com o metabolismo do ácido fólico nas células, causando a inibição da síntese dos ácidos nucleicos e alterando o padrão de metilação do DNA, para além disso, este composto natural liga-se ainda a DNMT1 e bloqueia o local de ligação das enzimas (Fang et al., 2003; Rajarajacholan, Thalappilly, & Riabowol, 2013; Singh et al., 2011). Este componente inibe a atividade da HAT, enquanto outros derivados do

polifenol, tais como catequina, epicatequina e epigallocatequina exibem baixos efeitos anti-HAT. Foi sugerido que a ativação NF- κ B pode ocorrer através da acetilação. Por conseguinte, a inibição da HAT pelo EGCG pode levar à redução da atividade NF- κ B e à diminuição da ligação p300 ao promotor IL-6, suprimindo a resposta pró-inflamatória (Vahid et al., 2015).

Os polifenóis são conhecidos por serem compostos multifacetados que estão envolvidos em numerosos mecanismos de proteção e recuperação neuronal celulares que envolvem quelatar ferro, eliminação de oxigénios e radicais de azoto, assim como ativação da via de sinalização da proteína C cinase (Thichanpiang & Wongprasert, 2015). O EGCG tem, assim, um grande potencial na prevenção de várias patologias porque é barato e disponível, e o chá exibe pouco ou nenhum efeito tóxico em células normais e saudáveis (Orisakwe et al., 2020). Como não é fácil alterar os hábitos alimentares de um indivíduo, ingerir produtos de chá verde em formulações orais pode ser mais fácil de adaptar ao uso crónico em populações saudáveis. Os níveis máximos de plasma EGCG de 200-400 ng/ml (0,4-0,8 M) podem ser alcançados após a administração destas formulações em doses equivalentes ao teor de EGCG em 8 a 16 chávenas de chá verde (dependendo do tamanho da chávena) (Chow et al., 2003). Contudo, a biodisponibilidade do EGCG é pobre e é instável em condições alcalinas ou neutras (Peter et al., 2017), logo, o EGCG é usado principalmente em combinação com outros componentes ou sendo modificado para melhorar a sua eficácia e especificidade (Chakrawarti, Agrawal, Dang, Gupta, & Gabrani, 2016).

Estudos de cultura de celular *in vitro* mostram que o EGCG induz a apoptose e promove a detenção do crescimento celular, alterando a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular, suprimindo a ativação de NF- κ B (Hussain, & Ashafaq, 2018; Shukla, 2007; Singh et al., 2011). A maioria dos efeitos anticancerígenos do EGCG acontecem através de várias vias de transdução de sinal, incluindo JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT, Wnt e Notch. Suprime o NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1), que inibem MAPKs, que estão envolvidos no controlo do ciclo celular e possuem propriedades anti-inflamatórias (Hussain, & Ashafaq, 2018; Shukla, 2007).

Em suma, diferentes estudos demonstram o potencial deste composto natural, seja por alteração do ciclo celular, através da supressão das vias MAPK (Negri, Naponelli, Rizzi, & Bettuzzi, 2018), ou como inibidor de DNMTs e HDACs (Borutinskaitė, Virkšaitė, Gudelytė, & Navakauskienė, 2018), por regulação diminuindo a expressão ou por ligação direta a estes reguladores epigenéticos, para além de ter demonstrado potencial de intervenção em células estaminais numa linha de células cancerígenas (Borutinskaitė

et al., 2018). Este potencial de terapêutico epigenético advém da capacidade de aumentar a ligação de histonas acetiladas a regiões promotoras de genes.

Dos reguladores de interesse já se provou a sua intervenção a nível transcricional nos níveis de DNMT3B e HDAC1, potenciando efeitos regulatórios em cascata uma que, por exemplo, as DNMTs podem ligar-se as HDACs, reprimindo assim a transcrição genética através da atividade de histona desacetilase (Khan et al., 2015). Na linha celular HeLa, observou-se que o EGCG pode ligar e inibir o DNMT1, DNMT3B, e atividade HDAC1, causando uma redução da hipermetilação do DNA e restaurando a expressão de genes reprimidos. A ação epigenética EGCG na regulação de DNMT1 é acompanhada por redução de histona fosforilada H2AX e AKT fosforilada (Nandakumar, Vaid, & Katiyar, 2011; Negri et al., 2018). Para além disso, o EGCG demonstrou inibir a desidratação *in vitro* dos glóbulos vermelhos induzidos pelo cotransporte K-Cl ou pelo armazenamento de glóbulos vermelhos (Ohnishi et al., 2001). Matos, 2020, demonstrou ainda que o EGCG, em concentrações fisiologicamente atingíveis através da dieta ou por suplementação, pode reduzir a expressão de *BCL11A*, que é considerado o principal repressor de HbF, de forma mais eficiente que HU, que é atualmente o único indutor de HbF aprovado pela FDA.

O EGCG funciona como um potencial modificador epigenético e atua através de uma ação inibidora sobre a atividade de DNMTs e HDACs e reativa os genes alvo epigeneticamente silenciados alterando o estado de metilação dos promotores destes genes (Khan et al., 2015; Nandakumar et al., 2011) e assim, emerge como candidato a indutor natural de hemoglobina fetal.

1.1.10. Genisteína

A genisteína (4,5,7-trihidroxisoflavona) (Li et al., 2019) é um isoflavonóide presente na soja que exibe efeitos anti-cancerígenas no cancro da mama, do cólon e da próstata (Tetsu Akiyama & Ogawara, 1991; Frey & Singletary, 2003). Demonstrou-se que tem uma poderosa capacidade de eliminação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e radicais livres e protege as células contra o *stress* oxidativo (Setchell et al., 2003). Esta ação está associada à capacidade de genisteína de doar um átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo ligado ao anel de benzeno na sua estrutura (Beetch et al., 2020). Estudos recentes revelaram que a exposição a genisteína através da dieta materna durante a gravidez pode resultar em efeitos duradouros na descendência através da indução de alterações no perfil de expressão genética do útero (**Figure 1-5**) (Vanhees et al., 2011).

A exposição pré-natal de genisteína (GN) foi associada com o aumento da eritropoiese juntamente com macrocitose (a quantidade de hemoglobina no sangue aumenta em proporção com o aumento do tamanho dos eritrócitos) moderada na idade adulta (Vahid et al., 2015; Vanhees et al., 2011). Há um pressuposto comum de que a exposição pré-natal a genisteína deixa uma assinatura permanente na linhagem hematopoiética de ratos. Como a exposição à genisteína é conhecida por alterar tanto a metilação global do DNA como a expressão genética, é tido como hipótese que a exposição pré-natal a genisteína leva à adaptação da hematopoiese alterando tanto a metilação do DNA como a expressão genética (Vanhees et al., 2011). O tratamento com genisteína induz a desmetilação e a acetilação mediada pela inibição SIRT1 da histona H3-K9 associada aos promotores do PTEN, CYCD e FOXO3A.

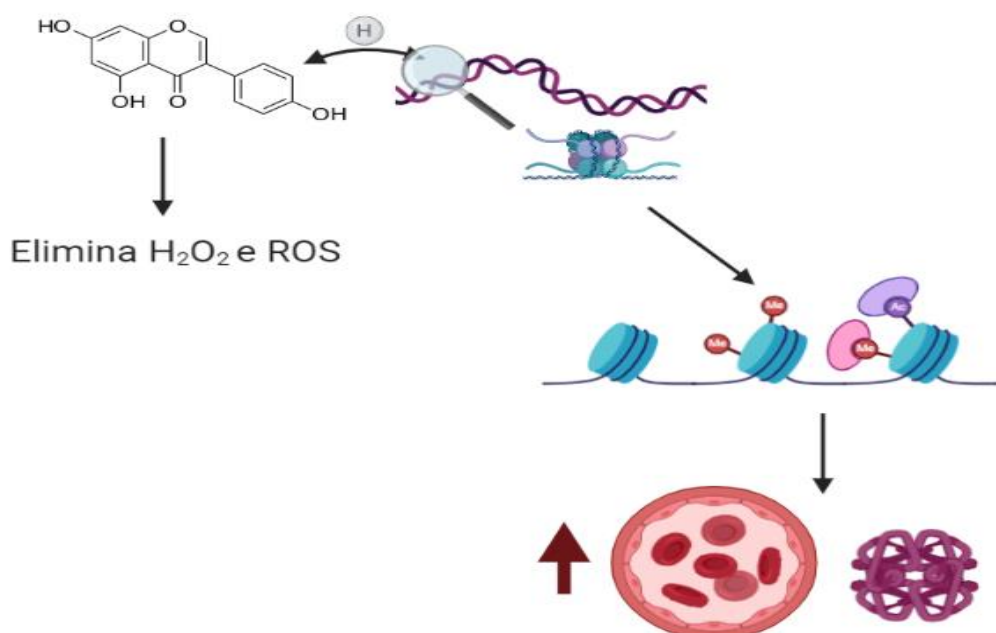


Figure 1-5 Mecanismo de ação da genisteína.

Tem uma poderosa capacidade de eliminação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e radicais livres, protegendo as células contra o *stress* oxidativo, através da doação de um átomo de hidrogénio. Com a exposição à genisteína altera-se tanto a metilação global do DNA como a expressão genética, logo uma exposição pré-natal a genisteína levará à adaptação da hematopoiese. O tratamento com genisteína induz a desmetilação e a acetilação de histonas. A exposição pré-natal de genisteína pode-se associar com o aumento da eritropoiese e da quantidade de hemoglobina no sangue em proporção com o aumento do tamanho dos eritrócitos em níveis intermédios mantidos na idade adulta. (Adaptado de BioRender.com).

Um grande desafio que se impõe aos fármacos direcionados para os reguladores epigenéticos é que a maioria destes complexos não são específicos aos genes das globinas, mas desempenham papéis importantes na coordenação da expressão genética, tanto na eritropoiese como em numerosos tipos de células. Assim, alcançar uma janela terapêutica desejável para induzir a expressão hemoglobina fetal sem efeitos

desfavoráveis na regulação de genes pode ser um desafio. A soma destes efeitos pode ser difícil de prever a partir dos primeiros princípios e, por isso, estudos clínicos e em animais serão essenciais. É possível que os avanços na compreensão dos mecanismos moleculares destes complexos, bem como da biologia, possam dar oportunidades para direcionar os seus efeitos nas globinas da forma mais específica possível (D.S. et al., 2018).

1.1.11. EGCG e Genisteína

Estes compostos tornaram-se de interesse avaliar uma vez que já foram comprovados influenciar separadamente a regulação epigenética através das DNMTs e HDACs, com baixa citotoxicidade de forma a não influenciar o normal ciclo celular. Ambos os compostos demonstraram regular transcrição do gene *BCL11A*, com maior efeito que a HU.

O facto destes agentes naturais terem apresentado a capacidade de aumentar a percentagem de células que contêm hemoglobina fetal na linha celular K562 (linhagem celular que irá ser utilizada) e potencialmente serem menos citotóxicos que a HU (Matos, 2020).

Apesar de ser amplamente descrito a atividade destes compostos a nível da atividade anticancerígena, desconhece-se a importância destes dois compostos na indução da hemoglobina fetal ou diferenciação eritróide, tornando-se essencial investigar os efeitos da GN e do EGCG não só em linhas celulares imortalizadas, mas também nas progenitoras eritróides, para concluir sobre a utilização destes como agentes terapêuticos em hemoglobinopatia especialmente, na anemia falciforme.

2. Objetivos

A investigação de terapêuticas alternativas de combate à hemoglobinopatias motivou à compreensão dos mecanismos epigenéticos inerentes à regulação da expressão de genes β globinas humanos e, naturalmente, o silenciamento de HbF (Ginder, 2015), uma vez que apresentam um grande potencial de correção dos mecanismos patogénicos subjacentes à doença. Atualmente, existe conhecimento de cerca de mais de meia centena de compostos indutores de HbF, contudo, desconhece-se o mecanismo de ação destes (Field & Nathan, 2014; Kershaw & Kim, 2017; Orisakwe et al., 2020). A hidroxiureia é o único agente farmacológico usado como terapêutica, no entanto, tem como desvantagem o facto de não provocar os efeitos desejados em todos os pacientes e não ser de fácil acesso nas áreas onde estas patologias são mais prevalentes e ter efeitos secundários adversos.

O alvo ideal para um tratamento alternativo será aquele que imita e impulsiona o efeito das variantes genéticas que regulam os níveis de HbF em *loci* como *BCL11A* e *KLF1* sem afetar outras vias biológicas ou causar efeitos secundários extremos (Thein, 2013).

Os mecanismos epigenéticos propostos para a regulação da HbF assentam na metilação do DNA e a desacetilação das histonas (Sankaran et al., 2010; Stamatoyannopoulos, 2010). Numerosos estudos demonstram que a hipometilação do DNA e a acetilação das histonas são eficazes na indução da expressão γ -globina, através de compostos naturalmente disponíveis (Im et al., 2002; Perrine & Faller, 1993; Qian, Chen, Zhao, Guo, & Qian, 2013; Stamatoyannopoulos, 2010), que podem afetar significativamente a estabilidade do genoma, o mRNA e a expressão proteica (Beetch et al., 2020; Orisakwe et al., 2020; Palaparthi et al., 2019; Vahid et al., 2015).

A Genisteína (GN), um flavonoide natural encontrado em derivados de soja, constitui um componente presente na dieta diária das várias pessoas, para além de ser um dos compostos mais estudados e associados a uma variedade de atividades biológicas (T. Akiyama et al., 1987; Tetsu Akiyama & Ogawara, 1991). O chá verde (*Camellia sinensis*), possui como principal componente polifenólico a epigallocatequina galato (EGCG), que apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Thichanpiang & Wongprasert, 2015). Com o consumo de EGCG foi observada a inibição eficaz da desidratação *in vitro* dos glóbulos vermelhos falciformes (Ohnishi et al., 2001) e a diminuição do *stress* oxidativo nos eritrócitos tratados com ferro.

A incapacidade das populações, onde a prevalência da é superior, de acederem a medicamentos adequados e sustentarem os elevados custos da gestão clínica leva à

necessidade de desenvolver novas abordagens a custos mais baixos. Neste contexto, substâncias antioxidantes naturais, como polifenóis e flavonoides, derivados da dieta, capazes de induzir de γ -globina tornam-se essenciais. Este projeto visa avaliar o potencial GN e EGCG *in vitro*, na expressão HbF.

Objetivos específicos: Avaliar o potencial de GN e EGCG na indução de HbF em precursores eritróides e avaliar a resposta transcricional dos reguladores epigenéticos, *DNMT1*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*, a estes compostos

Resultados Esperados: Correlacionar o efeito da concentração de 100 ng/mL de GN e EGCG, individualmente e em co-exposição com indução da HbF, em precursores eritróides. Este projeto permitirá determinar o potencial dos compostos naturais altamente acessíveis na reativação da HbF humana.

3. Materiais e métodos

3.1. Linhas celulares

Células eritróides

A maioria das células eritróides na medula óssea têm uma morfologia distinta, mas a diferenciação que ocorre durante a maturação eritróide é observada mesmo em células que não apresentem características morfológicas normalmente associadas à linhagem eritróide.

O reticulócito é cerca de 20% maior (7-9 μm) do que o eritrócito diferenciado, apresenta RNA vestigial acoplado e o seu tempo de vida útil é de cerca de 3 dias, tempo necessário para ocorrer a enucleação (Ovchynnikova, Agliandolo, von Lindern, & van den Akker, 2018). Gasta dois destes dias na medula óssea e no terceiro aparece no sangue periférico, acabando o processo de maturação com o intuito de se tornar no eritrócito (Bessman, 1990; Ovchynnikova et al., 2018). Os reticulócitos representam assim uma coorte distinta de células.

Os reticulócitos podem desempenhar a função principal do transporte de oxigênio, contudo estas células não adotaram ainda a forma característica bicôncava dos eritrócitos maduros que garante a sua estabilidade e flexibilidade necessária ao suporte do *stress* do fluxo sanguíneo (Ovchynnikova et al., 2018).

Para adotar as características descritas acima, estas células têm de passar por um processo de maturação. O rearranjo do citoesqueleto pode ser um passo importante que permite a transição de um reticulócito não estruturado para um eritrócito morfológicamente bicôncavo e funcional (Ovchynnikova et al., 2018). Todavia, torna-se também cada vez mais claro que a maturação do reticulócito é uma interação entre processos intrínsecos e extrínsecos, incluindo formação de exossomas, interações com macrófagos e forças de cisalhamento induzidas pela circulação.

Mudanças estruturais e bioquímicas progressivas associadas:

- Alterações nos níveis de colesterol da membrana fosfolipídica;
- Alterações em vários níveis de enzima intracelular, incluindo glicose-6-fosfato desidrogenase;
- Síntese e acumulação citoplasmática da hemoglobina;
- Perda de organelos de síntese de proteínas e mitocôndria;
- Condensação de cromatina, contração e extrusão do núcleo;

- Perda da expressão de recetores da superfície membranar (por exemplo, recetor de transferrina) durante a diferenciação de precursores imaturos em eritrócitos maduros (Riley, Ben-Ezra, Goel, & Tidwell, 2001).

Embora o termo reticulócitos se refira a células eritróides enucleadas que ainda não estão totalmente bicôncavas, é preciso considerar que estes reticulócitos são uma população heterogénea de todas as fases entre reticulócitos e eritrócitos enucleados (Ovchynnikova et al., 2018). Por este motivo, no decurso deste trabalho experimental as células usadas em cultura serão designadas de precursores eritróides (**Figure 3-1**) e não reticulócitos.

Curiosamente, os protocolos de cultura de células eritróides são principalmente impulsionados pela capacidade intrínseca dos eritroblastos de se diferenciarem em precursores eritróides, mas não produzem eritrócitos totalmente bicôncavos, sublinhando a falta de fatores de maturação específicos (Ovchynnikova et al., 2018).

No laboratório, a diferenciação eritróide baseia-se na presença de RNA e outras substâncias na célula precursora, que se perdem durante a diferenciação na contagem manual de células por microscopia ótica, com o uso de um corante azul de metileno, que se liga ao RNA. No entanto, a precisão deste ensaio é comprometida pela sua natureza subjetiva, e pelo número limitado de células (200-1.000) que podem ser contadas num período de tempo razoável (Riley et al., 2001).

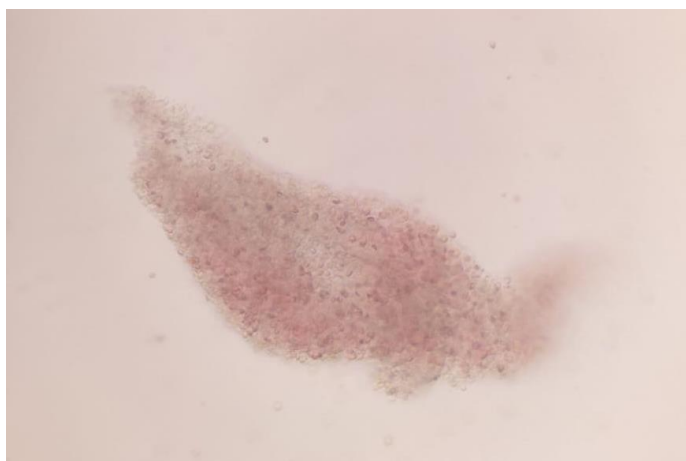


Figure 3-1 Células eritróides captadas com um microscópio invertido de contraste de fase, em ampliação x 20 após a primeira cultura.

Células K562

As células K562 (**Figure 3-2**) representam linhas celulares eritroleucémicas e são essenciais aos estudos hematológicos, uma vez que possuem um grande potencial de diferenciação, sendo assim facilmente adquiridas e mantidas em cultura (Andersson, Nilsson, & Gahmberg, 1979; Lozzio & Lozzio, 1979; Xu et al., 2015).

Estas células partilham características fenotípicas de progenitores eritróides embrionários e podem eventualmente originar células eritróides, como descrito acima, ou macrófagos, assim como linhagens de megacariócitos, como se trata de uma linha humana, é ideal para estudar *loci* de globinas humanas ζ e γ (Hb embrionária e HbF, respetivamente), denotando especificidade para alterações nas globinas da HbF (Andersson et al., 1979; Lozzio & Lozzio, 1979). Desta forma, torna-se mais simples o estudo dos ativadores e reguladores da expressão genética da hemoglobina fetal, que é da importância fundamental para a compreensão de mecanismos de doenças como a anemia falciforme.

Normalmente estas células apresentam um diâmetro de aproximadamente 20 μm , têm um citoplasma basofílico sem grânulos, e dois ou mais núcleos proeminentes, são arredondadas, não aderentes e capazes de crescer em suspensão (Andersson et al., 1979; Koefler & Golde, 1980).

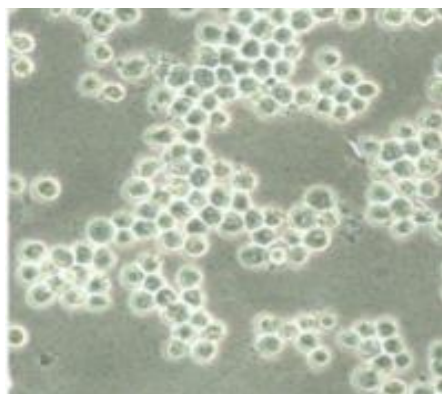


Figure 3-2 Imagem de microscópio de contraste de fase de células K562 ampliação x400 (adaptado de Xu et al., 2015)

Todavia, tratando-se de uma linhagem celular de origem cancerígena não representa todas as características inerentes a uma linhagem celular eritróide saudável, tendo de haver cuidado na interpretação dos resultados (Palaparthi et al., 2019).

3.2. Cultura celular e reagentes

As amostras de sangue periférico a partir das quais se procedeu ao isolamento de precursores eritróides tiveram parecer positivo das Comissões de Ética das instituições participantes para a recolha de dados. As células foram recolhidas de 2 investigadores voluntários (um de sexo feminino-dador 1 e outro do sexo masculino-dador 2), que assinaram o consentimento informado.

As amostras de sangue foram usadas para isolar as células de acordo com o Protocolo de Diferenciação de Células Eritróides (Fibach & Prus, 2005) (consultar Anexo I).

Cada célula cresce como um indivíduo, sendo não aderentes ao frasco de cultura e por isso cultivadas em suspensão.

Os precursores eritroides foram cultivados de acordo com o Anexo I e as células K562 de acordo com o Anexo II.

3.3. Compostos e exposição

Epigallocatequina galato (número CAS 989-51-5; Sigma-Aldrich) e Genisteína (CAS n.o 446-72-0; Sigma-Aldrich) foram comprados em cristais de 50 mg e 5 mg, respetivamente. Duas soluções de 5 mg/mL foram preparadas dissolvendo o EGCG em água ultra-pura e a genisteína dissolvida em DMSO. Uma vez que é muito pouco solúvel em água. Foi utilizado um volume de 50 µL como solução de trabalho, posteriormente diluído em 1:100 no meio de cultura MEM completo para os precursores eritróides. De forma a se obter a concentração final de EGCG e do GN de 100 ng/mL.

Ensaio clínico em humanos revistos no enquadramento teórico demonstraram que 400 mg e 800 mg de ingestão de EGCG, originam concentrações séricas máximas no níveis de 100 ng/ml a 400 ng/ml sem efeitos secundários graves identificados (Chow et al., 2003). A concentração escolhida de 100 ng/ml para as experiências baseou-se nestas evidências científicas assim como em estudos desenvolvidos anteriormente neste grupo (Matos, 2020). Desta forma, assegura-se que concentrações dos compostos são seguras e mimetizam a exposição celular *in vivo* de GN e EGCG.

Uma cápsula de 500 mL de hidroxureia, um composto indutor HbF usado como controlo positivo, foi diluída (em armário de segurança biológica) em 100 mL de água ultrapura, obtendo uma concentração de 5 mg/ml, distribuída em alíquotas e congelada a -20° C. Uma das alíquotas foi usada para fazer uma solução de stock de 0,5 mg/ml através da realização de uma diluição de 1:10 em meio MEM completo.

Como controlos negativos foram utilizados, os meios de cultura padrão de cada linha celular para o composto EGCG, assim como os mesmos meios de cultura diluídos com 500 ng/mL de DMSO, de forma a corresponder à concentração final da solução veículo em células expostas a GN.

Para a realização da exposição, os precursores eritróides foram expostos ao EGCG e a GN, individualmente e em regime de co-exposição, à concentração de 100 ng/ml, a 25 µg/ml hidroxureia (HYDREA®, USP), aos controlos negativos e foram semeadas em

placas de 6 poços, seguiu-se uma incubação em atmosfera humidificada de 5% de CO₂, a 37 °C durante 72 horas para ensaios e análises pós-tratamento.

Para a realização da exposição, as células K562 e os precursores eritróides foram expostas ao EGCG e a GN, individualmente e em regime de co-exposição, à concentração de 100 ng/ml, a 25 µg/ml hidroxireia (HYDREA®, USP), aos controles negativos e foram semeadas em placas de 6 poços, seguiu-se uma incubação em atmosfera humidificada de 5% de CO₂, a 37 °C durante 72 horas para ensaios e análises pós-tratamento.

No decurso deste trabalho, foram realizadas três réplicas biológicas para cada composto.

3.4. Ensaios de viabilidade celular

O ensaio de exclusão do azul de tripano (Sigma, St. Louis, USA), seguiu segundo o protocolo descrito pela ECACC (Sigma-Aldrich Co. LLC, 2016).

Este ensaio faz uso do hemocitómetro, ou câmara de *Newbauer*, no microscópio invertido, tendo como objetivo determinar o número de células viáveis presentes numa cultura celular em suspensão. Este ensaio assenta na base teórica de que as células vivas possuem uma membrana celular intacta e impermeável a determinados corantes como o azul de tripano, enquanto as não viáveis ou “mortas” permitem a sua passagem pela membrana.

Sob condições estéreis, removem-se 100 a 200µL da suspensão celular, adicionando-se igual volume da solução de azul tripano a 0,4% (fator de diluição igual a 2). Após alguns minutos de incubação, enche-se um dos lados da câmara com a suspensão celular (foram usados 10µL), colocando-se no microscópio para visualização com ampliação de 20x. Realizou-se então a contagem das células viáveis (translúcidas) e não viáveis (coloração citoplasmática azul), de forma a se calcular a totalidade e percentagem de células viáveis e não viáveis.

Tendo em conta que se faz uso de células eritróides, usaram-se dois métodos de contagem, nomeadamente o tradicional (consultar Anexo III) e o do quadrado central (consultar Anexo IV).

3.5. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído por microcentrifugação em coluna de sílica através do sistema SV Total RNA Isolation (Nº Z3101; Promega), de acordo com o procedimento especificado pelo fabricante.

A extração de RNA Total extrai, isola e purifica pequenas quantidades de RNA total presente numa cultura celular definem-se 4 etapas essenciais como a ruptura da membrana celular, a desnaturação das proteínas nucleares, a inativação das ribonucleases (RNases) endógenas e a remoção dos contaminantes (DNA e proteínas).

As duas linhagens celulares foram previamente centrifugadas de forma a isolar os *pellets*. Estes foram então centrifugados duas vezes com 10mL de PBS, descartando-se o sobrenadante (com detritos celulares).

O processo de extração iniciou-se com a adição de 175µL do tampão lise RNA às células lavadas e as mesmas foram homogeneizadas. A homogeneização é feita com um reagente que contém dodecil sulfato de sódio, guanina tiocianato e β-mercaptoetanol. O dodecil sulfato de sódio atuou na disrupção das membranas celulares e em conjunto com a guanina tiocianato, desnatura as proteínas nucleares que envolvem o RNA. O β-mercaptoetanol inativou as RNases (prevenindo a digestão do RNA) através da redução das pontes de dissulfureto da estrutura proteica, com desnaturação irreversível destas enzimas.

Posteriormente, adicionou-se 350µL de tampão de diluição de RNA a 175µL do lisado, misturando-se por inversão do tubo. Colocou-se então num banho-maria de 70°C por 3 min e centrifugou-se de 12.000 a 14.000 x g por 10 min à temperatura ambiente. O tampão de diluição do RNA precipita as proteínas, mantendo o RNA isolado em solução. Quando ocorre a centrifugação desta mistura garante-se a remoção dos restos celulares e proteínas precipitadas.

O sobrenadante foi transferido para a coluna de rotação, onde se adicionou 200 µL de etanol 95%, precipitando-se seletivamente o RNA que se deposita e foi adsorvido na membrana de sílica presente nas fibras da coluna de rotação, durante a seguinte centrifugação de 1min, 12.000 a 14.000 x g.

De seguida, descartou-se o líquido do tubo coletor (com impurezas e detritos celulares) e voltou-se a colocar a coluna de rotação neste. Adicionou-se 600µL da solução de lavagem de RNA ao conjunto da coluna de rotação, centrifugando-se novamente consoante as condições mencionadas acima. A solução de lavagem de RNA permitiu remover os sais e impurezas presentes.

Seguiu-se o tratamento com a mistura da enzima DNase (previamente preparada para cada amostra com 40µL de tampão *Yellow Core*, 5µL de MnCl₂ a 0,09M e 5µL da enzima DNase I), para digestão do DNA genómico, diminuindo eventual contaminação e interferência deste na futura realização de técnica de amplificação molecular. Foram

adicionados 50 µL da mistura de DNase diretamente a coluna de rotação de cada amostra e incubou-se durante 15 a 20 minutos à TA.

Após esta incubação, adicionou-se 200 µL de Solução de DNase *Stop* à coluna de rotação e centrifugou-se a 12.000–14.000 x g durante 1 min, para interromper a ação da enzima e prevenir que ocorra dano celular. Realizou-se primeiramente uma lavagem com 600 µL de solução de lavagem de RNA e uma segunda com 250 µL desta mesma solução, e centrifugou-se a alta velocidade por 2 min. As duas últimas lavagens garantem a remoção de impurezas e o RNA total será eluído com 100 µL de água livre de RNA para um tubo de 1,5 mL, centrifugando-se a 12.000–14.000 x g por 1 min ficando pronto a utilizar ou armazenar a -70°C.

3.6. Quantificação de RNA total e conversão em cDNA

Foi determinada a concentração das amostras de RNA total para as células K562 através de um ensaio baseado na fluorescência, com um kit de ensaio Qubit™ RNA HS (Q32852, Thermo Fisher Scientific Inc.) no fluorómetro Qubit™ 3.0 (Q33216, Invitrogen).

O reagente Qubit® RNA HS contém um composto fluorescente que quando se liga ao RNA vai aumentar a sua fluorescência que foi analisada através de um fluorómetro e aumentou consoante a concentração de RNA presente na amostra.

Primeiramente, preparou-se uma diluição de 1 µL do reagente Qubit® RNA HS com 199 µL do tampão Qubit® RNA, a partir desta solução foram retirados 190µL para dois tubos de ensaio Qubit® de forma a termos uma solução padrão. Adicionou-se então 10µL de cada padrão Qubit® no respetivo tubo e 1 µL de amostra no respetivo tubo de ensaio. Vortexaram-se então todos os tubos durante 2 a 3 segundos e incubou-se 2 minutos à temperatura ambiente.

O registo das concentrações foi efetuado até 3 horas após a incubação. Uma vez que o equipamento permite definir a quantidade inicial de cada amostra no tubo (1µL), e pode-se escolher a unidade de concentração desejadas (ng/mL) sendo feito o cálculo automático da concentração de RNA presente em cada amostra.

De cada amostra retirou-se a quantidade celular correspondente a 2,0µg de RNA total para ser submetido à conversão a DNA codificante (cDNA), usando os reagentes Applied Biosystems™ TaqMan™ Reverse Transcriptase (Nº 4304134, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) que é a enzima de transcrição reversa (RT) necessária à conversão, com primers de hexâmeros aleatórios, numa reação em tempo real de pequena escala (20µL), seguindo as instruções específicas do fabricante.

Cada reação é preparada com – 2,0 µL de tampão 10x para RT; 1,4 µL de MgCl₂ a 25 mM; 4,0 µL de dNTP mix a 10mM (cada dNTP a 2,5mM); 1,0 µL de ditiotreitol ou DTT (estabilizador a 100mM); 1,0 µL de inibidor de RNase (20 U/µL); 1,0 µL de RT MultiScribe™ (50 U/µL) e 1,0 µL de primers de hexâmeros aleatórios (50 µM).

Todos estes componentes foram preparados como uma solução principal para todas as reações de conversão e posteriormente dispensada para tubos de PCR de 0,5mL. A quantidade de RNA calculada foi adicionada a cada tubo de forma a resultar num volume final de 20 µL.

Para esta reação usou-se o termociclador Bio-Rad iCycler®, nas seguintes condições de 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 30 minutos, 95°C durante 5 minutos e paragem a 4°C.

3.7. PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado no sistema de Detecção de PCR em tempo real CFX Connect™ (Bio-rad), com uso do kit Supermix iTaq™ Universal SYBR® Green (Bio-Rad) e dos *primers* específicos listados na **Tabela 3-1**. O volume final foi de 20µL e seguiram-se as instruções especificadas pelo fabricante para realização desta técnica.

A Supermix iTaq™ Universal SYBR® Green é uma solução comercial pronta que incorpora enzima DNA polimerase iTaq, MgCl₂, o corante SYBR Green I, agentes que melhoram as condições da reação, dNTPS (desoxirribonucleótidos tri-fosfato) e uma mistura de corantes de referência passivos. Para cada reação, basta adicionar a Supermix iTaq™ Universal SYBR®, a cadeia molde de DNA a amplificar e os *primers* específicos de forma a se detetar os genes de interesse.

O corante SYBR Green I é um fluorocromo que se liga à cadeia dupla de DNA à medida que esta é sintetizada. Com um maior número de ligações formadas, a intensidade da fluorescência irá aumentar de acordo com a concentração de DNA amplificado.

A reação de PCR pode ser dividida em 4 fases, a fase linear ou base, a exponencial, a log-linear ou exponencial e a fase de plateau. Durante a fase linear, os primeiros 10 a 15 ciclos, inicia-se a emissão de fluorescência a cada ciclo, que deverá não ultrapassar o nível de fundo, denominada de fluorescência de fundo ou base. Na fase exponencial, a fluorescência emitida atinge um limiar onde é significativamente maior que os níveis de fluorescência de fundo. O ciclo de PCR em que ocorre este fenómeno dá-se então o nome de limiar de ciclo ou *cycle threshold* (Ct). A quantidade de DNA é inversamente

proporcional a este valor, ou seja, quanto maior a quantidade de DNA na amostra inicial, mais rapidamente aumenta o sinal fluorescente e menor será o Ct (Adams, 2020).

Durante a fase log-linear ou exponencial dá-se um período de amplificação linear com o produto do PCR a duplicar no fim de cada ciclo. Finalmente a fase de plateau é atingida quando os componentes da reação se tornam limitados e a intensidade de fluorescência não tem utilidade (Adams, 2020).

O qRT-PCR foi usado para apurar o nível de expressão génica de moduladores epigenéticos (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), com recurso ao gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para normalização dos dados.

O mecanismo de modulação epigenético individual e sinérgico da EGCG e GN foi avaliado por alterações na expressão génica das DNMTs e HDACs em todos os tratamentos realizados.

As condições aplicadas em cada ciclo no termociclador Bio-Rad iCycler® foram as seguintes: 95°C durante 2 minutos (ativação da polimerase); 95°C durante 30 segundos (desnaturação); 55°C por 30 segundos (*annealing*), 72°C por 1 minuto (elongação) e por fim, 72°C durante 15 min (elongação final). Após a realização de 45 ciclos, analisaram-se as curvas de desnaturação para descartar a formação de dímeros de *primers* e a presença de contaminações.

A quantificação relativa, através dos valores de Ct, é um método de análise da técnica de PCR que demonstra a diferença entre a expressão dos genes de interesse em relação a um gene de referência (GAPDH).

A quantificação relativa é obtida pela normalização da média dos Cts com a média Ct do gene GAPDH. Os níveis de transcrito ou mRNA foram expressos em percentagem relativa e o cálculo da diferença relativa na expressão génica foi realizado através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

No tratamento com a GN ou na co-exposição com a EGCG e GN, a solução veículo (DMSO) foi usada como calibrador e nos restantes tratamentos, o calibrador foi o controlo negativo (células não tratadas). As reações foram realizadas em triplicados para conseguir garantir uma menor variação intra-ensaio, permitindo que exista maior poder estatístico na representatividade do valor de Ct obtido para cada amostra. Os valores obtidos dos três replicados por amostra permitiram calcular a média e o desvio padrão, foram excluídos os valores cujo desvio padrão era superior a 0.04.

Tabela 3-1 *Primers* específicos para qRT-PCR

FUNÇÃO	GENE	NÚMERO ACESSO GENBANK		SEQUÊNCIA DO PRIMER	TAMANHO (PB)	TEMPERATURA MELTING (°C)
HOUSEKEEPING	GAPDH⁽¹⁾	NM_001	Forward (5'→3')	GAGTCAACGGATTTGGTCGTA	295	54,70
		357943.2	Reverse (3'→5')	GCAGAGATGATGACCCTTTTG		53,70
MODULADORES EPIGENÉTICOS	DNMT1⁽²⁾	NM_001	Forward (5'→3')	CCTCCAAAAACCCAGCCAAC	101	56,90
		379.4	Reverse (3'→5')	TCCAGGACCCTGGGGATTTTC		59,00
	DNMT3A⁽²⁾	NM_022	Forward (5'→3')	CCAACATCGAATCCATGAAA	140	50,70
		552.5	Reverse (3'→5')	CTTGCGCTTGCTGATGTAGT		55,70
	DNMT3B⁽²⁾	NM_175	Forward (5'→3')	CGAATTTTACCACCTGCTGAATT	59	53,90
		850.3	Reverse (3'→5')	AGAACGGCCGGTCATCAC		57,80
	HDAC1⁽³⁾	NM_004	Forward (5'→3')	GGAAATCTATCGCCCTCACA	168	54,30
		964.3	Reverse (3'→5')	AACAGGCCATCGAATACTGG		54,80
	HDAC2⁽³⁾	NM_001	Forward (5'→3')	CTGTTAATTGGGCTGGAGGA	94	54,60
		527.4	Reverse (3'→5')	AATTCAAGGATGGCAAGCAC		53,90
	HDAC3⁽³⁾	NM_001	Forward (5'→3')	GGACCAGATCCTCCAGACAA	116	56,10
		355040.2	Reverse (3'→5')	CAGCCTCATCAGTCCTGTCA		56,50
	HDAC8⁽³⁾	NM_001	Forward (5'→3')	GGTGACGTGTCTGATGTTGG	165	55,90
		166418.2	Reverse (3'→5')	AGCTCCCAGCTGTAAGACCA		58,20

(1) Obtido a partir de *Matos, 2020*

(2) Obtido a partir de *D. Zhang, An, Li, & Zhang, 2019*

(3) Obtido com recurso ao software *Primer3* e *desenhados* especificamente para este estudo

3.8. Métodos estatísticos

A análise estatística foi realizada com recurso ao software *R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.*

Os resultados das contagens de células eritróides foram analisados através do teste de Shapiro de forma a assegurar se os dados seguiam uma distribuição aproximadamente normal, posteriormente avaliou-se a variância com teste de Levene para as populações normais e o teste de Bartlett para as que não verificavam a normalidade. Para averiguar as diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamentos recorreu-se a uma análise unidirecional da variação (ANOVA) com teste post hoc de Tukey para todos os grupos para as populações normais e os seus equivalentes para as restantes, teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Wilcox.

As diferenças significativas entre os tratamentos, foram efetuadas com recurso aos valores médios contra o controlo (para o EGCG) e contra o veículo (para o GN) foram avaliadas utilizando o teste T seguido de uma análise unidirecional da variação (ANOVA) com teste post hoc de Tukey para todos os grupos. Os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão. Os valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Todos os gráficos foram criados com o Microsoft Excel 2016.

4. Resultados

4.1. Primeira exposição dos precursores eritróides

Na execução do primeiro ensaio as células foram cultivadas apenas em meio de fase I devido à ausência de holo-transferrina. Como é possível observar na **Tabela 4-1**, logo após a colheita de sangue foi executada a primeira contagem que demonstra um número ligeiramente superior ao registado para após 7 dias de incubação em meio de fase I. No entanto, como não foram contabilizadas as células mortas não é possível fazer a comparação em termos de viabilidade celular. Após a exposição aos compostos principais em separado é possível observar que existiram fenómenos diferentes entre os dois sexos. As células recolhidas do sexo feminino aumentaram a sua viabilidade celular, sendo esse aumento superior no composto EGCG. Em oposição as células recolhidas do sexo masculino tiveram um comportamento atípico, uma vez que diminuíram a sua viabilidade na presença de EGCG e aumentaram na presença de GN. Na **Tabela 4-1**, NA designa não aplicável, uma vez que os dados não foram recolhidos.

Tabela 4-1 Resultados das contagens para o primeiro ensaio em células eritróides

	APÓS COLHEITA						ANTES EXPOSIÇÃO					
	Dador 1			Dador 2			Dador 1			Dador 2		
	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
MÉDIA	4	8,75	12,75	3,5	3,25	6,75	1,5	NA	NA	3,5	NA	NA
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)	2550			1350			300			1700		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)	NA			NA			NA			NA		
VIABILIDADE	0,31372549			0,518518519			NA			NA		
	APÓS EXPOSIÇÃO A EGCG						APÓS EXPOSIÇÃO A GN					
	Dador 1			Dador 2			Dador 1			Dador 2		
	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
MÉDIA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)	1500			1100			1800			1100		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)	NA			NA			NA			NA		
VIABILIDADE	0.8			0,363636364			0,722222222			0,636363636		

4.2. Segunda exposição dos precursores eritróides

No segundo ensaio, realizou-se a conversão da apo-transferrina em holo-transferrina. De acordo com a **Tabela 4-2** observa-se que só existem disponíveis os dados para as contagens antes da exposição ao composto, uma vez que as células encontravam bastante contaminadas. E que a incubação nos meios de fase I e II resultou num pequeno aumento em relação ao primeiro ensaio.

Tabela 4-2 Resultados das contagens para o segundo ensaio em Células Eritróides

	ANTES EXPOSIÇÃO					
	Dador 1			Dador 2		
	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
MÉDIA	6,4	NA	NA	5,8	NA	NA
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)	650			1350		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)	1900			1300		
VIABILIDADE	NA			NA		

4.3. Terceira exposição dos precursores eritróides

No terceiro ensaio foi utilizada apo-transferrina comercial em substituição da convertida no laboratório, obtendo-se os resultados inerentes à **Tabela 4-3**. De acordo com os dados recolhidos, é possível inferir que independentemente do sexo do indivíduo, para as células eritróides recolhidas, existiu um aumento do valor das células vivas e conseqüentemente da sua totalidade, antes da exposição, quando comparada com os compostos EGCG e GN, individualmente e em co-exposição, é possível ainda observar que esse aumento foi menos considerável quando as células foram expostas ao tratamento padrão (HU). Ao compararmos a viabilidade celular, ou seja, a razão entre células viáveis e o número total, verifica-se que este baixou em relação à exposição aos compostos individualmente e em co-exposição, novamente este decréscimo foi menos considerável do que o observado na exposição ao tratamento padrão.

Tabela 4-3 Resultados das contagens para o terceiro ensaio em Células Eritróides

	ANTES DA EXPOSIÇÃO						APÓS EXPOSIÇÃO A GN							
	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total		
MÉDIA	3,4	1	4,4	5	0,8	5,8	11,8	3,6	15,4	10,4	2,8	13,2		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)		265			500			3250			2650			
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)		340			340			1200			1300			
VIABILIDADE		0,772727273			0,862068966			0,623376623			0,636363636			
	APÓS EXPOSIÇÃO A EGCG						APÓS EXPOSIÇÃO A GN E EGCG							
MÉDIA	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total		
	11,2	3	14,2	9,8	2,4	12,2	11	1,8	12,8	8,8	2,6	11,4		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)		3050			2500				2550			2350		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)		1000			1100				1300			1000		
VIABILIDADE		0,633802817			0,636363636			0,703125			0,614035088			
	APÓS EXPOSIÇÃO A HU						APÓS EXPOSIÇÃO AO VEÍCULO							
MÉDIA	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total		
	8,4	4,2	12,6	7,4	4,2	11,6	7,4	2,4	9,8	5,8	2,6	8,4		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)		2550			2500				1900			1650		
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)		1200			800				1100			900		
VIABILIDADE		0,507936508			0,517241379			0,551020408			0,571428571			
	CONTROLO DE EXPOSIÇÃO													
MÉDIA	Vivas	Dador 1 Mortas	Total	Vivas	Dador 2 Mortas	Total								
	7,4	7,4	7,4	9	2,2	11,2								
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO TRADICIONAL)		2800			2150									
Nº CÉLULAS /ML (MÉTODO CENTRAL)		1200			1300									
VIABILIDADE		0,661764706			0,660714286									

4.4. Análise Estatística das contagens

4.4.1. Análise dos dados das contagens de Células Eritróides

Os valores p para o teste de Shapiro (Tabela 4-4 e Tabela 4-5) às diferentes populações de células são superiores ao valor alfa (0,05), logo não existem diferenças estatisticamente significativas para assumir uma hipótese diferente da hipótese 0 (H0) que considera uma distribuição normal. Pode-se assumir a normalidade. Em oposição na população de células mortas para ambos os dadores, não existe evidências estatisticamente significativas para assumir a normalidade (valores a vermelho), uma vez que o valor p é inferior ao alfa. A partir deste ponto, os testes estatísticos a aplicar às populações irão diferir.

Tabela 4-4 Teste de Shapiro dador 1

	W	VALOR P
VIVAS	0.94857	0.1548
MORTAS	0.91829	0.02423
TOTAL	0.96229	0.3539

Tabela 4-5 Teste de Shapiro dador 2

	W	VALOR P
VIVAS	0.93274	0.05807
MORTAS	0.90423	0.01067
TOTAL	0.93479	0.06589

Teste de Bartlett

É aplicado para testar a homogeneidade das variações em k amostras, onde k pode ser mais de dois. É adaptado para dados normalmente distribuídos. Como os valores p calculados são superiores ao nível de significância (Tabela 4-6 e Tabela 4-7), considera-se que não existem evidências estatisticamente significativas que sugiram que o desvio padrão seja diferente para os diferentes grupos de tratamento dentro das diferentes populações dos dadores.

Tabela 4-6 Teste de Bartlett dador 1

	BARTLETT'S K ²	DF	VALOR P
VIVAS	10.035	5	0.07426
TOTAL	8.0322	5	0.1545

Tabela 4-7 Teste de Bartlett dador 2

	BARTLETT'S K ²	DF	VALOR P
VIVAS	8.0858	5	0.1516
TOTAL	4.9437	5	0.4228

Teste ANOVA

Quando o valor p é inferior ao nível de significância (Tabela 4-8 e Tabela 4-9, valores a vermelho), pode-se afirmar que existem diferenças significativas entre as contagens de células realizadas para os diferentes grupos de tratamento (diferentes exposições) dentro de cada população celular.

Tabela 4-8 Teste ANOVA dador 1

		DF	SUM SQ	MEAN SQ	F-VALUE	P-VALUE
VIVAS	group	5	79,47	15,89	2,649	0,0482
	residuals	24	144	6		
TOTAL	group	5	89,87	17,973	2,63	0,0494
	residuals	24	164	6,833		

Tabela 4-9 Teste ANOVA dador 2

		DF	SUM SQ	MEAN SQ	F-VALUE	P-VALUE
VIVAS	group	5	70.67	14.133	2.675	0.0465
	residuals	24	126.80	5.283		
TOTAL	group	5	64.67	12.933	2.217	0.0857
	residuals	24	140.00	5.833		

Teste de Tukey

Quando se faz o teste Tukey, a variação é estimada a partir de todo o conjunto de dados, como uma estimativa do conjunto. Se as variações populacionais forem as mesmas em todos os grupos, essa estimativa é muito mais robusta e precisa, do que o estimado individualmente. Além disso, ajusta os valores p para testes múltiplos, de modo que a taxa de erro em termos do conjunto seja controlada (probabilidade de obter pelo menos um falso positivo entre os testes realizados). Na Tabela 4-10 e Tabela 4-11

Tabela 4-11 , *Diff* designa a diferença entre as médias dos dois tratamentos em teste; *lwr* e *upr*: o ponto inferior e superior do intervalo de confiança, respetivamente, a 95% ; *p adj*: valor p após ajuste para as comparações múltiplas. É possível ainda observar que existe um valor destacado a vermelho, de forma a demonstrar a existência de significância entre os grupos de tratamento comparados para o dador 1. No grupo de consideração do número total de células observam-se diferenças entre a genisteína e o veículo. Para o dador 2 não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4-10 Teste de Tukey dador 1

		DIFF	LWR	UPR	P-ADJ
VIVAS	EGCG-C	0.2	-4.589999	4.989999	0.9999942
	GE-C	0.0	-4.789999	4.789999	1.0000000
	GN-C	0.8	-3.989999	5.589999	0.9949983
	HU-C	-2.6	-7.389999	2.189999	0.5581250
	V-C	-3.6	-8.389999	1.189999	0.2234698
	GE-EGCG	-0.2	-4.989999	4.589999	0.9999942
	GN-EGCG	0.6	-4.189999	5.389999	0.9987192
	HU-EGCG	-2.8	-7.589999	1.989999	0.4799108
	V-EGCG	-3.8	-8.589999	0.989999	0.1782901
	GN-GE	0.8	-3.989999	5.589999	0.9949983
	HU-GE	-2.6	-7.389999	2.189999	0.5581250
	V-GE	-3.6	-8.389999	1.189999	0.2234698
	HU-GN	-3.4	-8.189999	1.389999	0.2765308
	V-GN	-4.4	-9.189999	0.389999	0.0847327
	V-HU	-1.0	-5.789999	3.789999	0.9861357
TOTAL	EGCG-C	0.6	-4.511826	5.7118264	0.9990635
	GE-C	-0.8	-5.911826	4.3118264	0.9963095
	GN-C	1.8	-3.311826	6.9118264	0.8810668
	HU-C	-1.0	-6.111826	4.1118264	0.9896545
	V-C	-3.8	-8.911826	1.3118264	0.2332520
	GE-EGCG	-1.4	-6.511826	3.7118264	0.9553205
	GN-EGCG	1.2	-3.911826	6.3118264	0.9767489
	HU-EGCG	-1.6	-6.711826	3.5118264	0.9236731
	V-EGCG	-4.4	-9.511826	0.7118264	0.1208221
	GN-GE	2.6	-2.511826	7.7118264	0.6232039
	HU-GE	-0.2	-5.311826	4.9118264	0.9999958
	V-GE	-3.0	-8.111826	2.1118264	0.4756539
	HU-GN	-2.8	-7.911826	2.3118264	0.5487250
	V-GN	-5.6	-10.711826	-0.4881736	0.0260346
	V-HU	-2.8	-7.911826	2.3118264	0.5487250

Tabela 4-11 Teste de Tukey dador 2

		DIFF	LWR	UPR	P-ADJ
VIVAS	EGCG-C	0.8	-3.694836	5.2948355	0.9932845
	GE-C	-0.2	-4.694836	4.2948355	0.9999921
	GN-C	1.4	-3.094836	5.8948355	0.9251163
	HU-C	-1.6	-6.094836	2.8948355	0.8763002
	V-C	-3.2	-7.694836	1.2948355	0.2736504
	GE-EGCG	-1.0	-5.494836	3.4948355	0.9816143
	GN-EGCG	0.6	-3.894836	5.0948355	0.9982630
	HU-EGCG	-2.4	-6.894836	2.0948355	0.5749693
	V-EGCG	-4.0	-8.494836	0.4948355	0.1012568
	GN-GE	1.6	-2.894836	6.0948355	0.8763002
	HU-GE	-1.4	-5.894836	3.0948355	0.9251163
	V-GE	-3.0	-7.494836	1.4948355	0.3384321
	HU-GN	-3.0	-7.494836	1.4948355	0.3384321
	V-GN	-4.6	-9.094836	-0.1051645	0.0427429
	V-HU	-1.6	-6.094836	2.8948355	0.8763002

População de células mortas

O Teste de Levene é uma alternativa ao teste de Bartlett quando os dados não são normalmente distribuídos.

A partir da **Tabela 4-12** e **Tabela 4-13**, pode ver-se que o valor p não é inferior ao nível de significância de 0,05 para nenhum dos dadores. Isto significa que não existem evidências estatisticamente significativas que sugiram que o desvio padrão seja diferente para os grupos de tratamento dentro da população de células mortas, que não tem distribuição normal, mas variações iguais.

Tabela 4-12 Teste de Levene dador 1

	DF	F	VALOR P
GROUP	5	1.3	0.297
	24		

Tabela 4-13 Teste de Levene dador 2

	DF	F	VALOR P
GROUP	5	1.1077	0.3824
	24		

Teste de Kruskal-Wallis

A alternativa não paramétrica à ANOVA é o teste de Kruskal-Wallis, que pode ser usado quando os pressupostos da ANOVA não são cumpridos, como verificado pelo teste de Shapiro (Tabela 4-4 e Tabela 4-5).

Uma vez que o valor p é inferior ao valor alfa 0,05 para o dador 1 (Tabela 4-14), podemos concluir que existem diferenças estatisticamente significativas entre as contagens de células realizadas para os diferentes grupos de tratamento (diferentes exposições), o mesmo não se verifica para o dador 2 (

Tabela 4-15).

Tabela 4-14 Teste de Kruskal-Wallis dador 1

		DF	CHI-SQ	P-VALUE
MORTAS	group	5	11.474	0.04275

Tabela 4-15 Teste de Kruskal-Wallis dador 2

		DF	CHI-SQ	P-VALUE
MORTAS	group	5	7.823	0.1663

De forma a averiguar as diferenças entre os grupos de tratamento, executou-se o teste de Wilcoxon alternativa não paramétrica ao teste post hoc de Tukey (Tabela 4-16), onde é possível observar que não existem diferenças entre os grupos de tratamento.

Tabela 4-16 Teste emparelhado de Wilcoxon

		C	EGCG	GE	GN	HU
MORTAS	EGCG	0.74	-	-	-	-
	GE	0.33	0.43	-	-	-
	GN	0.16	0.68	0.16	-	-
	HU	0.33	0.43	0.16	0.68	-
	V	0.68	0.68	0.43	0.16	0.30

De acordo com o analisado pode-se afirmar que os tratamentos na sua globalidade não afetaram a viabilidade da linhagem celular analisada, não se mostrando como citotóxicos, contudo a genisteína na população total do dador 1 demonstrou capacidade para alterar os valores médios da população celular.

Como explicitado anteriormente a quantificação da extração de RNA foi realizada de acordo com ensaio com o reagente Qubit™, para as células precursoras de eritroides não se conseguiu detetar as concentrações de RNA e por isso não se prosseguiu com a análise transcricional dos genes reguladores epigenéticos por qRT-PCR, por oposição para a linhagem de células imortalizadas K562, obtiveram-se as concentrações de RNA que podem ser consultadas no Anexo V.

4.5. Resultados de qRT-PCR da Epigenética das linhagem K562

4.5.1. Gene *DNMT1*

No **Gráfico 4-I** da análise da regulação do gene *DNMT1* é possível observar uma diminuição da expressão do mesmo quando existe uma exposição à genisteína durante 24h ($p= 0.02854$), assim como para a co-exposição às 48h ($p = 0.0022$).

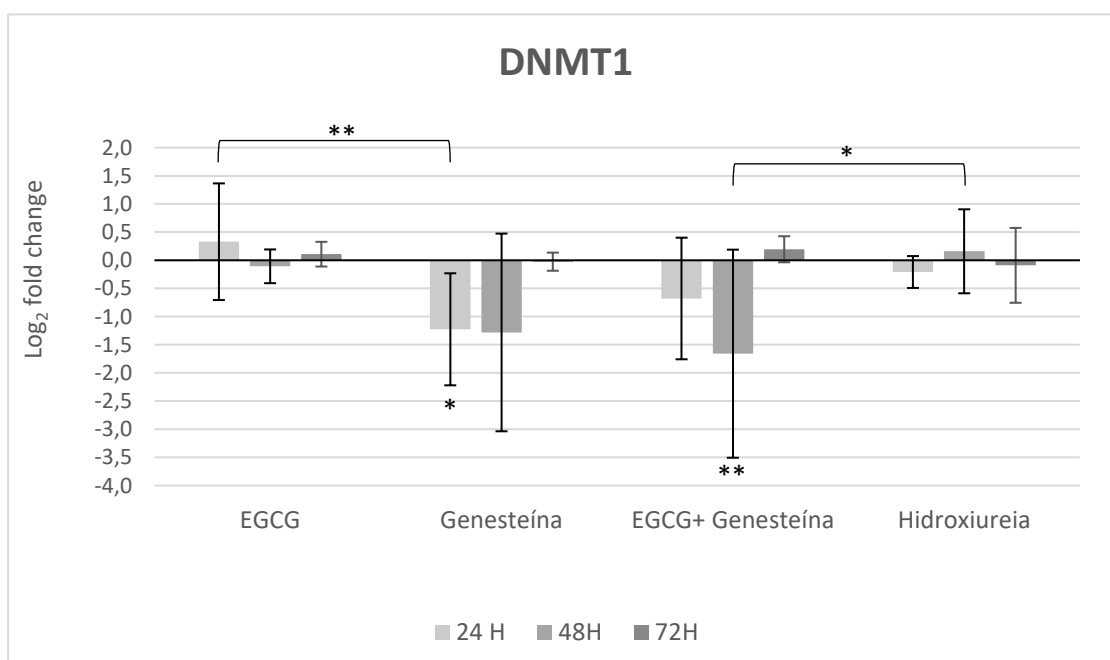


Gráfico 4-I Análise qRT-PCR de *DNMT1*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72 h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *DNMT1*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controlo foi comparado com EGCG, os valores do teste T, são ilustrados como: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.5.2. Gene *DNMT3a*

No **Gráfico 4-II** do gene *DNMT3a* pode ser observar que não existiram diferenças estatisticamente significativas a assinalar, independentemente do composto usado para exposição ou a duração da mesma.

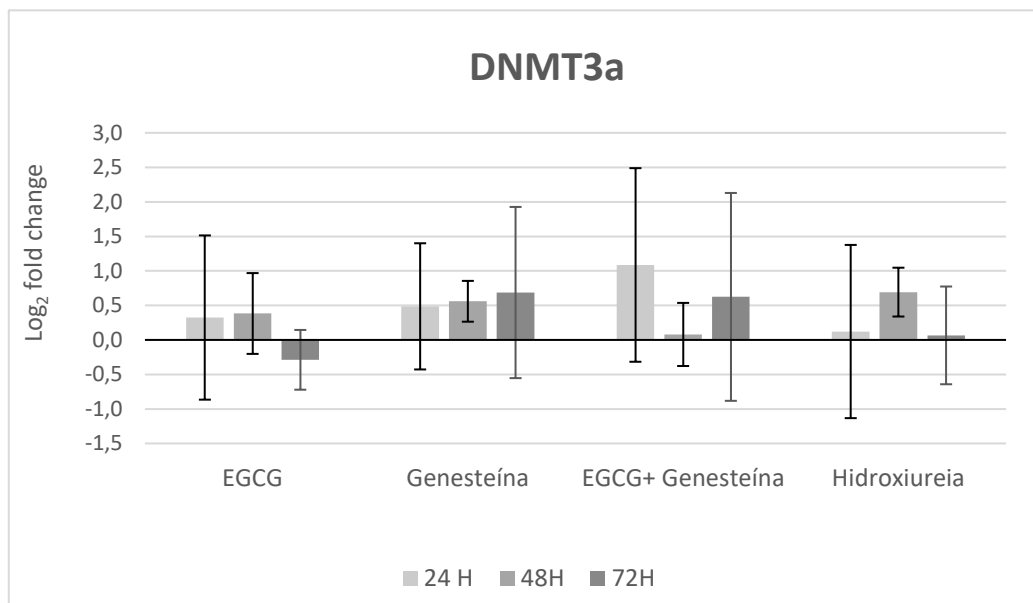


Gráfico 4-II Análise qRT-PCR de *DNMT3a*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *DNMT3a*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controlo foi comparado com EGCG, não existem valores significativos a assinalar.

4.5.3. Gene *DNMT3b*

Para a *DNMT3b de novo*, de acordo **Gráfico 4-III** com o uma co-exposição a ambos os compostos de estudo por um período de 48h resulta uma diminuição significativa da expressão ($p=0.004329$) desta metilase *de novo*, não sendo qualquer outro composto ou tempo de exposição promotor deste tipo de resposta.

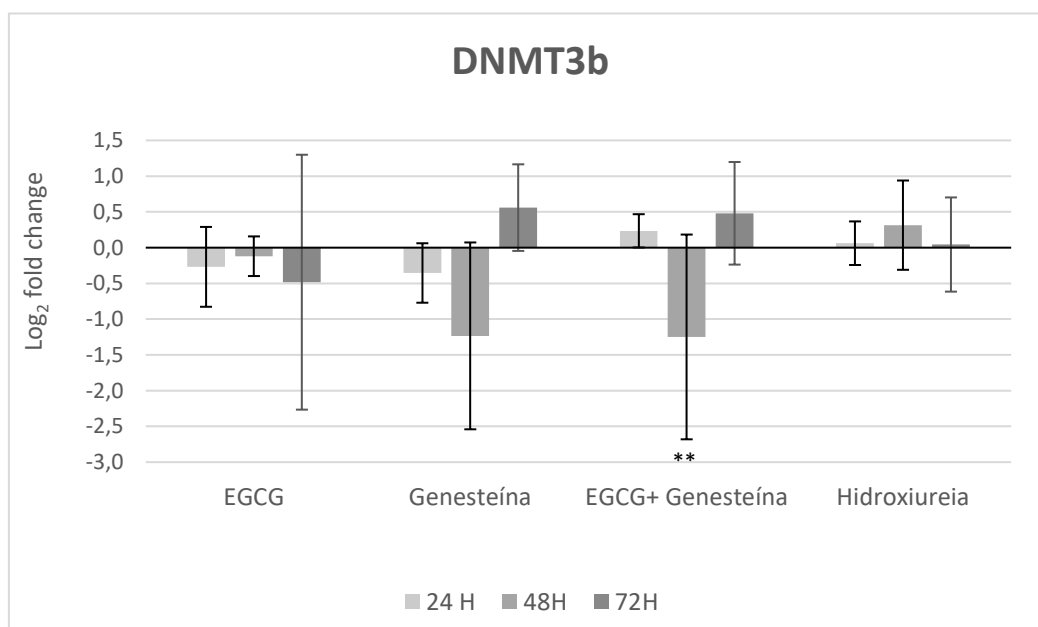


Gráfico 4-III Análise qRT-PCR para *DNMT3b*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72 h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *DNMT3b*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controle foi comparado com EGCG, os valores do teste T, são ilustrados como: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

4.5.4. Gene *HDAC1*

Quanto aos resultados do *real time* realizado para o gene *HDAC1* (**Gráfico 4-IV**), para os diferentes períodos de exposição obtiveram-se respostas diferentes, os compostos naturais induziram sempre uma diminuição da expressão dos níveis de mRNA de *HDAC1*, o EGCG às 24H ($p=0.004329$) e a genisteína às 72H ($p=0.01393$). A hidroxiureia, tratamento de padrão resultou num aumento da expressão do gene tanto às 48H como às 72H, sendo esta última bastante mais significativa em relação ao controlo. Para o período de exposição de 72H, a resposta de aumento de expressão, pela hidroxiureia foi significativamente superior à subregulação induzida pela genisteína.

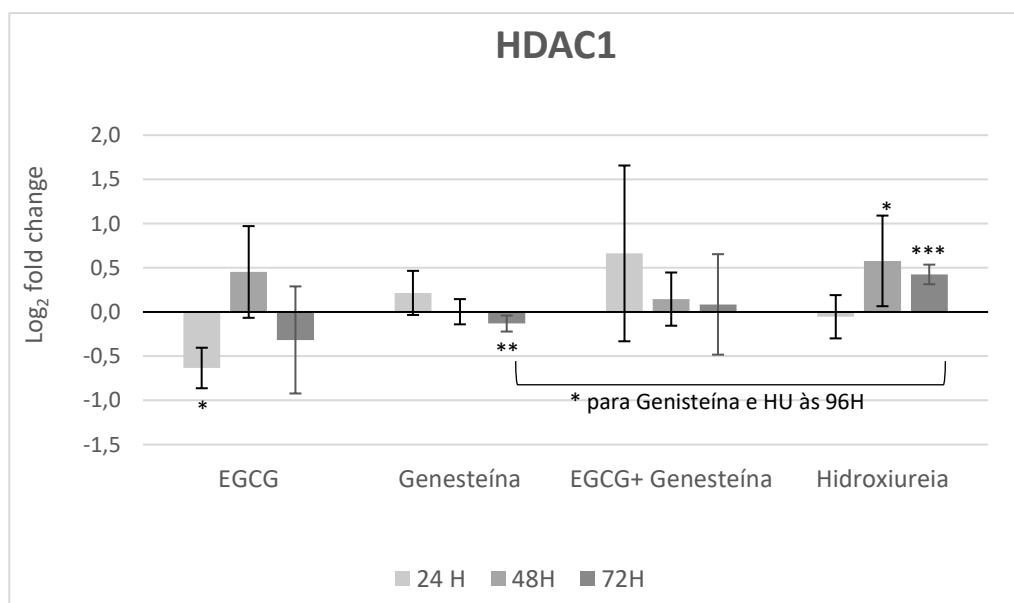


Gráfico 4-IV Análise qRT-PCR para *HDAC1*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72 h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *HDAC1*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controlo foi comparado com EGCG, os valores do teste T, são ilustrados como: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

4.5.5. Gene *HDAC2*

No **Gráfico 4-V** podemos observar as diferentes alteração aos níveis de expressão de mRNA associados ao gene *HDAC2*, o composto EGCG induziu um aumento da expressão após o período de 72H ($p=0.045$), já a genisteína demonstrou uma bipolaridade de resposta dependente do tempo de exposição, sendo que às 48H é responsável de forma significativa ($P=0.0002$) pela diminuição da expressão do gene, no entanto, se o período for estendido às 72H provoca o aumento da expressão ($p=0.002165$). A exposição conjunta a EGCG e genisteína, foi responsável pelo aumento da expressão dos níveis de *HDAC2* às 72H ($p=0.03077$). Quanto ao tratamento com HU, este não demonstrou alterações significativas na expressão deste gene. Em relação aos comportamentos descritos para o período de exposição de 72H é possível afirma que o aumento da expressão da genisteína foi significativamente superior em relação à provocada pelo EGCG ($p=0.0015637$) e à provocada pela co-exposição ($p=0.0040258$).

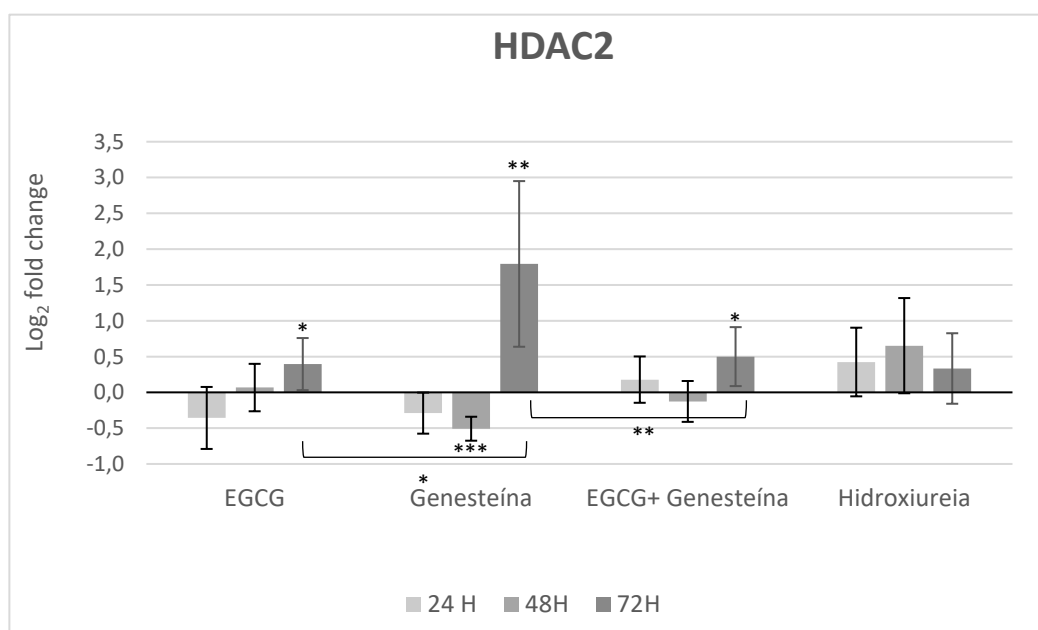


Gráfico 4-V Análise qRT-PCR para *HDAC2*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72 h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *HDAC2*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controle foi comparado com EGCG, os valores do teste T, são ilustrados como: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

4.5.6. Gene *HDAC3*

Na análise de expressão da desacetilases de histona 3 (**Gráfico 4-VI**), pode-se observar a sua diminuição da expressão de forma significativa pelo uso dos dois compostos naturais em conjunto às 24H ($p=0.03686$) e pela genisteína após 48H de exposição ($p=0.01399$).

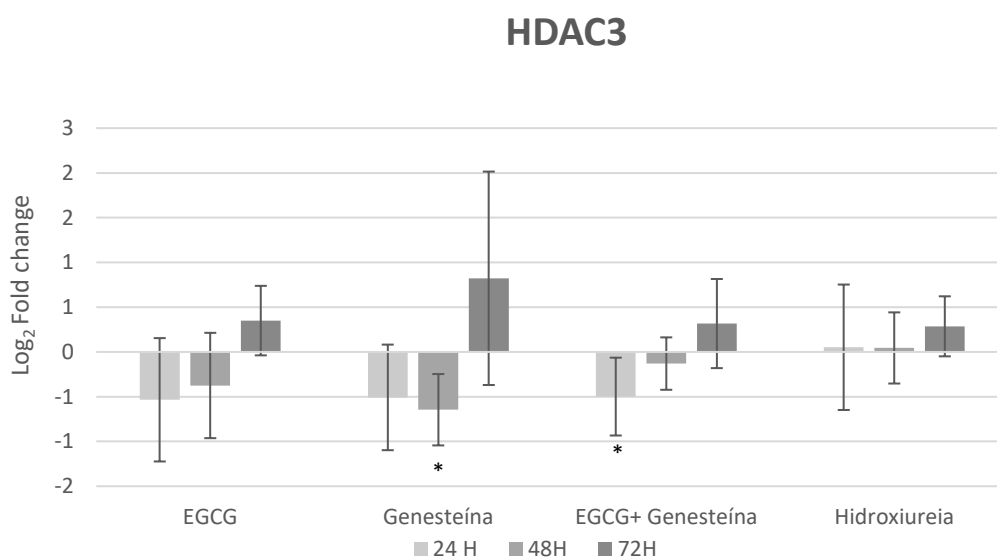


Gráfico 4-VI Análise qRT-PCR para *HDAC3*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72 h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *HDAC3*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controle foi comparado com EGCG, os valores do teste T. são ilustrados como: * $p<0.05$.

4.5.7. Gene *HDAC8*

Em relação à *HDAC8*, pode-se observar uma subexpressão induzida pela genisteína as 48H ($p=0.01285$), em oposição às 72H tanto a co-exposição ($p=0.01666$) como o tratamento das células com hidroxureia ($p=0.0003108$) se traduziram num aumento da expressão dos níveis de mRNA da *HDAC8*, sendo este último bastante mais significativo.

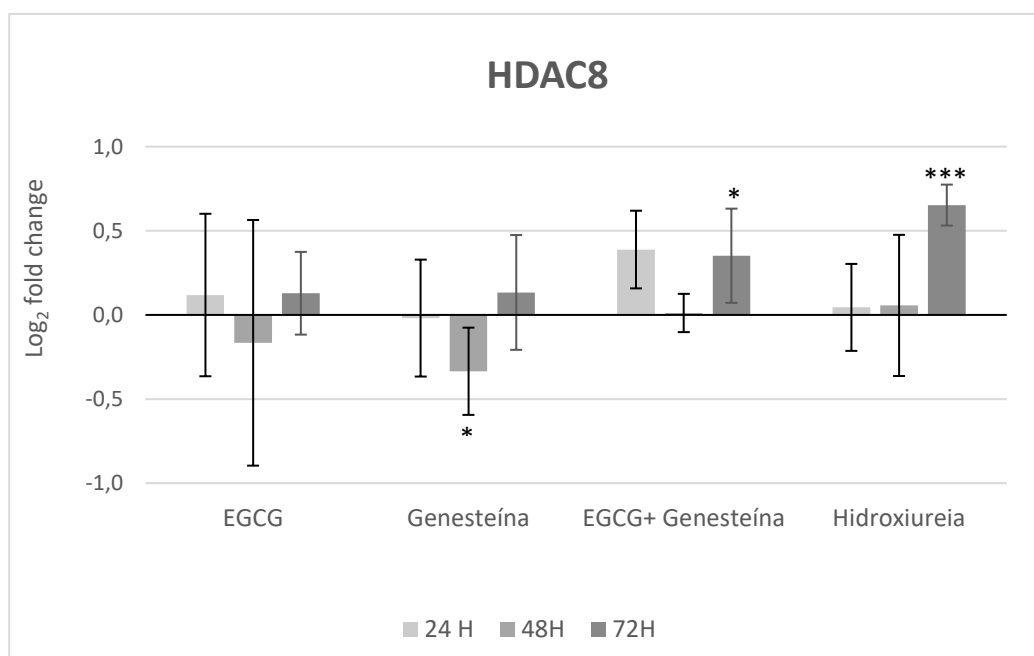


Gráfico 4-VII Análise qRT-PCR para *HDAC8*

Análise de qRT-PCR em células K562 após exposição a GN, EGCG, co-exposição (GN+EGCG) e HU para 24, 48 e 72 h. Os dados representam a expressão relativa para o gene *HDAC8*. *GAPDH* foi usado para normalização. As barras de erro representam o desvio padrão entre dois tratamentos independentes e três réplicas qRT-PCR. Valores estatísticos significativos, que foram comparados com o veículo (DMSO) para GN e co-exposição, o controlo foi comparado com EGCG, os valores do teste T, são ilustrados como: * $p<0,05$ e *** $p<0,001$.

5. Discussão

5.1. Precursores eritróides

Na **Tabela 4-1** observa-se que se obteve um número muito pequeno de células e que existiram fenómenos diferentes entre os dois sexos, como seria o esperado de acordo com a literatura (Bogdanova, Kaestner, Simionato, Wickrema, & Makhro, 2020; Humbert, 1994; Ibáñez-alcalde et al., 2018). As células recolhidas do sexo feminino (dador 1) tiveram uma viabilidade celular superior, sendo esse aumento maior no composto EGCG. Em oposição as células recolhidas do sexo masculino tiveram um comportamento atípico, uma vez que diminuíram a sua viabilidade na presença de EGCG e aumentaram na presença de GN. No entanto, nenhum dos comportamentos registados foi estatisticamente significativo, ou de acordo com o demonstrado em estudos anteriores, uma vez que o esperado é que a viabilidade seja superior em dadores do sexo masculino, uma vez que apresentam um número superior de células precursoras eritróides e por isso, se espera que a viabilidade seja superior (Bogdanova et al., 2020; Humbert, 1994). No primeiro ensaio as células, como explicitado no capítulo dos resultados foram cultivadas apenas em meio de fase I, ou seja sem holo-transferrina. Isto inviabilizou os resultados de estarem próximos dos ideais uma vez que para estabelecer uma cultura de células precursoras de eritrócitos é necessário vários componentes à manutenção do crescimento destas linhagens celulares como EPO, SCF e holo-transferrina de forma a fomentar a síntese de hemoglobina (Migliaccio, Whitsett, & Migliaccio, 2009).

No segundo ensaio (**Tabela 4-2**), onde existiu contaminação da transferrina por conversão no laboratório, temos novamente resultados em condições muito diferentes do esperado, à partida sabe-se que a cultura celular em meios contaminados resulta numa diminuição da viabilidade celular (Migliaccio et al., 2009), contudo, por desta vez estarem presentes as duas fases de cultura necessárias à cultura celular de linhagens hematopoiéticas (Migliaccio et al., 2009), foi possível observar um aumento do número de células para ambos os dadores.

De acordo com a **Tabela 4-3**, existiu um aumento do valor das células vivas antes da exposição, quando comparada com os compostos EGCG e GN, individualmente e em co-exposição, é possível ainda observar que o aumento foi menor quando as células foram expostas ao tratamento padrão (HU), tal vai de acordo com uma diminuição da citotoxicidade quando se recorre a estes compostos naturais (Matos, 2020; Muzolf-Panek et al., 2008; Setchell et al., 2003), apesar destas alterações, não existiram

evidências estatísticas significativas. O terceiro ensaio foi realizado sob condições o mais próximo possível das ideais, com as duas fases de cultura, como recomendado (Fibach & Prus, 2005; Migliaccio et al., 2009; Thermo Fisher Scientific, 2016), e todos os reagentes de compra comercial.

Em adultos conhecem-se diferenças entre as contagens de precursores eritroides, dependendo do sexo. As contagens de reticulócitos, por exemplo foram 20% mais altas, em média, nos homens do que nas mulheres, como demonstrado por (Humbert, 1994). A testosterona injetada em ratos fêmeas adultos aumenta o número de reticulócitos sanguíneos periféricos (Humbert, 1994).

As diferenças observadas nas contagens também podem estar relacionadas com o momento em que os precursores eritroides foram contados após a colheita de sangue. Uma vez que se sabe que as populações celulares diminuem significativamente após 24 horas da colheita devido ao processo complexo e frágil de crescimento e maturação in vitro dos reticulócitos (Piva, Brugnara, Spolaore, & Plebani, 2015)

Em homeostasia, existem aproximadamente 2 milhões de reticulócitos produzidos por segundo pela medula óssea (Bogdanova et al., 2020), mas a produção pode aumentar 20 vezes em pacientes com anemias hemolíticas alterando o padrão de circulação dos eritrócitos circulantes no corpo (Carden, Fasano, & Meier, 2020). Assim, se percebe que no momento de colheita em indivíduos saudáveis a quantidade de precursores disponíveis é muito baixa (Ibáñez-alcalde et al., 2018), uma vez que são produzidos na medula óssea e alocados posteriormente para onde for necessária a sua maturação, justificando as baixas contagens de precursores que tendem ainda a diminuir após o período de colheita.

As culturas líquidas de 2 etapas das células eritróides humanas formam menos de 50% de reticulócitos tendo em conta a população original (Migliaccio et al., 2009). As taxas de enucleação, essencial à formação de reticulócitos foi drasticamente melhorada pela co cultura de precursores eritróides com uma linha específica de medula óssea de ratinho (MS5) (Migliaccio et al., 2009) , sendo uma estratégia a ponderar no futuro, de forma a melhorar o número de células que sobrevivem a cultura celular- Também existem evidências que incluir SCF e baixas concentrações de IL3 e GM-CSF, bem como EPO, permite aumentar o número de células e manter a sobrevivência dos progenitores eritróides, tal como aumentar o volume de colheita também é essencial.

Quanto à exposição aos compostos, o que seria esperado encontrar nos resultados das contagens seria citotoxicidade, seja por parte do EGCG, embora apresente dualidade comportamental, atuando pró oxidante/carcinogénico e antioxidante/anti carcinogénico

(Weisburg, Weissman, Sedaghat, & Babich, 2004), por parte da genisteína, uma vez que induz apoptose numa variedade de linhagens celulares, mas também morte celular autofágica (Antosiak, Milowska, Maczynska, & Rozalska, 2016). Como já é estudado, o tratamento padrão com hidroxiureia apresenta também níveis de citotoxicidade *in vitro* como demonstrado por (Keefer et al., 2006; Lavelle et al., 2018; Platt et al., 1984).

Seria a primeira vez que se estudaria a co-exposição dos compostos EGCG e genisteína, o desejado seria que estes também apresentassem alguns níveis de citotoxicidade, mas sempre inferiores à hidroxiureia de forma a preservar uma maior população celular mas de forma a continuar a apresentar efeitos no ciclo celular de forma a aumentar a produção da hemoglobina fetal (Platt et al., 1984).

5.2. Influência dos compostos naturais nos reguladores epigenéticos

De acordo com o **Gráfico 4-I**, é possível observar como descrito na literatura, uma subregulação da *DNMT1* por exposição ao composto às 24h. Outros investigadores já relataram as diferenças de expressão genética *DNMT1* em células tratadas com genisteína, que são dependentes do tempo de exposição, por exemplo Sanaei et al., 2018, relatou que exposição a genisteína aos 72 h foi mínima, o que significa que a inibição máxima foi vista com GN em *DNMT1* após 72 h (Sanaei et al., 2018)..

Uma vez que não existe evidência destes dois compostos estudados em co-exposição, os dados obtidos serão pioneiros, no entanto seria expectável que ambos os compostos gerassem uma resposta de subregulação das DNMTs e HDACs, como observado para *DNMT1* e *DNMT3b* às 48h.

Para o gene *DNMT3a*, não se observou qualquer diferença estatística, independentemente do composto e do tempo de exposição, tal pode dever-se ao facto de em certas linhagens celulares se saber que *DNMT1* e o *DNMT3b* apresentaram níveis de transcrição moderadamente superiores em comparação com o *DNMT3a* (Mirza et al., 2013), tal comportamento nunca foi descrito para as células K562, no entanto poderá ser a explicação para a ausência de significância estatística e por isso será mais difícil apresentar resultados significativos com este gene, contudo de acordo com o explorado, o EGCG terá o potencial de inibir a sua expressão.

No caso da genisteína já foi estudado que tem a capacidade de restaurar significativamente a expressão de genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* após certo tempo de exposição (Sanaei et al., 2018), o que se pode observar no período de exposição de 72H nos **Gráfico 4-I** e **Gráfico 4-III**.

Para a *DNMT3b de novo*, por um período de 48h resulta uma subregulação significativa desta metilase *de novo*, quando exposta à co-exposição. Apesar de estar inúmeramente descrita que a exposição celular à genisteína diminui significativamente a atividade enzimática de DNMTs (Sundaram, Unni, Somvanshi, & Bhardwaj, 2019), tal como por exposição à catequinas de chá verde (Mirza et al., 2013; Yiannakopoulou, 2015), aparenta haver uma reversão desse comportamento na exposição a GN (**Gráfico 4-III**) provavelmente devido ao comportamento bifásico do composto.

No **Gráfico 4-IV**, pode -se observar que o EGCG inibiu significativamente a expressão da desacetilases às 24H ($p=0.004329$) enquanto a genisteína apenas provocou esse efeito às 72H ($p=0.01393$), esta resposta pode se dever ao facto da GN ter demonstrado um efeito inibidor da *HDAC1* dependente da dose e da atividade de *DNMT1*, e também diminuiu a atividade de DNMTs em extratos nucleares de células KYSE e esta atividade foi mais fraca do que a do EGCG (Kadayifci, Zheng, & Pan, 2018). A influência dos compostos estará suscetível a vários fatores como a concentração e níveis de *HDAC1* traduzidos nas células (Farooqi et al., 2018). Além disso, foi igualmente examinado se a atividade do HDAC pode ou não estar correlacionada com uma diminuição da expressão *HDAC1*. Verificou-se que as células HeLa tratadas com EGCG não apresentaram alterações significativas na expressão do *HDAC1* em comparação com as células não tratadas e que a o domínio galato do EGCG foi consistentemente posicionada em proximidade com os resíduos essenciais à ligação do substrato (Khan et al., 2015). Em células cancerígenas da pele, o EGCG, demonstrou capacidade na redução da atividade e expressão de *DNMT3A* (Negri et al., 2018). Nas células cancerígenas da mama, observou-se a redução da proteína *HDAC1* (Kumari, Bhawal, Kapila, & Yadav, 2020; Negri et al., 2018; Remely et al., 2017). O composto polifenólico também reduziu a atividade enzimática de DNMTs e HDACs nas células HeLa, o que resultou na reativação dos genes supressores de tumores (Kumari et al., 2020).

Quanto à *HDAC2* (**Gráfico 4-V**), a sobre expressão ($p=0.045$) causada pelo EGCG após, o EGCG é normalmente encontrado como redutor atividade bioquímica do HDAC (Kedhari Sundaram, Haque, Somvanshi, Bhardwaj, & Hussain, 2020), no entanto, (Yun, Jialal, & Devaraj, 2010) também descreveu uma sobre regulação após a exposição a EGCG. A genisteína demonstrou uma bipolaridade de resposta dependente do tempo de exposição, sendo que às 48H é responsável de forma significativa ($P=0.0002$) pela subregulação do gene como normalmente descrito (Tiwari, Dixit, Parvez, & Agrawala, 2017), no entanto, se o período for estendido às 72H provoca uma sobre regulação ($p=0.002165$), comprovando o comportamento bifásico deste composto (Sanaei et al., 2018). A exposição conjunta a EGCG e genisteína, foi responsável pela sobre

regulação dos níveis de *HDAC2* às 72H ($p=0.03077$), uma vez que GN em longos períodos de exposição revela um mecanismo de feedback negativo, a exposição conjunta poderá ser influenciada por esse comportamento.

Em relação aos comportamentos descritos para o período de exposição de 72H é possível afirmar que a sobre regulação da genisteína foi significativamente superior em relação à provocada pelo EGCG ($p=0.0015637$) e à provocada pela co-exposição ($p=0.0040258$), o que contraria o expectável, uma vez que se acredita que a GN provoque respostas mais fracas que o EGCG (Kadayifci et al., 2018). Em linhagens celulares de cancro da mama, quando tratadas com uma combinação de genisteína verificaram uma inibição do ciclo celular em G2 e G1, respetivamente, reduzindo a atividade de *HDAC2* e *HDAC3*, juntamente com a redução do fator de transcrição KLF4 que agiu como um oncogene no cancro da mama (Kumari et al., 2020).

Acerca da desacetilase de histona 3, a co-exposição às 24H ($p=0.03686$) provoca uma subregulação (**Gráfico 4-VI**) e a genisteína despoleta a mesma resposta às 48H ($p=0.01399$). Apesar de não se ter verificado, também se conhece o papel inibitório do EGCG nas modificações pós-tradução da histona, apesar de pouco explorado. Um dos mecanismos propostos identificados nas células cancerígenas do cólon sugere que a catequina pode contribuir para a degradação tanto do *DNMT1* como do *HDAC3* (Ciesielski, Biesiekierska, & Balcerczyk, 2020).

Para a *HDAC8* (**Gráfico 4-VII**), existiu uma subregulação induzida pela genisteína às 48H e uma sobre regulação às 72H provocada pela co-exposição ($p=0.01666$) e pelo tratamento das células com hidroxiureia ($p=0.0003108$), apesar de ainda pouco explorada no contexto de exposição a estes compostos, a subregulação desta desacetilase, vai de encontro com o anteriormente descrito (Basak et al., 2008; Vahid et al., 2015).

O EGCG tem a capacidade de se ligar as DNMTs e inibir competitivamente a atividade enzimática, produzindo a reativação de genes silenciados pelo metilação nas células. Os mecanismos de regulação epigenética sugeridos incluem inibição enzimática direta, inibição enzimática indireta, redução da expressão e tradução de DNMT1 (Kadayifci et al., 2018; Mills, 2017).

Estudos de modelação e ancoragem molecular apoiaram a ligação do EGCG ao *DNMT1*, *DNMT3B* e ao *HDAC1* (Hassan et al., 2019; Negri et al., 2018; Ullah, Filippis, Santarcangelo, & Daglia, 2020). Estas interações causam a redução da hipermetilação do DNA, reduzindo a expressão dos níveis destes genes (**Gráfico 4-I** e **Gráfico 4-II**) e restauram a expressão de genes reprimidos (Negri et al., 2018), como é o pretendido

com a hemoglobina fetal. A hipermetilação das ilhas CpG nas regiões promotoras é um mecanismo importante para silenciar os genes que suprimem o cancro, pelo que a inibição das DNMTs conduz à desmetilação do CpG e à reativação dos genes silenciados (Yiannakopoulou, 2015). A associação física dos MBDs com DNA metilado causa obstáculos para a ligação de fatores de transcrição. Existem evidências científicas que pelo menos 2 membros da família MBD, são expressos em linhagens cancerígenas e podem estar envolvidos na repressão genética, que tem a capacidade de se ligar a um único CpG simetricamente metilado (Mirza et al., 2013). A expressão alterada de *DNMT1* pode fornecer um mecanismo para a indução da hipometilação de genes específicos e CpG individual, embora não mostrassem como tal alvo pode ocorrer que vários compostos dietéticos podem afetar diretamente a expressão de *DNMT1*, ou que os dadores de metilo da dieta podem modificar indiretamente a atividade de *DNMT1* alterando a concentração intracelular de s-adenosimetionina (SAM), que serve como um agente oxidante na reparação do DNA e na biossíntese de vitaminas, coenzimas e antibióticos (Ciesielski et al., 2020; Kadayifci et al., 2018).

O EGCG tem um potencial de inibição competitiva do *DNMT1* através da formação de ligações de hidrogénio na região de ligação catalítica *DNMT1*, bloqueando assim a entrada do nucleótido de DNA no seu local ativo, e inibindo o processo de metilação (Ciesielski et al., 2020; Kadayifci et al., 2018). Vários outros estudos também revelaram que o EGCG diminuiu os níveis globais de metilação do DNA, e também mostrou um efeito protetor ao inibir a hipermetilação do promotor de genes específicos. Estes efeitos foram atribuídos à diminuição da atividade de mRNA e expressão de proteínas de DNMT1 e EGCG, induzindo o domínio vincutivo do *DNMT1* ao promotor dos genes específicos (Kadayifci et al., 2018).

O polifenol do chá verde tem como alvo HDACs para inibição, levando a um aumento da acetilação das histonas que regula as alterações em todo o genoma na expressão genética (Evans & Ferguson, 2019). Tratamento EGCG com diferentes períodos de exposição semelhantes aos usados (24, 48 e 72 h) permitiu observar uma ação inibitória significativa sobre a atividade de DNMTs em células HeLa tratadas de forma dependente do tempo e inibiu a atividade enzimática em 5% (24 h), 12% (48 h) e 20% (72 h) (Khan et al., 2015). Observou-se ainda que a exposição causou uma diminuição da atividade dos HDACs nas células HeLa e provocou uma inibição de 8, 18 e 29%, respetivamente.

Os mecanismos pelos quais os flavonoides exercem os efeitos anticancerígenos são pouco conhecidos e variados podendo incluir a ação através da anti inflamação, limpeza

de radicais livres, modulação das vias de sobrevivência e proliferação, e inibição da via ubiquitinação proteossomal (Mirza et al., 2013). Contudo, já é conhecido o comportamento de efeito bifásico (inibitório e proliferativo) deste composto (Sanaei et al., 2018), como também se provou com o **Gráfico 4-III**, **Gráfico 4-V**, **Gráfico 4-VI** e **Gráfico 4-VII**.

Em linhagens de células mielóides e por isso mais próximas das K562 que se usaram nos ensaios, o EGCG regulou a diminuição da expressão da DNMT1, da HDAC1 e da HDAC2 (Borutinskaitė et al., 2018; Evans & Ferguson, 2019; Negri et al., 2018).

A inibição das HDACs leva a um aumento do estado de acetilação das histonas que faz com que a cromatina atinja uma conformação mais aberta que favoreça a replicação, reparação e transcrição (Sundaram et al., 2019; Tiwari et al., 2017). A suplementação através de polifenóis e flavonoides permite a supressão dos HDACs, podendo alterar o equilíbrio, resultando num aumento simultâneo da expressão de acetiltransferases de histona como evidente pelo aumento da acetilação H3K9/18 em diferentes linhas celulares (Deb et al., 2019), tornando-se assim em alvos de interesse para estudos futuros a níveis da regulação epigenética.

No decurso da atividade experimental, avaliou-se sempre estes efeitos contra a utilização da hidroxureia, único indutor atualmente aprovado pela FDA, contudo como referido anteriormente, este agente terapêutico não tem a capacidade de induzir a produção da hemoglobina fetal (Field & Nathan, 2014), podendo justificar o facto de não ter sido analisado uma resposta significativa da HU na subregulação dos genes *DNMT 1*, *DNMT 3a*, *DNMT 3b*, *HDAC2* e *HDAC3*, tendo até sobre regulados HDAC1 e HDAC8, de forma significativa, o que vai contra a literatura, quando se pretende aumentar os níveis de HbF (Fard, Hosseini, Shahjahani, Salari, & Jaseb, 2013; G. H. Wei et al., 2007).

6. Conclusão

Em suma, ainda não se conseguiu provar reativação da *expressão de γ -globina* e indução de HbF, através das experiências realizadas. No entanto, demonstrou-se pela primeira vez o efeito da exposição de GN e o EGCG, em concentrações fisiologicamente alcançáveis por dieta ou suplementação, numa linhagem precursora de eritróides, apesar de não se ter conseguido aferir sobre a sua citotoxicidade.

Os resultados obtidos demonstraram que os dois compostos naturais têm a capacidade de sub regular os reguladores epigenéticos que se relacionam hemoglobina fetal na linha celular K562 e possivelmente ser menos citotóxicas do que a HU.

Como os estudos anteriores da influência destes compostos retratam sempre respostas referentes aos seus efeitos anti carcinogénicos, apresenta-se assim um possível novo potencial para a GN e o EGCG em relação à capacidade de induzir a expressão da hemoglobina fetal através da regulação epigenética. Os resultados obtidos obrigam a um estudo mais aprofundado dos efeitos do GN e do EGCG e de análogos estruturais numa linhagem de células progenitoras eritróides bem estabelecida, para se poder aferir sobre o efeito destes compostos nos reguladores epigenéticos assim como se esta regulação irá promover a indução da hemoglobina fetal e tornarem numa terapêutica coadjuvante para as β -hemoglobinopatias.

O intuito desta investigação passou por identificar compostos encontrados na natureza, que através da sua exposição individual ou conjunta pudessem afetar os reguladores epigénicos de forma a se relacionar com um aumento da expressão de HbF. De acordo com o que se estudou, pode-se acreditar no potencial destes compostos, permitindo investigações futuras que os tornem em regimes terapêuticos facilmente acessíveis aos pacientes da hemoglobinopatias.

7. Perspetivas futuras

Os resultados promissores obtidos em relação à regulação epigenética apoiam a continuação deste estudo.

Prevê-se que, aumentando a quantidade de colheita de sangue e aperfeiçoando as condições de cultura celular se consiga estabelecer um linhagem de células precursoras eritroides, de forma a se concluir sobre a indução da hemoglobina fetal. Com o aumento das concentrações dos compostos e destes no regime de co-exposição, os resultados poderão ser mais robustos e, possivelmente, obteremos uma resposta significativa e uniforme em relação aos reguladores epigenéticos. Deste modo, compreender-se-á melhor a eficácia e a segurança da GN e do EGCG.

Por outro lado, deve existir um esforço para se elucidar os mecanismos de atuação dos compostos e dos fatores envolvidos na expressão *genética* γ -globina.

Devem ser realizados estudos complementares sobre os efeitos da co exposição dos compostos junto dos genes *BCL11*, *MYB* e *KLF1*, entre outros, a fim de compreender melhor os mecanismos moleculares subjacentes à indução do HbF e a sua utilização potencial como nova abordagem terapêutica.

Referências bibliográficas

- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 0(1), 1–9. Retrieved from <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Ahmadvand, M., Noruzinia, M., Dehghani Fard, A., Montazer Zohour, M., Amin Tabatabaiefar, M., Soleimani, M., ... Saki, N. (2014). The role of epigenetics in the induction of fetal hemoglobin: A combination therapy approach. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 8(1), 9–14.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., ... Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5592–5595. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.104>
- Akiyama, Tetsu, & Ogawara, H. (1991). Use and Specificity of Genistein as Inhibitor of Protein-Tyrosine Kinases. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)01032-W](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)01032-W)
- Allen, D. W., Wyman, J., & Smith, C. A. (1953). The oxygen equilibrium of fetal and adult human hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Andersson, L. C., Nilsson, K., & Gahmberg, C. G. (1979). K562—A human erythroleukemic cell line. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910230202>
- Antosiak, A., Milowska, K., Maczynska, K., & Rozalska, S. (2016). Cytotoxic activity of genistein-8-C-glucoside from *Lupinus luteus* L. and genistein against human SK-

- OV-3 ovarian carcinoma cell line. *Medicinal Chemistry Research*, 64–73.
<https://doi.org/10.1007/s00044-016-1725-5>
- Basak, S., Pookot, D., Noonan, E. J., & Dahiya, R. (2008). Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0617>
- Beetch, M., Harandi-Zadeh, S., Shen, K., Lubecka, K., Kitts, D. D., O'Hagan, H. M., & Stefanska, B. (2020). Dietary antioxidants remodel DNA methylation patterns in chronic disease. *British Journal of Pharmacology*, 177(6), 1382–1408.
<https://doi.org/10.1111/bph.14888>
- Bessman, J. D. (1990). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. In H. J. Walker HK, Hall WD (Ed.), *Hematopoietic system* (3rd ed., pp. 735–738). Boston: Butterworths.
- Bianchi, N., Zuccato, C., Lampronti, I., Borgatti, M., & Gambari, R. (2009). Fetal hemoglobin inducers from the natural world: A novel approach for identification of drugs for the treatment of β -thalassemia and Sickle-cell anemia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(2), 141–151.
<https://doi.org/10.1093/ecam/nem139>
- Biswas, T. (2013). Global burden of sickle cell anaemia is set to rise by a third by 2050. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 347(July 2013), 6638.
<https://doi.org/10.1136/bmj.f4676>
- Bogdanova, A., Kaestner, L., Simionato, G., Wickrema, A., & Makhro, A. (2020). *Heterogeneity of Red Blood Cells : Causes and Consequences*. 11(May), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00392>
- Borutinskaitė, V., Virkšaitė, A., Gudelytė, G., & Navakauskienė, R. (2018). Green tea polyphenol EGCG causes anti-cancerous epigenetic modulations in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma*, 59(2), 469–478.
<https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1339881>
- Bradner, J. E., Mak, R., Tanguturi, S. K., Mazitschek, R., Haggarty, S. J., Ross, K., ... Ebert, B. L. (2010). Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), 12617–12622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006774107>
- Carden, M. A., Fasano, R. M., & Meier, E. R. (2020). Not all red cells sickle the same: Contributions of the reticulocyte to disease pathology in sickle cell anemia. *Blood Reviews*, 40, 100637. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100637>
- Carrasqueira, M. D. (2017). *Agentes Quelantes no Tratamento de Intoxicações por Ferro*. Universidade de Lisboa-Faculdade de Farmácia.
- Chakrawarti, L., Agrawal, R., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(8), 907–916. <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1203419>
- Chow, H. H. S., Cai, Y., Hakim, I. A., Crowell, J. A., Shahi, F., Brooks, C. A., ... Alberts, D. S. (2003). Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research*, 9(9), 3312–3319.
- Ciesielski, O., Biesiekierska, M., & Balcerczyk, A. (2020). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) alters histone acetylation and methylation and impacts chromatin architecture profile in human endothelial cells. *Molecules*, 25(10).

<https://doi.org/10.3390/molecules25102326>

- Cui, S., & Engel, J. D. (2017). Reactivation of fetal hemoglobin for treating β -thalassemia and sickle cell disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1013, 177–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_7
- D.S., V., D.E., B., S.H., O., Vinjamur, D. S., Bauer, D. E., & Orkin, S. H. (2018). Recent progress in understanding and manipulating haemoglobin switching for the haemoglobinopathies. *British Journal of Haematology*, 180(5), 630–643. <https://doi.org/10.1111/bjh.15038>
- Das, I., Mishra, H., Khodiar, P. K., & Patra, P. K. (2018). Identification of therapeutic targets for inflammation in sickle cell disease (SCD) among Indian patients using gene expression data analysis. *Bioinformatics*, 14(07), 408–413. <https://doi.org/10.6026/97320630014408>
- De Silva, S., Fisher, C. A., Premawardhena, A., Lamabadusuriya, S. P., Peto, T. E. A., Perera, G., ... Weatherall, D. J. (2000). Thalassaemia in Sri Lanka: Implications for the future health burden of Asian populations. *Lancet*, 355(9206), 786–791. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)08246-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)08246-X)
- Deb, G., Shankar, E., Thakur, V. S., Ponsky, L. E., Bodner, D. R., Fu, P., & Gupta, S. (2019). Green tea–induced epigenetic reactivation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 suppresses prostate cancer progression through histone-modifying enzymes. *Molecular Carcinogenesis*, 58(7), 1194–1207. <https://doi.org/10.1002/mc.23003>
- Evans, L., & Ferguson, B. S. (2019). Food bioactives in the epigenomic regulation of metabolic disease. In *Nutritional Epigenomics*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816843-1.00020-5>
- Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., ... Yang, C. S. (2003). Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, 63(22), 7563–7570.
- Fard, A. D., Hosseini, S. A., Shahjahani, M., Salari, F., & Jaseb, K. (2013). Evaluation of novel fetal hemoglobin inducer drugs in treatment of β -hemoglobinopathy disorders. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 7(3), 46–53.
- Farooqi, A. A., Naqvi, S. K. ul H., Perk, A. A., Yanar, O., Tabassum, S., Ahmad, M. S., ... Arafat, W. O. (2018). Natural Agents-Mediated Targeting of Histone Deacetylases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0488-0>
- Fathallah, H., & Atweh, G. F. (2006). Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.58>
- Feriotto, G., Marchetti, N., Costa, V., Torricelli, P., Beninati, S., Tagliati, F., & Mischianti, C. (2018). Selected terpenes from leaves of *Ocimum basilicum* L. induce hemoglobin accumulation in human K562 cells. *Fitoterapia*, 127(January), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.016>
- Fibach, E., & Prus, E. (2005). Differentiation of human erythroid cells in culture. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 22, 1–10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im22f07s69>

- Field, J. J., & Nathan, D. G. (2014). Advances in sickle cell therapies in the hydroxyurea era. *Molecular Medicine*, 20(8), S37–S42. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00187>
- Franco, R. S., Yasin, Z., Palascak, M. B., Ciraolo, P., Joiner, C. H., & Rucknagel, D. L. (2006). The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. *Blood*, 108(3), 1073–1076. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-008318>
- Frenette, P. S., & Atweh, G. F. (2007). Sickle cell disease: Old discoveries, new concepts, and future promise. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 850–858. <https://doi.org/10.1172/JCI30920>
- Frey, R. S., & Singletary, K. W. (2003). Genistein Activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, Inactivates ERK1/ERK2 and Decreases Cdc25C Expression in Immortalized Human Mammary Epithelial Cells. *The Journal of Nutrition*, 133(1), 226–231. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.226>
- Ginder, G. D. (2015). Epigenetic Regulation of Fetal Globin Gene Expression in Adult Erythroid Cells. *Translational Research*, 165(1), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.002>.Epigenetic
- Harju-Baker, S., Costa, F. C., Fedosyuk, H., Neades, R., & Peterson, K. R. (2008). Silencing of γ -Globin Gene Expression during Adult Definitive Erythropoiesis Mediated by GATA-1-FOG-1-Mi2 Complex Binding at the -566 GATA Site. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3101–3113. <https://doi.org/10.1128/mcb.01858-07>
- Hassan, F., Rehman, M. S., Khan, M. S., Ali, M. A., Javed, A., Nawaz, A., & Yang, C. (2019). Curcumin as an Alternative Epigenetic Modulator : Mechanism of Action and Potential Effects. *Frontiers in Genetics*, 10(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00514>
- Humbert, J. (1994). Reticulocytes : Biological variations and reference limits. *European Journal of Haematology*, 11–15.
- Hussain, S., & Ashafaq, M. (2018). Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications in cervical cancer. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 9(4), 178–182. <https://doi.org/10.15406/jcpcr.2018.09.00345>
- Ibáñez-alcalde, M. M., Vázquez-lópez, M. Á., Ruíz-sánchez, A. M., Lendínez-molinos, F. J., Galera-martínez, R., Bonillo-perales, A., & Parrón-carreño, T. (2018). Reference Values of Reticulocyte Hemoglobin Content in Healthy Adolescents. *00(00)*, 1–6.
- Im, H., Grass, J. A., Christensen, H. M., Perkins, A., & Bresnick, E. H. (2002). Histone deacetylase-dependent establishment and maintenance of broad low-level histone acetylation within a tissue-specific chromatin domain. *Biochemistry*, 41(51), 15152–15160. <https://doi.org/10.1021/bi026786q>
- Kadayifci, F. Z., Zheng, S., & Pan, Y. X. (2018). Molecular mechanisms underlying the link between diet and DNA methylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19124055>
- Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., ... Vichinsky, E. P. (2018). Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>
- Kedhari Sundaram, M., Haque, S., Somvanshi, P., Bhardwaj, T., & Hussain, A. (2020). Epigallocatechin gallate inhibits HeLa cells by modulation of epigenetics and

- signaling pathways. *3 Biotech*, *10*(11), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02473-1>
- Keefter, J. R., Schneidereith, T. A., Mays, A., Purvis, S. H., Dover, G. J., & Smith, K. D. (2006). Role of Cyclic Nucleotides in Fetal Hemoglobin Induction in Cultured CD34+ Cells. *Experimental Hematology*, *34*(9), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.03.018>
- Keith D. Robertson, & Alan P. Wolffe. (2000). DNA METHYLATION IN HEALTH AND DISEASE. *Nature Reviews Genetics*, *1*(October). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10433-6>
- Kershaw, J., & Kim, K. H. (2017). The Therapeutic Potential of Piceatannol, a Natural Stilbene, in Metabolic Diseases: A Review. *Journal of Medicinal Food*, *20*(5), 427–438. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3916>
- Khan, M. A., Hussain, A., Sundaram, M. K., Alalami, U., Gunasekera, D., Ramesh, L., ... Quraishi, U. (2015). Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. *Oncology Reports*, *33*(4), 1976–1984. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3802>
- Koeffler, H. P., & Golde, D. W. (1980). Humoral modulation of human acute myelogenous leukemia cell growth in vitro. *Cancer Research*.
- Kukreja, A., Tandon, S., Mishra, A., & Tiwari, A. (2013). Piceatannol: A potential futuristic natural stilbene as fetal Haemoglobin inducer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *7*(12), 3028–3031. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6239.3839>
- Kumari, A., Bhawal, S., Kapila, S., & Yadav, H. (2020). Health-promoting role of dietary bioactive compounds through epigenetic modulations : a novel prophylactic and therapeutic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*(0), 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1825286>
- Lavelle, D., Engel, J. D., & Sauntharajah, Y. (2018). Fetal Hemoglobin Induction by Epigenetic Drugs. *Seminars in Hematology*, *55*(2), 60–67. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.04.008>
- Li, Y., Tollefsbol, T. O., Li, S., & Chen, M. (2019). Prenatal epigenetics diets play protective roles against environmental pollution. *Clinical Epigenetics*, *11*(1), 1–31. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0659-4>
- Lozzio, B. B., & Lozzio, C. B. (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leukemia Research*. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(79\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0145-2126(79)90033-X)
- Matos, E. (2020). *Natural compounds with the capacity to reactivate the gene of gamma-globin and induction of fetal hemoglobin - In vitro test Natural compounds with the capacity to reactivate the gene of gamma-globin and induction of fetal hemoglobin - In vitro test Elisa*. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Migliaccio, A. R., Whitsett, C., & Migliaccio, G. (2009). Erythroid cells in vitro: From developmental biology to blood transfusion products. *Current Opinion in Hematology*, *16*(4), 259–268. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832bcaa2>
- Mills, A. A. (2017). The chromodomain helicase DNA-binding chromatin remodelers: Family traits that protect from and promote cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026450>

- Mirza, S., Sharma, G., Parshad, R., Gupta, S. D., Pandya, P., & Ralhan, R. (2013). Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *Journal of Breast Cancer*, *16*(1), 23–31. <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.1.23>
- Modell, B., & Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, *86*(6), 480–487. <https://doi.org/10.2471/BLT.06.036673>
- Muzolf-Panek, M., Gliszczyńska-Świgło, A., De Haan, L., Aarts, J. M. M. J. G., Szymusiak, H., Vervoort, J. M., ... Rietjens, I. M. C. M. (2008). Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression. *Chemical Research in Toxicology*, *21*(12), 2352–2360. <https://doi.org/10.1021/tx8001498>
- Nandakumar, V., Vaid, M., & Katiyar, S. K. (2011). Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis*, *32*(4), 537–544. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq285>
- Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F., & Bettuzzi, S. (2018). Molecular targets of epigallocatechin—gallate (EGCG): A special focus on signal transduction and cancer. *Nutrients*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/nu10121936>
- Ohnishi, S. T., Ohnishi, T., & Ogunmola, G. B. (2001). Green tea extract and aged garlic extract inhibit anion transport and sickle cell dehydration in vitro. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *27*(1), 148–157. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0368>
- Orisakwe, O. E., Amadi, C. N., & Frazzoli, C. (2020). Management of Iron Overload in Resource Poor Nations: A Systematic Review of Phlebotomy and Natural Chelators. *Journal of Toxicology*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/4084538>
- Ovchynnikova, E., Agliarolo, F., von Lindern, M., & van den Akker, E. (2018). The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Frontiers in Physiology*, *9*(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00829>
- Palaparthi, R., Rehman, M. I., von Richter, O., Yin, D., Higuchi, K., Yamashita, D., ... Ette, E. I. (2019). Population pharmacokinetics of amikacin in Korean neonates. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*.
- Papayannopoulou, T., Brice, M., & Stamatoyannopoulos, G. (1976). Stimulation of fetal hemoglobin synthesis in bone marrow cultures from adult individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.2033>
- Paula, A., Neto, R., Luciane, M., Farmácia, C. De, São, U., & Paulo-sp, S. (2015). Epigenética – Alterações Induzidas Por Agentes Químicos. *Simpósio de Assistência Farmacêutica*, 21–24.
- Perrine, S. P., & Faller, D. V. (1993). Butyrate-induced reactivation of the fetal globin genes: A molecular treatment for the β -hemoglobinopathies. *Experientia*, *49*(2), 133–137. <https://doi.org/10.1007/BF01989417>
- Peter, B., Bosze, S., & Horvath, R. (2017). Biophysical characteristics of proteins and living cells exposed to the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCg): review of recent advances from molecular mechanisms to nanomedicine and clinical trials. *European Biophysics Journal*, *46*(1).

<https://doi.org/10.1007/s00249-016-1141-2>

- Piva, E., Brugnara, C., Spolaore, F., & Plebani, M. (2015). Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. *Clinical Laboratory Medicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.004>
- Platt, O. S., Orkin, S. H., Dover, G., Beardsley, G. P., Miller, B., & D G Nathan. (1984). Hydroxyurea Enhances Fetal Hemoglobin Production in Sickle Cell Anemia. *Journal of Clinical Investigation*, 74(August), 652–656.
- Putiri, E. L., & Robertson, K. D. (2011). Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clinical Epigenetics*, 2(2), 299–314. <https://doi.org/10.1007/s13148-010-0017-z>
- Qian, X., Chen, J., Zhao, D., Guo, L., & Qian, X. (2013). ExpresPlastrum testudinis induces γ -globin gene expression through epigenetic histone modifications within the γ -globin gene promoter via activation of the p38 MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(6), 1418–1428.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1338>
- Quek, L., & Thein, S. L. (2007). Molecular therapies in β -thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 136(3), 353–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06408.x>
- Rajarajacholan, U. K., Thalappilly, S., & Riabowol, K. (2013). The ING1a Tumor Suppressor Regulates Endocytosis to Induce Cellular Senescence Via the Rb-E2F Pathway. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001502>
- Raschke, M., Rowland, I. R., Magee, P. J., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. *Carcinogenesis*, 27(11), 2322–2330. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl082>
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447(7143), 425–432. <https://doi.org/10.1038/nature05918>
- Remely, M., Ferk, F., Sterneder, S., Setayesh, T., Roth, S., Kepcija, T., ... Haslberger, A. G. (2017). EGCG Prevents High Fat Diet-Induced Changes in Gut Microbiota, Decreases of DNA Strand Breaks, and Changes in Expression and DNA Methylation of Dnmt1 and MLH1 in C57BL/6J Male Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3079148>
- Renneville, A., Van Galen, P., Canver, M. C., McConkey, M., Krill-Burger, J. M., Dorfman, D. M., ... Ebert, B. L. (2015). EHMT1 and EHMT2 inhibition induces fetal hemoglobin expression. *Blood*, 126(16), 1930–1939.
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-649087>
- Riley, R. S., Ben-Ezra, J. M., Goel, R., & Tidwell, A. (2001). Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 15(5), 267–294.
<https://doi.org/10.1002/jcla.1039>
- Sanaei, M., Kavooosi, F., Roustazadeh, A., & Golestan, F. (2018). Effect of Genistein in Comparison with Trichostatin A on Reactivation of DNMTs Genes in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6, 141–146. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2018.00002>
- Sankaran, V. G., Xu, J., & Orkin, S. H. (2010). Advances in the understanding of haemoglobin switching: Review. *British Journal of Haematology*, 149(2), 181–194.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08105.x>
- Sankaran, V. G., Xu, J., Ragoczy, T., Ippolito, G. C., Walkley, C. R., Maika, S. D., ...

- Orkin, S. H. (2009). Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A Vijay. *Nature*, *460*(7259), 1093–1097. <https://doi.org/10.1038/nature08243>.Developmental
- Sarkies, P., & Sale, J. E. (2012). Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends in Genetics*, *28*(3), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.11.005>
- Saunthararajah, Y., Lavelle, D., & DeSimone, J. (2004). DNA hypo-methylating agents and sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, *126*(5), 629–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05064.x>
- Setchell, K. D. R., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., ... Cassidy, A. (2003). Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(2), 411–419. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.2.411>
- Shah, F., & Dwivedi, M. (2020). Pathophysiology and recent therapeutic insights of sickle cell disease. *Annals of Hematology*, *99*(5), 925–935. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03977-9>
- Shukla, Y. (2007). Tea and cancer chemoprevention: A comprehensive review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *8*(2), 155–166.
- Sigma-Aldrich Co. LLC. (2016). Fundamental techniques in cell culture 3. *Sigma Aldrich*, 80. Retrieved from https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf
- Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, *82*(12), 1807–1821. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.093>
- Stamatoyannopoulos, G. (2010). Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Hematology*, *33*(3), 259. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.11.007>.Control
- Starlard-Davenport, A., Smith, A., Vu, L., Li, B., & Pace, B. S. (2019). MIR29B mediates epigenetic mechanisms of HBG gene activation. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/bjh.15870>
- Štefková, K., Hanáčková, M., Kučera, J., Radaszkiewicz, K. A., Ambrůžová, B., Kubala, L., & Pacherník, J. (2019). MAPK p38alpha Kinase Influences Haematopoiesis in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells International*, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/5128135>
- Sundaram, M. K., Unni, S., Somvanshi, P., & Bhardwaj, T. (2019). Genistein Modulates Signaling Pathways and Targets. *Genes*, *10*, 1–18.
- Thein, S. L. (2013). Genetic association studies in β -hemoglobinopathies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, *2013*, 354–361. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.354>
- Thein, S. L., & Menzel, S. (2009). Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology*, *145*(4), 455–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07650.x>
- Theodorou, A., Phylactides, M., Katsantoni, E., Vougas, K., Garbis, S. D., Fanis, P., ...

- Kleanthous, M. (2020). Proteomic Studies for the Investigation of γ -Globin Induction by Decitabine in Human Primary Erythroid Progenitor Cultures. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 134. <https://doi.org/10.3390/jcm9010134>
- Thephinlap, C., Ounjaijean, S., Khansuwan, U., Fucharoen, S., Porter, J., & Srichairatanakool, S. (2007). Epigallocatechin-3-gallate and Epicatechin-3-gallate from Green Tea Decrease Plasma Non-Transferrin Bound Iron and Erythrocyte Oxidative Stress. *Medicinal Chemistry*, 3(3), 289–296. <https://doi.org/10.2174/157340607780620608>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *CELL CULTURE BASICS Handbook*.
- Thichanpiang, P., & Wongprasert, K. (2015). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate attenuates TNF- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to retinal pigment epithelial cells. *American Journal of Chinese Medicine*, 43(1), 103–119. <https://doi.org/10.1142/S0192415X1550007X>
- Tiwari, M., Dixit, B., Parvez, S., & Agrawala, P. K. (2017). EGCG, a tea polyphenol, as a potential mitigator of hematopoietic radiation injury in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 88, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.129>
- Ullah, H., Filippis, A. De, Santarcangelo, C., & Daglia, M. (2020). Epigenetic regulation by polyphenols in diabetes and related complications. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.3233/MNM-200489>
- Vahid, F., Zand, H., Nosrat-Mirshekarlou, E., Najafi, R., & Hekmatdoost, A. (2015). The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A review. *Gene*, 562(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.045>
- Vanhees, K., Coort, S., Ruijters, E. J. B., Godschalk, R. W. L., Schooten, F. J., & Doorn-Khosrovani, S. B. van W. (2011). Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage. *The FASEB Journal*, 25(2), 797–807. <https://doi.org/10.1096/fj.10-172155>
- Ware, R. E., Eggleston, B., Redding-Lallinger, R., Wang, W. C., Smith-Whitley, K., Daeschner, C., ... Ohene-Frempong, K. (2002). Predictors of fetal hemoglobin response in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. *Blood*, 99(1), 10–14. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.10>
- Weatherall, D. J. (2010). The importance of micromapping the gene frequencies for the common inherited disorders of haemoglobin. *British Journal of Haematology*, 149(5), 635–637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08118.x>
- Wei, G. H., Zhao, G. W., Song, W., Hao, D. L., Lv, X., Liu, D. P., & Liang, C. C. (2007). Mechanisms of human γ -globin transcriptional induction by apicidin involves p38 signaling to chromatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(4), 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.191>
- Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
- Weisburg, J. H., Weissman, D. B., Sedaghat, T., & Babich, H. (2004). In vitro Cytotoxicity of Epigallocatechin Gallate and Tea Extracts to Cancerous and Normal Cells from the Human Oral Cavity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 191–200.
- Wienert, B., Martyn, G. E., Funnell, A. P. W., Quinlan, K. G. R., & Crossley, M. (2018). Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies.

- Trends in Genetics*, 34(12), 927–940. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.004>
- Williams, M. (2013). Introdução à Regulação Epigenética de Genes. *The Plant Cell*, 27.
- Xu, Y., Wang, D., Zhuang, Z., Jin, K., Zheng, L., Yang, Q., & Guo, K. (2015). Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in K562 human leukemia cells through JNK pathway modulation. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 6475–6482. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4258>
- Yiannakopoulou, E. C. (2015). Targeting DNA methylation with green tea catechins. *Pharmacology*, 95(3–4), 111–116. <https://doi.org/10.1159/000375503>
- Yun, J. M., Jialal, I., & Devaraj, S. (2010). Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. *British Journal of Nutrition*, 103(12), 1771–1777. <https://doi.org/10.1017/S000711451000005X>
- Zhang, D., An, X., Li, Z., & Zhang, S. (2019). Role of gene promoter methylation regulated by TETs and DNMTs in the overexpression of HLA-G in MCF-7 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4709–4714. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7481>
- Zhang, M., Gu, L., Zheng, P., Chen, Z., Dou, X., Qin, Q., & Cai, X. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. <https://doi.org/10.1002/jcla.23024>

Anexo I

PREPARAÇÃO DE CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEARES DAS CULTURAS DE CÉLULAS ERITRÓIDES - PROTOCOLO BÁSICO 1

O sangue periférico foi diluído 1:1 (v/v) com PBS (Sigma-Aldrich). Colocou-se uma camada suave em cima de uma camada de Ficoll-Paque® (Eppendorf AG) de tal forma a que a camada constitua um terço do volume total (**Tabela 0-1** Reagentes e volumes do Protocolo Básico 1 **Tabela 0-1**) e centrifugou-se 20 min a 400 $\times g$, à temperatura ambiente.

De seguida, aspirou-se a camada superior (composta por plasma e plaquetas) e recolheu-se a camada intermédia de células mononucleares com uma pipeta, para um tubo de 50 mL, ao qual se adicionou 40 mL de PBS, para se realizar uma nova centrifugação durante 5 min a 160 $\times g$, a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o *pellet* no tampão residual, para se adicionar novamente 40 mL de PBS e centrifugar 5 min a 100 $\times g$, a temperatura ambiente, finalmente aspirou-se o sobrenadante. Este último passo foi repetido com o intuito de realizar uma lavagem adicional.

Tabela 0-1 Reagentes e volumes do Protocolo Básico 1

Reagentes	Volumes (mL)
Amostra de sangue periférico	15
Soro fisiológico tampão fosfato (PBS), pH 7.4	15
Ficoll-Paque® (densidade = 1,077 g/ml)	10

PROCEDIMENTO DE CULTURA CELULAR ERITRÓIDE – PROTOCOLO BÁSICO 2

Começou-se por se preparar o meio da fase I adicionando-se FBS (Sigma-Aldrich), ciclosporina A (Sandoz) e 10% (v/v) meio condicionado a partir de 5637 linha de carcinoma da bexiga humana nos volumes estipulados (**Tabela 0-2**) de forma a completar o meio de cultura MEM completo (Sigma-Aldrich).

Uma vez que as células foram obtidas a partir de sangue periférico num volume original igual a 15 mL por dador, plaquearam-se as células mononucleares lavadas no meio de fase I em frascos de cultura de tecido de 25 cm² (T-25), num volume de equivalente ao original de sangue, por dador. As culturas celulares em suspensão foram incubadas a 37°C numa estufa humidificada, 5% CO₂ durante 5 dias.

Após este período de crescimento em meio de fase I, agitaram-se as culturas e colheram-se as células não aderentes, para centrifugação a 5 min a 160 $\times g$, a temperatura ambiente, com intuito de aspirar o sobrenadante e completar o Falcon™ (15 mL) com meio de cultura MEM completo.

Realizaram-se ainda, duas centrifugações de 5 min a 160 ×g, a temperatura ambiente com aspiração do sobrenadante e adição do mesmo volume de meio de cultura MEM completo, como mencionado no passo anterior.

Procedeu-se à preparação do meio da fase II adicionando-se os seguintes reagentes nos volumes estipulados (**Tabela 0-2**) 30% FBS (v/v), 1% (c/v) BSA, 10⁻⁵M de β-mercaptoetanol, 10⁻⁶M dexametasona, 0,3 mg/mL holo-transferrina humana, 10 ng/mL fator de células estaminais recombinantes humanas (SCF) e 1 U/mL eritropoietina humana (EPO).

As células foram crescidas no volume original, em meio de fase II e incubaram durante 7 dias, a 37° C numa estufa humidificada, 5% CO₂, até à realização da exposição experimental. Todos estes passos foram realizados em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar vertical Polaris.

Tabela 0-2 Reagentes e Volumes do Protocolo Básico 2

Reagentes	Volumes
Meio Completo MEM	32 mL
FBS, 10% (v/v)	4 mL
50 mg/mL de ciclosporina A	0.8 µL
Meio a partir de células 5637 linha de carcinoma da bexiga humana (ver receita)	4 mL
Eritropoietina humana	2.47 µL
10% (c/v) desionizado BSA (Sigma-Aldrich)	400 µL
β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)	2.8 µL
4 mg/ml de dexametasona fosfato de sódio (Sigma-Aldrich)	0.6 µL
Holo-transferrina humana (Sigma-Aldrich)	336 µL
Fator recombinante de células estaminais humanas (Sigma-Aldrich)	200 µL

Anexo II

PROCEDIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS K562

Em ambiente estéril e de acordo com (Sigma-Aldrich Co. LLC, 2016), as células adquiridas comercialmente foram descongeladas, este processo foi realizado rapidamente, de forma a minimizar os danos celulares causados pelo agente criopreservante dimetilsulfóxido (DMSO), na estufa a 37°C, o meio de cultura foi igualmente aquecido.

Posteriormente, foram transferidas para um tubo de centrifuga Falcon™ de 15 ml e adicionadas a 10 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo GlutaMAX-I, 25 mM HEPES (Invitrogen, EUA) pré-aquecido a 37 °C e complementado com 10%(v/v) FBS, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich). Foi realizada uma centrifugação de 5 minutos às 1.500 rpm para garantir a remoção de DMSO. O *pellet* celular foi ressuspendido em 5 ml de meio RPMI 1640 e transferido para frasco de cultura T-25 com 10 ml de meio fresco.

A cultura celular foi mantida em suspensão numa atmosfera humidificada de 5%(v/v) CO₂ a 37 °C durante 3 dias. Para passagens celulares, as células foram lavadas por centrifugação com PBS e o *pellet* foi ressuspendido em meios fresco RPMI 1640. As células foram criopreservadas para usos posteriores, adicionando-se a quantidade celular correspondente a 2 x células/mL a 1,5mL de *Cell Freezing Medium* (C6164, Sigma-Aldrich) suplementado com DMSO e FBS e congelando-as a -80°C.

MÉTODO DE CONTAGEM TRADICIONAL

Contagem das células foi feita desde que se encontrem sob os limites superiores e da extrema esquerda dos quadrados, excluído células que se apresentem nos limites superiores e da extrema direita (**Figure 0-1**), de acordo com **Equação 1**, **Equação 2** e **Equação 3** (Sigma-Aldrich Co. LLC, 2016).

Cálculo do número total de células e da concentração e percentagem de células viáveis através das seguintes equações:

Equação 1 Contagem do número total de células

$$\begin{aligned} &\text{Número total de células (cél/s/mL)} \\ &= \text{Média do nº de células nos quadrantes} \times \text{Fator diluição (2)} \times 10^4 \end{aligned}$$

Usou-se o fator 10^4 dado que a câmara de *Newbauer* está dividida em 9 quadrados

Equação 2 Contagem de células viáveis pelo método tradicional

$$\begin{aligned} &\text{Contagem de células viáveis (cél/s/mL)} \\ &= \frac{\text{Nº células viáveis em cada quadrante}}{\text{Nº de quadrantes contados}} \times \text{Fator diluição (2)} \times 10^4 \end{aligned}$$

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

Equação 3 Simplificação para a percentagem de células viáveis

$$\text{Percentagem de viabilidade (\%)} = \frac{\text{Nº células viáveis em cada quadrante}}{\text{Nº total de células}} \times 100$$

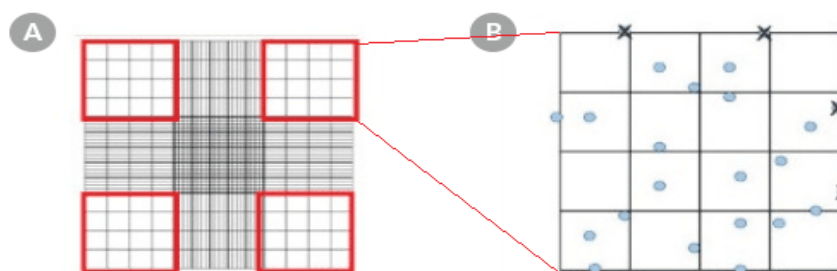


Figure 0-1 Contagem de células de acordo com o método tradicional

Contagem de células de acordo com o método tradicional (A) quatro conjuntos em vermelho, onde se contam as células e (B) os 16 quadrados dentro de cada um dos conjuntos que devem ser utilizados para a contagem (adaptado de <https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.htm>, consultado a 06/03/2020)

Anexo IV

MÉTODO DE CONTAGEM DO QUADRADO CENTRAL

Procedeu-se às contagens de células viáveis e não viáveis dentro dos quadrantes assinalados a verde na **Figure 0-2** e a clarificação da contagem quanto às margens foi efetuada seguindo o exemplo da **Figure 0-1**, para consequentes cálculos (M. Zhang et al., 2020). Estes foram efetuados tendo em consideração o fator de diluição igual a 2, assim como a área correspondente aos 5 quadrados de 0,04mm² do hemocítmetro, 0,2 mm² e a profundidade da mesma, 0,1 mm, dando origem à **Equação 4**.

Equação 4 Método melhorado para a contagem de eritrócitos

$$N^{\circ} \text{ de céls eritróides}/\mu\text{L} = \frac{N^{\circ} \text{ céls eritróides} \times 2}{0,2 \times 0,1}$$

A partir desta equação foi efetuado uma simplificação de forma a facilitar os cálculos, originando a **Equação 5**.



Figure 0-2 Quadrantes para contagem

*Quadrantes para contagem de precursores eritróides
(Adaptado de <https://medstudentscorner.com/determination-red-blood-cell-rbc-count/>, consultado a 16/12/2020)*

Equação 5 Simplificação dos cálculos pelo método melhorado

$$N^{\circ} \text{ de céls eritróides}/\mu\text{L} = N^{\circ} \text{ céls eritróides} \times 100$$

Os cálculos da concentração e percentagem de viabilidade, foram realizados de acordo com o exposto no método tradicional.

Anexo V

Tabela 0-3 Quantificação de RNA

Amostra		Concentração (ng/ul)	Amostra		Concentração (ng/ul)
24h – A	EGCG	115,5	48h – F	EGCG	31,4
	GN	13,2		GN	23,6
	E+G	95,8		E+G	31,1
	V	129,9		V	35,9
	CN	56,7		CN	70,1
	HU	295,7		HU	204,6
	CN HU	272,8		CN HU	270,3
24h – B	EGCG	63,8	48h – G	EGCG	41,3
	GN	43,3		GN	38,6
	E+G	90,3		E+G	21,7
	V	108,4		V	5,3
	CN	69,1		CN	11
	HU	248,7		HU	232,6
	CN HU	228,3		CN HU	179,5
24h – C	EGCG	85,2	72h – H	EGCG	49,5
	GN	45		GN	43,2
	E+G	43,6		E+G	38,7
	V	26,7		V	8,6
	CN	51,3		CN	22,2
	HU	243,9		HU	291,1
	CN HU	233,1		CN HU	113,2
48h – D	EGCG	21,8	72h – I	EGCG	23,1
	GN	47,3		GN	12,7
	E+G	27,8		E+G	17
	V	30,9		V	7,7
	CN	74,8		CN	62
	HU	211,2		HU	184,4
	CN HU	187,2		CN HU	168,7
48h – E	EGCG	19			
	GN	24,1			
	E+G	22,3			
	V	31,7			
	CN	34			
	HU	175,2			
	CN HU	178,2			
	V	7,7			
	CN	62			
	HU	184,4			
	CN HU	168,7			

CN HU, nas tabelas representa o controlo, uma vez que a exposição à hidroxiureia teve de ser repetida isoladamente e por isso, realizou-se um controlo específico.