



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**



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

# **Análise da expressão de microRNA moduladores da hemoglobina fetal em células expostas a extratos de *Carica papaya***

**FILIPA CARVALHÃO JACQUES**

Trabalho de Dissertação da natureza científica para obtenção do grau de  
Mestre  
em Engenharia Biomédica

(Versão definitiva)

Orientadores:

Professora Doutora Anita Quintal Gomes (ESTeSL, H&TRC)  
Professor Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Lisboa, novembro de 2023



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

**Análise da expressão de microRNA moduladores da  
hemoglobina fetal em células expostas a extratos de *Carica  
papaya***

FILIPA CARVALHÃO JACQUES

Orientadores:

Professora Doutora Anita Quintal Gomes (ESTeSL, H&TRC)  
Professor Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Júri:

Presidente: Professora Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)  
Vogais: Professora Doutora Andreia Barbosa Valença (Faculdade Medicina Veterinária,  
Universidade Lusófona)  
Professora Doutora Anita Quintal Gomes (ESTeSL, H&TRC)

**Mestrado em Engenharia Biomédica**

Lisboa, novembro de 2023





# **Análise da expressão de microRNA moduladores da hemoglobina fetal em células expostas a extratos de *Carica papaya***

Filipa Carvalhão Jacques

2023

Este projeto foi financiado pelo **Instituto Politécnico de Lisboa** para o projeto “Análise da Expressão de microRNAs moduladores da hemoglobina fetal em células expostas a extratos de *Carica papaya*”, registado como IDI&CA-IPL/2022/miRCa/ESTeSL. O presente trabalho foi desenvolvido no **Health & Technology Research Center (H&TRC)**, localizado na **Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)**, sob supervisão do Professor Doutor Rui Miguel de Brito (ESTeSL) e da Professora Doutora Anita Quintal Gomes (ESTeSL).

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

Copyright © 2023 – Filipa Jacques



# 1. Agradecimentos

---

Em primeiro lugar quero expressar a minha sincera gratidão aos meus orientadores: a Professora Doutora Anita Gomes e o Professor Doutor Miguel Brito pela vossa orientação e apoio durante a realização da minha dissertação. Os vossos conhecimentos e ensinamentos foram inestimáveis e estou grata pela vossa ajuda, paciência e encorajamento.

Agradeço aos Professores, Professora Doutora Edna Ribeiro e Professor Doutor Mário Gomes pelas orientações e disponibilidade durante estes meses. A vossa experiência e apoio foram fundamentais para o meu progresso.

Quero ainda expressar o meu agradecimento às Professoras, Professora Doutora Magda Semedo, Professora Doutora Alexandra Costa e Professora Doutora Patrícia Barata obrigada pelas contribuições significativas para a minha tese de mestrado e pelo papel influente que tiveram no meu desenvolvimento académico.

À Mariana Delgadinho e à Catarina Ginete, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pelo afeto e pela ajuda preciosa que tiveram durante a realização desta dissertação.

Aos meus professores que me acompanharam ao longo do percurso académico. O vosso conhecimento, apoio e encorajamento ao longo destes anos foram inestimáveis.

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

Agradeço à equipa de apoio ao laboratório.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial, à Beatriz Mateus, Diogo Barradas, Gonçalo Gonçalves, Ricardo Monteiro e Sara Macedo, sem vocês este percurso não seria tão gratificante.

Um agradecimento especial à minha mãe e irmã, por acreditarem em mim e me apoiarem desde o primeiro dia. À minha mãe por ser um exemplo de força, resiliência e determinação. Obrigada pelo carinho e amor incondicional.

Ao meu namorado, Diogo Xavier, quero expressar a minha mais profunda gratidão por ter sido um apoio inabalável em todas as etapas do meu percurso, desde a celebração dos meus triunfos até à consolação nos momentos de derrota.

Às minhas queridas amigas, Joana Brito, Joana Jacinto, Daniela Cunha e Rita Pereira, quero expressar a minha sincera gratidão pelo vosso apoio incondicional, amizade duradoura e afeto sem limites.

Ao meu querido avô, João Mário, o teu legado não só deixou uma marca inesquecível na nossa família, como também me inspirou no meu percurso em engenharia. Seguir os teus passos enche-me de um profundo sentimento de orgulho, e só posso esperar honrar a tua memória continuando a perseguir a excelência neste campo. Obrigado por seres uma fonte de inspiração e orgulho na minha vida.

A todas as pessoas que cruzaram a minha vida e que de algum modo ajudaram a concluir mais um percurso.

## 2. Resumo

---

**Introdução:** As hemoglobinopatias são doenças sanguíneas genéticas resultantes de mutações e genes que codificam a hemoglobina, que perturbam o transporte de oxigênio e conduzem a diversas complicações de saúde. Para fazer face a estes desafios, é necessário aumentar os níveis de hemoglobina fetal (HbF) como abordagem terapêutica, mas o principal tratamento, a hidroxiureia (HU), enfrenta limitações relacionadas com o custo e a segurança, especialmente em países subdesenvolvidos. Para ultrapassar estas limitações, os investigadores estão a estudar alternativas naturais, como os extratos de folhas de *Carica papaya*, para aumentar a produção de HbF, esta abordagem natural promete minimizar os efeitos secundários indesejáveis associados aos tratamentos convencionais como a hidroxiureia.

**Objetivo:** Avaliar o efeito de diferentes concentrações dos extratos metanólicos e aquosos nas folhas de *Carica papaya* em células K562 (linha celular humana mortalizada de leucemia mieloide) para avaliar o seu impacto na regulação da HbF

**Material e Métodos:** Foi realizada uma investigação comparativa, na qual foram avaliados os efeitos de extratos aquosos e metanólicos derivados das folhas de *Carica papaya* (EMFCP e EAFCP, respetivamente) na indução da HbF e seus genes reguladores, tendo-se usado a exposição a HU como controlo positivo. As células K562 foram expostas a um período 24 horas a concentrações variáveis de EMFCP e EAFCP (0,05, 0,5 e 5 µg/mL). Após a exposição foram avaliados os efeitos da expressão génica a partir do RNA total, recorrendo à técnica de RT-qPCR. Analisaram-se os níveis de expressão dos genes das globinas (*HBA*, *HBB* e *HBG1*); genes reguladores da HbF (*BCL11A*, *HIC2* e *BGLT3*), assim como os moduladores epigenéticos da globina (*DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*), tendo como gene de referência o *GAPDH*. Foram ainda analisados os miRNAs envolvidos na regulação da HbF (miR-30a-3p, miR-29c-3p e o miR-148b-3p), tendo como referência o miR-miRNA-423-3p.

**Resultados:** A proliferação celular e a viabilidade das células K562 permaneceram inalteradas em todas as concentrações para todos os compostos testados. Os compostos estudados não apresentam sinais de citotoxicidade. A análise transcricional revelou efeitos opostos aos esperados aquando da exposição, ao EMFCP (0,05 µg/mL e 0,5 µg/mL), uma vez que há uma regulação negativa dos genes das hemoglobinas, como observado nos perfis de expressão dos genes *HBA* e *HBB* e a indução da expressão do gene inibidor da HbF, o *BCL11A*. Estes resultados são reproduzidos em células expostas ao EAFCP (à concentração de 0,5 µg/mL) onde também se verifica o aumento da expressão deste regulador negativo da expressão da HbF, o *BCL11A*. Estes compostos exibiram também efeitos reguladores importantes sobre a expressão de miRNAs específicos, nomeadamente o miR-29c-3p e o miR-148b-3p. A expressão do miR-29c-3p diminuiu com a exposição ao EMFCP, EAFCP e HU, enquanto os seus genes alvo – o *BCL11A* e o *DNMT3B* – a sua expressão aumentou. A expressão do miR-148b-3p diminuiu quando exposto ao EMFCP, enquanto a do seu gene alvo, *BCL11A* aumentou, alinhando-se com o papel regulador negativo do miRNA.

**Conclusão:** Este estudo introduz uma nova perspetiva sobre os compostos naturais como moduladores da HbF. Os resultados observados, envolvendo alterações nos genes reguladores da HbF, são promissores para investigação futura acerca de terapias da hemoglobina com base em compostos naturais.

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

### 3. Abstract

---

**Introduction:** Hemoglobinopathies are genetic blood diseases resulting from abnormal hemoglobin, which disrupt oxygen transport and lead to various health complications. To address these challenges, it is necessary to increase fetal hemoglobin (HbF) levels as a therapeutic approach, but the main treatment, hydroxyurea (HU), faces limitations related to cost and safety, especially in underdeveloped countries. To overcome these limitations, researchers are studying natural alternatives, such as *Carica papaya* leaf extracts, to increase HbF production, a natural approach that promises to minimize the undesirable side effects associated with conventional treatments such as hydroxyurea.

**Objective:** To evaluate the effect of different concentrations of the methanolic and aqueous extracts of *Carica papaya* leaves on K562 cells (human myeloid leukemia cell line) in order to assess their impact on the regulation of HbF.

**Material and Methods:** The study carried out a comparative investigation in which the effects of aqueous and methanolic extracts derived from *Carica papaya* leaves (EMFCP and EAFCP, respectively) on the induction of HbF and its regulatory genes were evaluated, using exposure to HU as a positive control. K562 cells were exposed for 24 hours to varying concentrations of EMFCP and EAFCP (0.05, 0.5 and 5 µg/mL). After exposure, the effects on gene expression were assessed using RT-qPCR from total RNA. The expression levels of globin genes (*HBA*, *HBB* and *HBG1*); HbF regulatory genes (*BCL11A*, *HIC2* and *BGLT3*), as well as globin epigenetic modulators (*DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* and *HDAC8*) were analyzed, with GAPDH as the reference gene. The miRNAs involved in the regulation of HbF (miR-30a-3p, miR-29c-3p and miR-148b-3p) were also analyzed, using miR-423-3p as the reference gene.

**Results:** Cell proliferation and the viability of K562 cells remained unchanged at all concentrations for all the compounds tested. The compounds studied showed no signs of cytotoxicity. Transcriptional analysis revealed opposite effects to those expected on exposure to EMFCP (0.05 µg/mL and 0.5 µg/mL), since there is a negative regulation of hemoglobin genes, as observed in the expression profiles of the *HBA* and *HBB* genes and the induction of expression of the HbF inhibitor gene, *BCL11A*. These results are reproduced in cells exposed to EAFCP (at a concentration of 0.5 µg/mL) where there is also an increase in the expression of this negative regulator of HbF expression, *BCL11A*. These compounds also showed significant regulatory effects on the expression of specific miRNAs, namely miR-29c-3p and miR-148b-3p. The expression of miR-29c-3p decreased with exposure to EMFCP, EAFCP and HU, while its target genes - *BCL11A* and *DNMT3B* - increased their expression. The expression of miR-148b-3p decreased when exposed to EMFCP, while the expression of its target gene, *BCL11A*, increased, in line with the negative regulatory role of miRNA.

**Conclusion:** This study introduces a new perspective on natural compounds as modulators of HbF. The results observed, involving changes in HbF regulatory genes, are promising for future research into hemoglobin therapies based on natural compounds.

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

## 4. Índice Geral

---

1.	Agradecimentos .....	v
2.	Resumo .....	vi
3.	Abstract.....	vii
4.	Índice Geral.....	viii
5.	Índice de Tabelas .....	xi
6.	Índice de Figuras.....	xi
7.	Lista de abreviaturas e símbolos .....	xiii
1.	Introdução .....	1
1.1.	Hemoglobina .....	1
1.2.	Hemoglobinopatias .....	2
1.2.1.	Epidemiologia .....	3
1.2.2.	Beta-Talassémia .....	4
1.2.3.	Anemia falciforme.....	4
1.3.	Expressão diferencial dos genes para as globinas durante a ontogénese.....	5
1.4.	Regulação da expressão da hemoglobina.....	6
1.4.1.	Regulação a nível transcricional.....	8
1.4.1.1.	BCL11A.....	8
1.4.1.2.	BGLT3 .....	8
1.4.1.3.	HIC2.....	8
1.4.2.	Regulação epigenética .....	9
1.4.2.1.	Metilação do DNA.....	9
1.4.2.2.	Modificação de histonas.....	10
1.4.2.2.1.	HDAC 1 e 2.....	11
1.4.2.2.2.	HDAC 3 e 8.....	11
1.4.3.	Regulação ao nível pós-transcricional.....	11
1.4.3.1.	miR-148b-3p.....	11
1.4.3.2.	miR-29c-3p .....	12
1.4.3.3.	miR-30a-3p .....	12
1.5.	Diagnóstico e Terapêuticas da Anemia Falciforme .....	12

1.5.1.	Diagnóstico.....	12
1.5.2.	Transplante de células estaminais hematopoiéticas.....	13
1.5.3.	Terapia génica .....	13
1.5.4.	Transfusões de sangue.....	13
1.5.5.	Indução farmacológica .....	14
1.5.6.	Hidroxiureia .....	15
1.6.	Compostos naturais indutores da HbF .....	16
1.6.1.	Carica papaya .....	16
2.	Objetivos.....	18
2.1.	Questão da investigação.....	18
2.2.	Objetivos gerais .....	18
2.3.	Objetivos específicos .....	18
3.	Material e métodos.....	19
3.1.	Colheita e preparação do material vegetal .....	19
3.2.	Extração .....	19
3.2.1.	Preparação do extrato aquoso de C. papaya .....	19
3.2.2.	Preparação do extrato metanólico de C. papaya.....	20
3.3.	Cultura de células .....	20
3.3.1.	Linha celular K562.....	20
3.3.2.	Técnicas de cultura de células K562: Seleção de reagentes e manutenção .....	21
3.4.	Exposição de células K562 com EMFCP e EAFCP .....	22
3.5.	Viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade .....	23
3.5.1.	Azul tripano.....	23
3.5.2.	CellTiter-Blue.....	24
3.5.3.	CytoTox-96 .....	24
3.6.	Extração de RNA e síntese DNA complementar (cDNA) .....	25
3.7.	Amplificação por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR).....	26
3.8.	Análise estatística .....	29
4.	Resultados.....	30
4.1.	Viabilidade, proliferação e citotoxicidade .....	30
4.2.	Análise da eficiência da amplificação dos genes por PCR em tempo real.....	33

4.3.	Análise da expressão génica das globinas.....	35
4.4.	Análise da expressão génica dos reguladores transcricionais .....	38
4.5.	Análise da expressão génica dos moduladores epigenéticos .....	41
4.6.	Análise da expressão dos miRNAs reguladores pós-transcricionais .....	47
5.	Discussão .....	50
6.	Conclusão .....	58
7.	Perspetivas futuras .....	59
8.	Referências bibliográficas.....	60
9.	Anexos .....	67
	Anexo 1: Descongelação celular .....	67
	Anexo 2: Passagem de células em suspensão.....	68
	Anexo 3: Criopreservação.....	69
	Anexo 4: Contagem de células com azul tripano .....	70
	Anexo 5: Ensaio de viabilidade celular CellTiter-Blue.....	71
	Anexo 6: Ensaio de citotoxicidade não-radioativo CytoTox 96.....	72
	Anexo 7: Extração de RNA.....	73
	Anexo 8: Reação síntese de cDNA (estudo miRNAs) .....	74
10.	Apêndices .....	75
	Apêndice I: Quantificação de RNA.....	75
	Apêndice II: Reação de síntese de cDNA SuperScript™ IV First-Strand.....	76
	Apêndice III: Princípio da técnica de PCR quantitativo em tempo real e respetivo procedimento .....	77

## 5. Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1.1</b> – Uso medicinal tradicional da <i>Carica papaya</i> em diversas partes do mundo.....	17
<b>Tabela 3.1</b> – Sequência dos <i>primers</i> e temperaturas de <i>melting</i> específicas utilizadas na reação de PCR quantitativo em tempo real. ....	27
<b>Tabela 3.2</b> – Referência de <i>primers</i> com modificação LNA (Qiagen) utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real para estudo dos miRNAs. ....	27
<b>Tabela 4.1</b> – Eficiência dos genes em estudo através do Green kit One-Step NZYSpeedy RT-qPCR.....	34
<b>Tabela 9.1</b> – Volumes dos reagentes utilizados na reação síntese de cDNA. ....	74
<b>Tabela 10.1</b> – Resultados da quantificação do RNA presente nas amostras celulares.....	75
<b>Tabela 10.2</b> – Volumes dos reagentes utilizados na reação .....	76
<b>Tabela 10.3</b> - Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação .....	76
<b>Tabela 10.4</b> – Reagentes utilizados na reação de RT-qPCR para análise dos genes.....	78
<b>Tabela 10.5</b> – Condições de amplificação da reação de RT-qPCR.....	78
<b>Tabela 10.6</b> – Reagentes usados na reação de RT-qPCR (miRNAs).....	79
<b>Tabela 10.7</b> – Condições de amplificação da reação de RT-qPCR (miRNAs).....	79

## 6. Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.1</b> - Estrutura da hemoglobina humana.....	1
<b>Figura 1.2</b> - Representação esquemática do cluster de $\alpha$ -globina.....	2
<b>Figura 1.3</b> - Representação esquemática do cluster de $\beta$ -globina.....	2
<b>Figura 1.4</b> – Distribuição global e em Portugal de hemoglobinopatias.....	3
<b>Figura 1.5</b> - Lâmina de esfregaço de sangue periférico, corada, para observação das hemácias características da drepanocitose.....	5
<b>Figura 1.6</b> - Locus $\beta$ -globina humano e a sua regulação ao longo do desenvolvimento.....	6
<b>Figura 1.7</b> - Principais fatores de transcrição, miRNAs e mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão do gene da globina fetal durante o switch da hemoglobina.....	7
<b>Figura 1.8</b> - Mecanismos epigenéticos e papel da metilação do DNA, da modificação das histonas por acetilação e metilação e do controlo pós-transcricional por microRNA. A DNA Metiltransferase está envolvida na metilação de genes. A HAT e a HDAC estão envolvidas na acetilação das histonas e na remodelação da cromatina. Os microRNAs estão envolvidos no controlo pós-transcricional de genes.....	9
<b>Figura 1.9</b> - Abordagens terapêuticas atuais e futuras para a $\beta$ -talassemia.....	14
<b>Figura 1.10</b> – Mecanismo de ação da hidroxiureia.....	15
<b>Figura 1.11</b> – <i>Carica papaya</i> fruto, folha e extrato.....	17
<b>Figura 3.1</b> - Folhas de <i>Carica papaya</i> pulverizadas.....	19
<b>Figura 3.2</b> – Preparação do extrato metanólico.....	20

<b>Figura 3.3</b> – Cultura de células K562.....	21
<b>Figura 3.4</b> – Linha de células K562 submetida a passagens em série.....	22
<b>Figura 3.5</b> – Tratamento em placas de 6 poços.....	23
<b>Figura 3.6</b> – Ensaio de viabilidade CellTiter-Blue em placas de 96 poço. ....	24
<b>Figura 3.7</b> - Ensaio de citotoxicidade CitoTox96 em placas de 96 poços. ....	25
<b>Figura 4.1</b> – Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na proliferação das células K562. 30	
<b>Figura 4.2</b> – Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na viabilidade das células K562. . 31	
<b>Figura 4.3</b> - Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na viabilidade das células K562 no Ensaio CellTiter-Blue. ....	32
<b>Figura 4.4</b> – Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na citotoxicidade das células K562 no Ensaio CytoTox96. ....	33
<b>Figura 4.5</b> – Gráfico de quantificação do gene HBA em PCR em tempo real no termociclador com o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix. ....	34
<b>Figura 4.6</b> - Gráfico de quantificação do gene HBA em PCR em tempo real no termociclador com o One-Step NZYSpeedy RT-qPCR Green Kit.....	34
<b>Figura 4.7</b> – Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HBA</i> . ....	35
<b>Figura 4.8</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HBB</i> . ....	36
<b>Figura 4.9</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HBG1</i> .....	37
<b>Figura 4.10</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>BCL11A</i> . ....	38
<b>Figura 4.11</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>BGLT3</i> . ....	39
<b>Figura 4.12</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HIC2</i> . ....	40
<b>Figura 4.13</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>DNMT1</i> . ....	41
<b>Figura 4.14</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>DNMT3B</i> . ....	42
<b>Figura 4.15</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HDAC1</i> . ....	43
<b>Figura 4.16</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HDAC2</i> . ....	44
<b>Figura 4.17</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HDAC3</i> . ....	45
<b>Figura 4.18</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene <i>HDAC8</i> . ....	46
<b>Figura 4.19</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do miR-30a-3p. ....	47
<b>Figura 4.20</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do miR-29c-3p. ....	48
<b>Figura 4.21</b> - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do miR-148b-3p. ....	49
<b>Figura 10.1</b> - Fases da curva de amplificação do qPCR. ....	78

## 7. Lista de abreviaturas e símbolos

---

A <sub>230</sub>	Absorvância a 230 nm
A <sub>260</sub>	Absorvância a 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorvância a 280 nm
Atm	Atmosferas (Unidade de pressão)
B	Branco
BGLT3	Transcrito do locus da $\beta$ -globina ( <i>Beta Globin Locus Transcript 3</i> )
BCL11A	Proteína <i>B-cell leukemia and lymphoma 11a</i>
cDNA	DNA complementar
CN	Controlo
CN (-)	Controlo negativo
DCF	Doença das células falciformes
DRED	<i>Direct repeat erythroid-definitive complex</i>
DNMSO	Dimetilsufóxido
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3A	DNA metiltransferase 3A
DNMT3B	DNA metiltransferase 3B
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Fosfatos
EAFCP	Extrato Aquoso de Folhas de <i>Carica papaya</i>
EKLF	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>
EMFCP	Extrato Metanólico de Folhas de <i>Carica papaya</i>
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa
FBS	Soro bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GATA1	<i>GATA transcription factor 1</i>
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina Adulta
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina Adulta <i>minor</i>
HBA	Gene da $\alpha$ -globina
HBB	Gene da $\beta$ -globina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbF Switch	Mudança da expressão maioritária da HbF para HbA após o parto
HBG	Gene da $\gamma$ -globina (HbF)
HbS	Hemoglobina S
HDAC1	Histona desacetilase 1
HDAC2	Histona desacetilase 2
HDAC3	Histona desacetilase 3

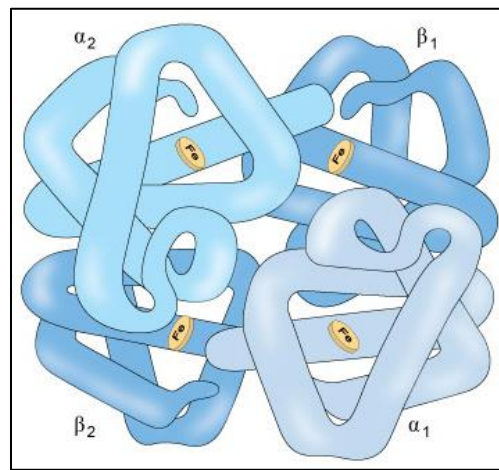
HDAC8	Histona desacetilase 8
HIC2	HIC ZBTB repressor transcricional 2
HU	Hidroxiureia
H&TRC	Centro de Investigação em Saúde Tecnologia ( <i>Health and Technology Research Center</i> )
ISEL	Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
IPL	Instituto Politécnico de Lisboa
KLF1	Fator de transcrição 1 do tipo Kruppel ( <i>Kruppel Like Factor 1</i> )
LCR	<i>Locus Control Region</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MYB	Família de genes MYB
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NTC	<i>No template control</i>
PBS	Tampão fosfato salino
qPCR	PCR (Reação em cadeia da polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) quantitativo
SCD	Sickle Cell Disease
Ta	Temperatura ambiente

# 1. Introdução

## 1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é a proteína mais prevalente que se encontra nos eritrócitos [1] [2]. Esta proteína é responsável pelo transporte de oxigênio ( $O_2$ ), desde os pulmões até aos vários tecidos e órgãos do corpo [3], é constituída por quatro monómeros, unidos entre si, através de ligações covalentes, criando uma estrutura quaternária. Cada monómero é constituído por uma fração proteica e um grupo prostético (heme) que contém um átomo de ferro [1][4]. O heme é essencial para o transporte do oxigênio, enquanto a globina protege o heme da oxidação, torna a molécula solúvel e permite variações da afinidade para o oxigênio. A sua síntese é um processo complexo, que tem lugar nos precursores eritroides [1][3][5].

É uma proteína quaternária com cerca de 64,000 Da, formada por dois pares de cadeias polipeptídicas, duas cadeias do tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo beta ( $\beta$ ) (**Figura 1.1**)[5][6].



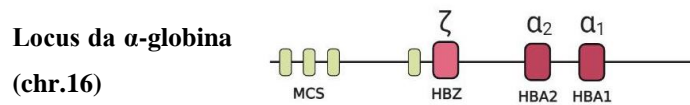
**Figura 1.1** - Estrutura da hemoglobina humana.  
Adaptado de [7]

A forma como os genes das cadeias de globina  $\alpha$  e  $\beta$  são ativados é controlada por grupos de genes (clusters) situados no segmento distal do braço curto do cromossoma 16 (16p13.3) e do braço curto do cromossoma 11 (11p15.5), respetivamente [8].

O agrupamento de génico da  $\alpha$ -globina (**Figura 1.2**) contém os genes duplicados  $\alpha_2$  (*HBA2*) e  $\alpha_1$  (*HBA1*), o gene embrionário  $\zeta_2$  (*HBZ*), três pseudogenes ( $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_1$  e  $\psi\alpha_2$ ) e um gene  $\theta$  [9].

Antes de chegar aos genes da  $\alpha$ -globina, existem quatro sequências não codificantes altamente conservadas (MCS), denominadas MCS-R1 a -R4 [10]. A comparação de sequências genéticas entre espécies é crucial. Estão a ser desenvolvidos métodos para encontrar sequências altamente semelhantes, denominadas "Multi-species Conserved Sequences" (MCSs) [10], [11]. As MCSs contêm sequências relacionadas com a regulação dos genes e outros elementos potencialmente importantes. A deteção de MCSs ajuda a avaliar a contribuição de uma espécie para encontrar regiões genómicas chave [11].

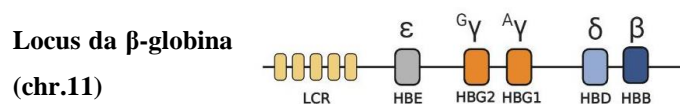
Estas sequências são hipersensíveis à ação da enzima DNaseI e localizam-se a montante do gene  $\zeta$ -globina, sendo designadas como HS-10, HS.33, HS-40 e HS-48 [8][12]. A sequência HS-40 é considerada a sequência *major*, na expressão do gene  $\alpha$  [9].



**Figura 1.2** - Representação esquemática do cluster de  $\alpha$ -globina. Adaptado de [13].

O agrupamento génico da  $\beta$ -globina contém cinco genes distintos (**Figura 1.3**), o gene embrionário  $\epsilon$  (*HBE*), os genes fetais  $A\gamma$  (*HBG1*) e  $G\gamma$  (*HBG2*), subunidade delta da hemoglobina  $\sigma$  (*HBD*) e subunidade beta da hemoglobina  $\beta$  (*HBB*). A montante do complexo da  $\beta$ -globina, encontra-se a Região de Controlo do Locus (LCR), que contém cinco regiões hipersensíveis à DNase I, designadas HS 1-5. Estes genes são ativados e silenciados ao longo do desenvolvimento humano [14].

A disposição dos cinco genes está organizada de acordo com a sua orientação durante o processo de desenvolvimento humano, ou seja,  $5' - \epsilon - \gamma^G - \gamma^A - \psi\beta - \sigma - \beta - 3'$ . O LCR tem um papel importante na expressão do gene *HBB*, uma vez que, mantém a cromatina num estado de abertura e funciona como ativador (*enhancer*) da transcrição do gene [14][15].



**Figura 1.3** - Representação esquemática do cluster de  $\beta$ -globina. Adaptado de [13].

## 1.2. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, de transmissão autossómica recessiva que afetam os glóbulos vermelhos, são resultantes de mutações nos genes que codificam a hemoglobina, levando à alteração na sua produção e comprometendo o equilíbrio desta proteína [16]. A maioria dos sintomas ocorrem nos primeiros meses de idade, como consequência da transição das cadeias pré-natais em cadeias pós-natais [16][17]. Estas podem ser classificadas como a) qualitativas, existem variantes da Hb que causam alteração na estrutura da molécula, afetando as cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$ , levando a graus variados de anemia (por exemplo, HbS, HbC, etc) [1][16] ou b) quantitativas, que são perturbações da síntese do gene da globina, provocando a redução ou perda de produção de hemoglobina (por exemplo, talassemias ( $\alpha$ -talassémica/ $\beta$ -talassémica) [17].

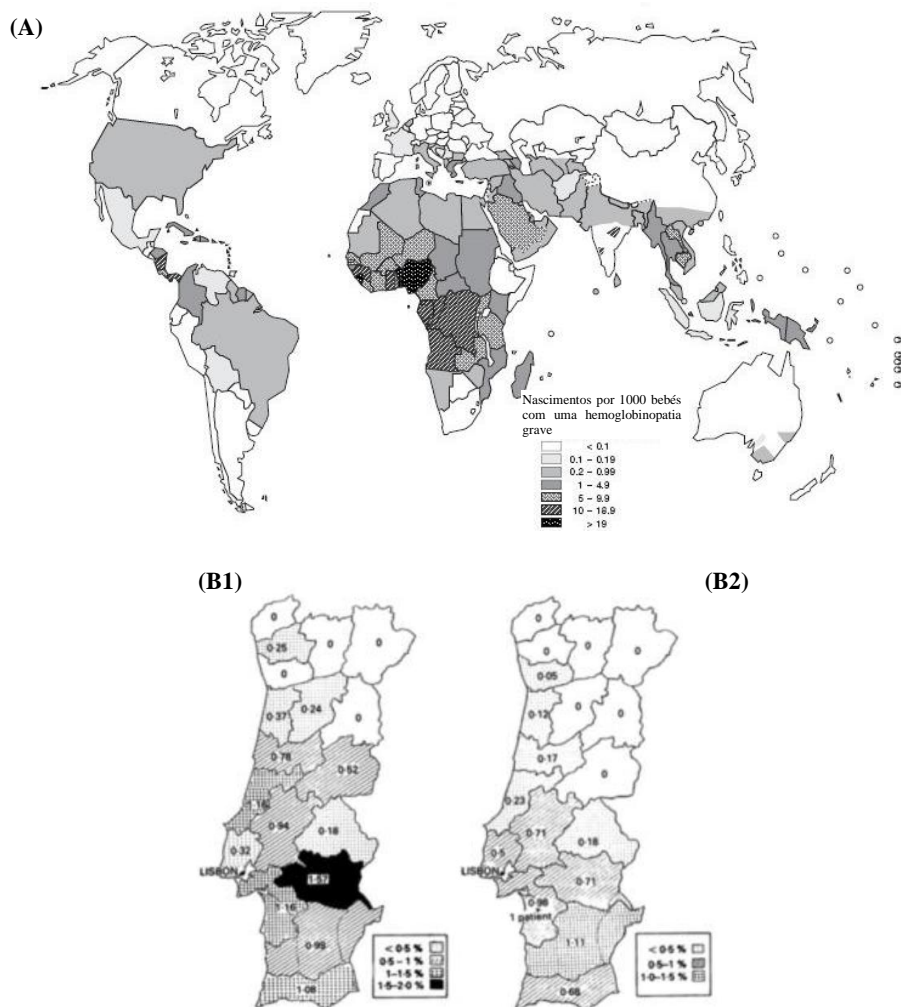
### 1.2.1. Epidemiologia

É estimado que cerca de 7% da população mundial é portador de hemoglobinopatias e que cerca de 300 a 500 mil casos são nascimentos de bebés são com drepanocitose e formas severas de talassemia [18].

As principais hemoglobinopatias incluem a doença das células falciformes e a  $\beta$ -talassemia, sendo a sua maior incidência em África, Região Mediterrânea, Sudeste Asiático e Médio Oriente (**Figura 1.4 (A)**) [19].

Em Portugal entre 1987 e 1993 foi realizado um rastreio a nível nacional através do Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias (PNCH). Esta avaliação permitiu analisar e completar a informação relativa a portadores ou doentes com hemoglobinopatias. Os resultados mostraram uma baixa frequência média de portadores de talassemia (0-45%) e de hemoglobina S (0-32%) [20]. No entanto, estas doenças distribuem-se de forma desigual pelo país, com maior prevalência nalgumas zonas, principalmente no sul. Verificou-se que os distritos com maior prevalência de HbS são Beja, Faro, Santarém, Évora e Setúbal e de portadores de  $\beta$ -talassémia, na Bacia do Rio Mira e no Barlavento Algarvio (**Figura 1.4(B)**) [17].

Estas diferenças entre o norte e o sul de Portugal podem estar relacionadas com vários fatores, sobretudo históricos.



**Figura 1.4** – Distribuição global e em Portugal de hemoglobinopatias.

(A) Distribuição global de hemoglobinopatias. Adaptado de [21]. (B1) Prevalência de portadores de  $\beta$ -talassémia em Portugal (B2) Prevalência de HbS em Portugal. Adaptado de [17].

A Doença das Células Falciforme (DCF) está relacionada com a incidência da malária em países como África. A prevalência dos heterozigotos com uma hemoglobinopatia em áreas onde a malária é endêmica, pode explicar a prevalência relativa de portadores [22]. O *Plasmodium falciparum* é a forma mais comum e mais grave de malária, este protozoário é transmitido através da picada de uma fêmea de mosquito. A transmissão passa para a corrente sanguínea afetando as células do fígado e os glóbulos vermelhos [23]. Os parasitas invadem os glóbulos vermelhos e reorganizam o seu conteúdo. Reproduzem-se e produzem proteínas que alteram a conformação dos eritrócitos. No entanto a DCF afeta a capacidade do parasita de completar o ciclo, uma vez que a sua membrana com forma invulgar se torna porosa e deixa vaziar nutrientes necessários para a sobrevivência dos parasitas. O organismo acaba por eliminar estas células destruindo o parasita, que significa uma doença mais ligeira [24], [25].

### **1.2.2. Beta-Talassémia**

As doenças sanguíneas, caracterizadas pela redução ou ausência da síntese das cadeias de globina normais e a consequente diminuição da síntese da hemoglobina, designam-se por talassemias. Estas podem ser classificadas como  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\delta\beta$ - ou  $\epsilon\delta\beta$ -talassemias, conforme a cadeia afetada [26][27].

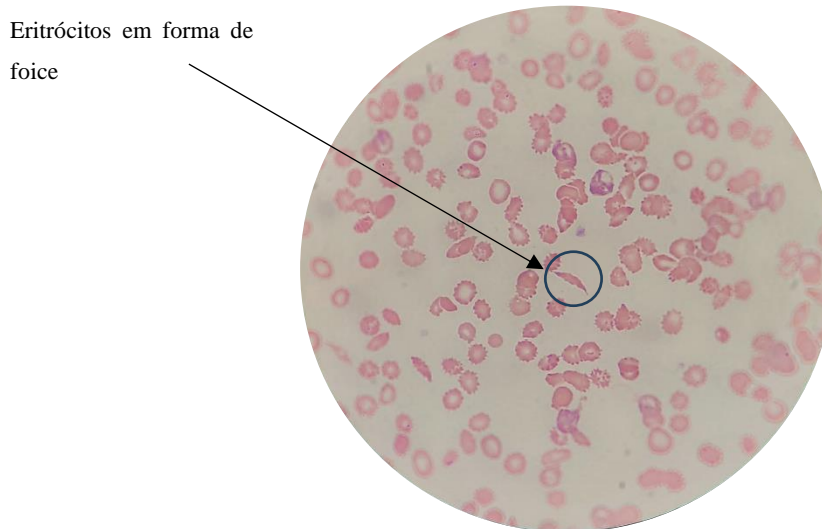
A  $\beta$ -talassemia é uma consequência de pequenas deleções/mutações do gene  $\beta$ -globina, enquanto a  $\alpha$ -talassemia é uma consequência de deleções que removem grande parte do gene  $\alpha$ . Assim, a redução significativa de uma cadeia de globina altera o equilíbrio normal entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , levando a uma acumulação intracelular, que resulta em efeitos patológicos, como a destruição precoce dos precursores eritroides antes de alcançarem o estado de maturação. Estas mutações afetam os genes *HBA* e *HBB* em quadros clínicos mais severos [28].

Existem três tipos de  $\beta$ -talassemias, a *minor*, a intermédia e a *major*. A  $\beta$ -talassemia *major*, também conhecida por anemia de *Cooley*, é o tipo de anemia mais grave provocada por eritropoiese ineficiente dependente de transfusões, danos nos órgãos secundários à sobrecarga de ferro. A redução de Hb resulta na expansão da medula óssea para compensar a perda de hemácias, levando a anormalidades ósseas, aumento do baço e restrição do crescimento. Na talassemia intermédia os indivíduos têm uma capacidade reduzida para a produção da cadeia  $\beta$  da Hb. Em alguns casos as mutações  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam-se em simultâneo. O tipo de anemia é mais ligeiro, e os doentes podem não precisar de transfusão de sangue. A talassemia *minor* ocorre quando uma cópia do gene da globina  $\beta$  é normal e a outra cópia defeituosa. Esta talassemia ocorre sobretudo durante o stress fisiológico ou a gravidez e na infância. Devido à redução da síntese de  $\beta$ -globina, há uma incapacidade de produzir quantidades suficientes de Hb A, desencadeando mecanismos para compensar, que aumentam a produção de cadeias de  $\delta$ - e  $\gamma$ -globina, o que por sua vez leva à elevação de níveis de HbA<sub>2</sub> e HbF [27].

### **1.2.3. Anemia falciforme**

A DCF é uma doença genética que afeta a forma dos glóbulos vermelhos. Esta condição é causada por uma mutação no gene da hemoglobina, levando à produção anormal de hemoglobina, também designada de hemoglobina S (HbS) [1], [29]. Em indivíduos com DCF, há uma mutação específica numa das subunidades da hemoglobina. A mutação que dá origem à HbS ocorre numa base específica do DNA do gene da  $\beta$ -globina, que leva à substituição de um aminoácido por outro aminoácido, nomeadamente, a substituição do ácido glutâmico por uma valina (GTG – GAG; uma timina é substituída por uma adenina) no sexto codão deste gene [30]–[32].

Tal conduz à formação de tetrâmeros de hemoglobina falciforme (HbS) que polimerizam e agregam após a desoxigenação, distorcendo os eritrócitos, que assumem a forma de foice, particularmente sob baixos níveis de oxigênio (**Figura 1.5**). Devido a esta forma de foice, os eritrócitos bloqueiam os vasos sanguíneos, diminuindo a passagem de oxigênio nos órgãos e tecidos conduzindo a manifestações clínicas tais como, dor, hemólise, anemia, aumento do stress oxidativo e inflamação [30]–[34].



**Figura 1.5** - Lâmina de esfregaço de sangue periférico, corada, para observação das hemácias características da drepanocitose.

(Foto tirada por Professora Doutora Edna Ribeiro)

### **1.3. Expressão diferencial dos genes para as globinas durante a ontogénese**

Nos últimos anos, foram feitos avanços significativos na compreensão da estrutura das hemoglobinas fetais e embrionárias humanas, para um possível diagnóstico pré-natal das hemoglobinopatias graves [35].

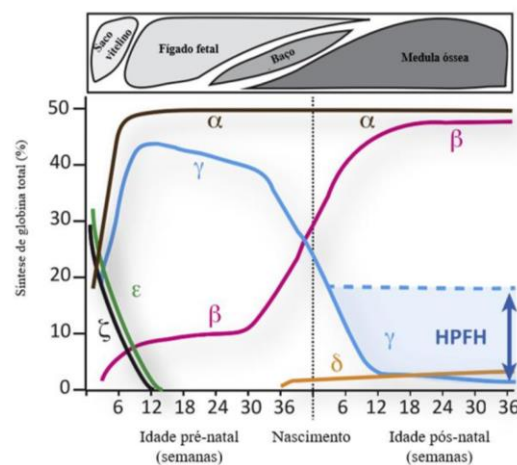
Ao longo da ontogénese, o processo de desenvolvimento envolve alterações fisiológicas nas necessidades de oxigênio que coincidem com modificações na atividade dos genes da globina. Estas alterações levam a ajustes graduais e sequenciais no funcionamento dos genes das globinas embrionárias, fetais e adultas, permitindo, em última análise, a produção de diversas variantes de hemoglobina [35], [36].

Essa necessidade de oxigênio desencadeia um mecanismo regulatório que altera a conformação da hemoglobina, esse mecanismo é designado de *switch* [37]. As alterações epigenéticas que englobam processos como a acetilação e a metilação, exercem uma influência no acesso de proteínas ligação ao DNA que permitem a formação de loops de DNA, que se ligam a cada promotor da região de controlo do locus (LCR) da globina, para modular a expressão dos genes [38].

Durante a síntese das globinas humanas ocorrem duas passagens. A primeira é a passagem da hemoglobina embrionária para hemoglobina fetal (Hb F), durante as primeiras 6 semanas de gestação, e a segunda passagem ocorre após o parto, onde há a troca da hemoglobina fetal pela hemoglobina adulta [37], [38]. As primeiras células

da hemoglobina são produzidas no saco vitelino, durante as primeiras semanas de gestação. De seguida, a eritropoiese celular começa no fígado, que é o principal local de eritropoiese durante grande parte da vida fetal. A hematopoiese é observada na medula óssea às 11-12 semanas de gestação [37].

Durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário humano, especificamente até cerca de 6 semanas, os genes embrionários da  $\epsilon$ - (*HBE*) e da  $\zeta$ -globina (*HBZ*), provenientes do locus do gene da  $\beta$ - e da  $\alpha$ -globina, respetivamente, tornam-se ativos nas células eritroides à medida que estas se diferenciam no saco vitelino (**Figura 1.6**) [37], [39]. Quando a eritropoiese do saco vitelino termina, os genes da  $\alpha$ -globina iniciam a sua expressão e continuam a fazê-lo durante a idade adulta do indivíduo [9], [37] (**Figura 1.6**). Enquanto a hematopoiese ocorre no fígado fetal, os genes da  $\gamma$ -globina (*HBG1* e *HBG2*) tornam-se ativos e juntam-se às cadeias  $\alpha$  (*HBA*) para produzir hemoglobina fetal [39]. Na fase adulta, são os eritroblastos da medula óssea que sintetizam a Hb A (*HBA* –  $\alpha_2\beta_2$ ), e o gene da  $\sigma$ -globina (*HBD*), a Hb adulta menor (*HBA*<sub>2</sub> –  $\alpha_2\sigma_2$ ) [40] (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6** - Locus  $\beta$ -globina humano e a sua regulação ao longo do desenvolvimento.

Localização da produção de globina (em cima) e expressão do desenvolvimento das cadeias de globina em humanos (em baixo). Pessoas com persistência hereditária de hemoglobina fetal (HPFH) apresentam níveis anormalmente altos de  $\gamma$ -globina após o nascimento. Adaptado de [39].

## 1.4. Regulação da expressão da hemoglobina

A regulação da expressão do gene da globina fetal durante a mudança de hemoglobina é um processo complexo que envolve vários fatores de transcrição, microRNAs (miRNAs) e mecanismos epigenéticos, que fazem a ativação ou silenciamento de cada gene [8].

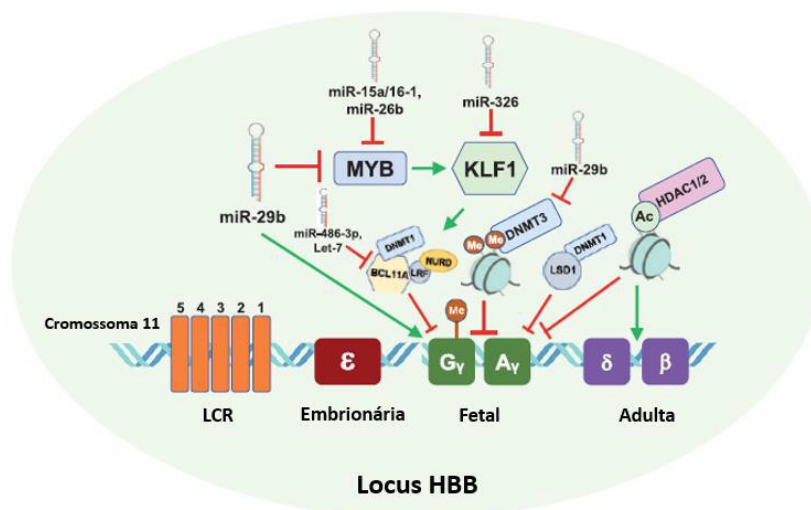
O *switch* da hemoglobina é um processo fundamental na eritropoiese, pois a expressão dos genes da globina fetal ( $\gamma$ -globina) transita para globina adulta ( $\beta$ -globina), assegurando o transporte de oxigénio nos glóbulos vermelhos [13].

A expressão da hemoglobina é regulada através de mecanismos transcricionais, mediados por fatores de transcrição [37]. Estes fatores funcionam de forma coordenada para ativar ou suprimir a expressão génica durante o processo de diferenciação. Trabalham em conjunto com cofatores que influenciam a estrutura da cromatina [40]. Os principais reguladores transcricionais representados na **Figura 1.7** são o *BCL11A* (*B-cell lymphoma 11A*), *KLF1* (**Krüppel-like factor 1**), *HBSL-1-MYB* (fator regulador hematopoiético) [38], [40].

O gene *KLF1*, localizado no locus 19p13.13, é um fator de transcrição crucial para o desenvolvimento dos eritrócitos e desempenha um papel na regulação da transição de HbF para HbA. Pode ativar o gene *HBB* e, inversamente, ativar o gene *BCL11A*, controlando assim os níveis de HbF através da supressão dos genes *HBG1* e *HBG2*. O *KLF1* é o principal regulador do gene *BCL11A*, atuando de forma positiva [41], [42].

O *MYB* é um fator de transcrição essencial para a diferenciação eritroide e a hematopoiese. Desempenha um papel fundamental no equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação das células eritróides, influenciando os níveis de HbF através de um mecanismo que ainda não foi totalmente compreendido [43]. A investigação sugere uma correlação negativa entre os níveis de *MYB* e de HbF. Uma expressão reduzida deste gene nas células eritróides está associada a níveis mais elevados de HbF [43]–[45].

A regulação da hemoglobina pode ainda acontecer a nível pós-transcricional, através de (miRNAs) e através de modificações epigenéticas incluindo metilação do DNA e a acetilação/metilação de histonas [38].



**Figura 1.7-** Principais fatores de transcrição, miRNAs e mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão do gene da globina fetal durante o switch da hemoglobina. Adaptado de [38].

O locus do gene *HBB* no cromossoma 11 contém importantes genes de globina, como a  $\gamma$ -globina, fetal e a  $\beta$ -globina adulta. A passagem da hemoglobina fetal para a hemoglobina adulta envolve um processo regulador multifacetado. O silenciamento dos genes da  $\gamma$ -globina inicia-se com o *MYB*, que ativa o *KLF1*. Este, por sua vez, ativa o *BCL11A*, levando ao silenciamento transcricional da  $\gamma$ -globina. Isto envolve a hipermetilação e o silenciamento dos promotores da  $\gamma$ -globina através da *DNMT1*. O silenciamento sustentado na eritropoiese adulta depende da *DNMT3A* e da *DNMT3B*, fundamentais para a metilação prolongada do promotor do gene da  $\gamma$ -globina. Além disso, a desacetilação por *HDAC1/2* inibe a  $\gamma$ -globina enquanto ativa a expressão de *HBB* no adulto. O MiR-29b, um inibidor da *DNMT3*, contraria o *MYB*, ativando os genes da  $\gamma$ -globina. Esta rede reguladora envolve miRNAs, alguns inibindo e outros induzindo a produção de hemoglobina fetal (HbF). Assim, essa complexa interação governa a transição da hemoglobina fetal para a hemoglobina adulta [35], [38]–[40].

### 1.4.1. Regulação a nível transcricional

#### 1.4.1.1. BCL11A

O *BCL11A*, também conhecido como *B-cell lymphoma/leukemia 11A*, localizado no cromossoma 2, desempenha um papel fundamental no processo de transição da produção de hemoglobina fetal (HbF) para a produção de hemoglobina adulta (HbA) durante o desenvolvimento [46]. O gene *BCL11A* é um regulador responsável pelo silenciamento da  $\gamma$ -globina em humanos. Este gene é expresso de forma elevada em células precursoras eritroides adultas onde os níveis de  $\gamma$ -globina são baixos e baixa em precursores eritroides fetais, onde a  $\gamma$ -globina é altamente expressa, sugerindo que atue como silenciador dos genes codificadores de HbF [1], [46].

Estudos sobre o *BCL11A* revelam que este gene também interage com os fatores de transcrição hematopoiéticos *KLF1*, *GATA1*, *SOX6* e *ZFPM1/FOG1* e o complexo repressor *NuRD* (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) [3]. O complexo repressor *NuRD* inclui histonas desacetilases *HDAC1* e *HDAC2*. Foi sugerido que certos compostos, como os ácidos gordos de cadeia curta, pudessem inibir estas HDACs, relacionando a indução de HbF com o papel do complexo na supressão do gene  $\gamma$ -globina [47], [48].

O fator de transcrição específico dos eritroides Krüppel-like fator 1 (*KLF1*) é proposto como um regulador positivo da expressão de *BCL11A* [46].

O *BCL11A* é particularmente relevante no contexto das células K562, porque é um inibidor conhecido da expressão de HbF. Estudos demonstraram que o gene se liga a regiões reguladoras específicas nos genes *HBG*, e atua como repressor da transcrição [49].

#### 1.4.1.2. BGLT3

Dentro da região do cromossoma 11, posicionada entre os genes *HBG1* e *HBD*, encontra-se uma extensão intergénica que abrange dois componentes: um pseudogene referido como *HBBP1* e um gene não codificante, o *BGLT3* [50], [51]. O *BGLT3*, classificado como um RNA longo não-codificante (lncRNA), surge como um participante fundamental em fases específicas do desenvolvimento, onde funciona como um regulador positivo para os genes da  $\gamma$ -globina. No entanto a investigação deste gene permanece relativamente inexplorada, com apenas um número limitado de trabalhos de investigação que se debruçam sobre a matriz de interações e mecanismos subjacentes [52].

A deleção deste locus pela tecnologia CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), em células K562, diminui a expressão da  $\gamma$ -globina [50].

#### 1.4.1.3. HIC2

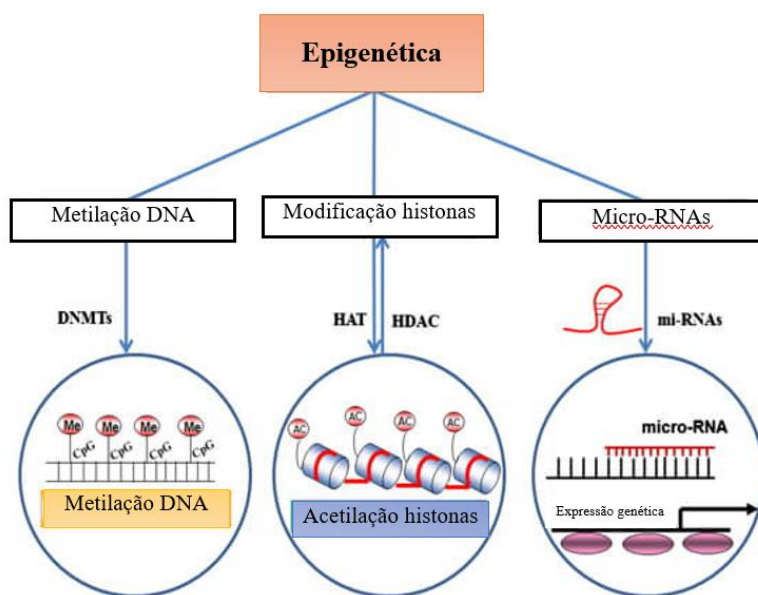
O *HIC2* ou *HIC ZBTB transcriptional repressor 2* [53] foi identificado como sendo expresso na fase fetal como repressor do *BCL11A*. O facto de funcionar como repressor da transcrição deste gene, permite a ativação indireta da transcrição da *HBG*. Estudos realizados em células eritroides provaram também que o *HIC2* promove um aumento significativo dos níveis de *HBG*, nas células que expressam a HbF bem como, os níveis da respetiva proteína [54], [55].

### 1.4.2. Regulação epigenética

Ao analisar um indivíduo, porque é que as células que carregam um genoma idêntico, são diferentes morfológica e funcionalmente? A epigenética veio responder a algumas questões que foram levantadas ao longo de várias décadas [1], [56].

Existem diversos fatores que podem influenciar o desenvolvimento de patologias e de um determinado fenótipo nomeadamente fatores ambientais, alimentação, drogas, exercício físico, stress, entre outros. Além destes fatores, as fases de desenvolvimento embrionário, os primeiros anos do desenvolvimento humano, são importantes [1], [56], [57].

Os mecanismos epigenéticos referem-se a um conjunto de processos reguladores que influenciam a expressão diferencial dos genes que constituem o genoma e consequentemente a diferenciação celular em células e tecidos com a mesma informação genética através da alteração de características hereditárias sem alterar a sequência do DNA. Alguns dos mecanismos epigenéticos mais comuns são a metilação do DNA, a modificação de histonas e a regulação por RNA não codificantes (**Figura 1.8**) [57].



**Figura 1.8** - Mecanismos epigenéticos e papel da metilação do DNA, da modificação das histonas por acetilação e metilação e do controlo pós-transcricional por microRNA. A DNA Metiltransferase está envolvida na metilação de genes. A HAT e a HDAC estão envolvidas na acetilação das histonas e na remodelação da cromatina. Os microRNAs estão envolvidos no controlo pós-transcricional de genes. Adaptado de [58].

#### 1.4.2.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma marca genética que consiste na adição de um grupo metilo às bases azotadas dos nucleótidos da citosina. O grupo metilo é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 da citosina, dando origem à 5-metilcitosina (5mC). Este processo ocorre principalmente no contexto de CG ou nas chamadas regiões CpG [59]. A metilação pode regular diferentes processos, como o *imprinting* genómico, a inativação do cromossoma X, o silenciamento do gene alvo e a regulação da transcrição. A metilação é executada através de

enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Nos mamíferos, existem três destas proteínas cuja presença é crucial para o desenvolvimento embrionário: *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* [56].

A *DNMT1* é frequentemente referida como a "metiltransferase de manutenção" devido à sua capacidade única de replicar fielmente o padrão de metilação do DNA durante a replicação. Esta capacidade resulta da sua forte preferência por substratos que já estão parcialmente metilados, conhecidos como "substratos hemimetilados" [60]. Em contraste, a *DNMT3A* e a *DNMT3B* funcionam principalmente como "metiltransferases de novo", desempenhando um papel crucial no estabelecimento de padrões de metilação do DNA inteiramente novos no genoma. É importante notar que a metilação do DNA é um processo dinâmico, que pode ser ativamente revertido por enzimas conhecidas como desmetilases ou passivamente através de fatores como a diminuição da expressão enzimática ou a redução das divisões celulares durante o envelhecimento [60]–[62].

As DNMTs, incluindo a *DNMT1*, desempenham um papel importante na regulação da atividade dos genes da  $\gamma$ -globina (*HBG1* e *HBG2*), que são responsáveis pela produção de hemoglobina fetal (HbF). Esta *DNMT1*, em conjunto com outras DNMTs, está também envolvida na adição de grupos metil a regiões específicas nos promotores dos genes da  $\gamma$ -globina [56]. Quando esses promotores têm níveis reduzidos de metilação (uma condição conhecida como "hipometilação"), isso leva ao aumento da expressão da  $\gamma$ -globina e, conseqüentemente, a níveis mais altos de HbF. A elevação dos níveis de HbF é uma estratégia terapêutica no tratamento da DCF [60]. Estudos demonstraram que o tratamento com uma droga chamada 5-azacitidina pode resultar na degradação da *DNMT1* DNA metiltransferase e desencadear a expressão dos genes da  $\gamma$ -globina durante a produção de glóbulos vermelhos adultos. Além disso, verificou-se que a *DNMT1* interage com os principais repressores transcricionais dos genes da  $\gamma$ -globina, incluindo *BCL11A*, *DRED* e *GATA1*[1], [62].

#### 1.4.2.2. Modificação de histonas

As histonas são proteínas essenciais com carga positiva que se agrupam, formando uma interação estabilizadora com o DNA de carga negativa, permitindo a sua compactação. Estas proteínas também desempenham um papel crucial na regulação dos genes. O núcleo de histonas contém duas moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4. Ao contrário dos domínios estruturados centrais das proteínas histonas que formam a parte globular do nucleossoma, o domínio N-terminal de todas as quatro histonas e os domínios C-terminais de H2A e H2B, chamadas "caudas de histona", são pouco estruturados e sobressaem do nucleossoma [63]. Na cauda N-terminal das histonas encontram-se sítios para várias modificações, incluindo fosforilação, metilação e acetilação. A acetilação das histonas leva à abertura da cromatina na respetiva região, facilitando o acesso dos fatores de transcrição e promovendo a expressão genética. Inversamente, a desacetilação resulta na compactação da cromatina, reprimindo a transcrição. A metilação, por sua vez, pode ter efeitos divergentes, dependendo da posição do resíduo de aminoácido e do número de grupos metil adicionados, influenciando assim a ativação ou repressão génica [38], [63], [64].

Estas reações ocorrem nos resíduos de lisina e são normalmente catalisadas por enzimas com atividade de "histona acetiltransferase" (HAT) ou "histona desacetilase" (HDAC). A acetilação é o processo em que um grupo funcional acetil é transferido de uma molécula (neste caso, a acetil coenzima A) para outra. A desacetilação é simplesmente a reação inversa, em que um grupo acetilo é removido de uma molécula [63], [64]. Há um total de quatro classes que categorizam as histonas desacetilases (HDACs). A classe I inclui as HDACs 1, 2, 3 e 8. A classe II está

dividida em dois subgrupos, que inclui as HDAC 4, 5, 7 e 9, enquanto que a outra classe inclui as HDAC 6 e 10 [65], [66].

#### 1.4.2.2.1. HDAC 1 e 2

A atividade da *HDAC1/2* tem sido implicada no desenvolvimento de numerosos tecidos e tipos de células, incluindo o coração, a pele, o cérebro, as células B e as células T [67]. Uma característica comum em todos os estudos de inibidores de *HDAC1/2*, de desativação e de pequenas moléculas é a redução da proliferação celular [67], [68].

Estudos provaram que a inibição da *HDAC1,2* pode aumentar a produção da proteína hemoglobina fetal (HbF) em primatas. Níveis elevados de HbF normal podem reduzir a gravidade da doença e restaurar a função normal em doentes com DCF ou beta-talassemia, substituindo a hemoglobina adulta em falta ou defeituosa [67].

#### 1.4.2.2.2. HDAC 3 e 8

Sabe-se que a *HDAC3* entra e sai do núcleo, enquanto outras HDACs de classe I estão localizadas principalmente no núcleo e desacetilam o fator potenciador de miócitos 2, que regula o desenvolvimento embrionário, incluindo o desenvolvimento muscular. Entretanto, a *HDAC8* localiza-se nos pólos do fuso para funcionar na montagem do fuso e no alinhamento dos cromossomas durante a meiose [69].

### **1.4.3. Regulação ao nível pós-transcricional**

Os microRNA (miRNA) são pequenas moléculas de RNA não codificantes, de cadeia simples, com cerca de 20 nucleótidos que regulam a expressão genética pós-transcricional. Geralmente ligam-se às regiões não traduzidas (UTRs) dos RNA mensageiros (mRNAs) para suprimir a tradução de proteínas ou causar a degradação do mRNA. Existem evidências que indicam que os miRNAs desempenham um papel importante em alguns processos biológicos, nomeadamente a proliferação celular, a diferenciação, a apoptose e a hematopoiese [70]–[72].

Estudos indicam que cerca de 30% dos genes humanos são alvos de miRNAs, ou seja, estes RNAs não codificantes têm um impacto a nível nos transcriptomas e proteomas nos eucariotas. Mais estudos sobre a expressão dos miRNAs sugerem que seja um instrumento importante para o prognóstico, diagnóstico e tratamento de doenças [71], [72].

Além disso, já foi demonstrado que os miRNAs são indutores promissores da síntese de HbF, podendo melhorar as condições clínicas da DCF [70].

#### 1.4.3.1. miR-148b-3p

O miR-148b-3p, localizado no cromossoma 7, regula a expressão de genes, nomeadamente o gene *BCL11A*, ligando-se a sequências complementares na 3' UTR do mRNA do *BCL11A* [73] [74]. Esta ligação pode levar à regulação negativa da expressão do mesmo através de mecanismos como a inibição da tradução e a degradação do mRNA. A potencial regulação positiva da expressão de HbF é o resultado da regulação negativa do *BCL11A*

mediada por miR-148b-3p. [75]–[77]. O miR-148b-3p tem sido associado à regulação epigenética, por ter como alvos genes envolvidos na metilação do DNA (como o *DNMT1*) afetando os padrões de expressão genética [78].

#### 1.4.3.2. miR-29c-3p

Localizado no cromossoma 1, é um elemento da família dos miR-29. Este miRNA tem como alvo o *BCL11A* e influencia a regulação da expressão do gene *HBG*. [75]–[77]. Estudos sugerem ainda que o miR-29c-3p é um gene alvo direto do p53 [79]. Estudos indicam que vários miRNAs, incluindo o miR-29c-3p, foram associados ao silenciamento do *BCL11A* [75]. Este miRNA regula genes envolvidos na metilação do DNA, como o *DNMT3B* [80].

#### 1.4.3.3. miR-30a-3p

O miR-30a-3p é um miRNA que está localizado no cromossoma 6 e demonstra bloquear a diferenciação celular e promover a proliferação [81], [82]. Influencia os níveis de HbF através da ativação do *BCL11A* em precursores eritroides isolados de doentes com  $\beta$ -talassemia intermédia e na indução da expressão do *HBG* [75]. Os doentes que exibem uma expressão aumentada de miR-30a apresentam níveis de HbF elevados. Além disso, a sobre expressão do miR-30a em células precursoras eritroides resultou numa diminuição da expressão de *BCL11A* e num aumento simultâneo da expressão de  $\gamma$ -globina [83].

## 1.5. Diagnóstico e Terapêuticas da Anemia Falciforme

Como referido anteriormente, a DCF é uma doença genética que afeta os glóbulos vermelhos devido à presença de uma hemoglobina anormal, designada por HbS, que deforma os eritrócitos, fazendo com que adquiram forma de foice, levando a vários problemas de saúde [84], [85]. A gravidade e a frequência dos sintomas podem variar de pessoa para pessoa, mas certos sintomas são comuns e associados à doença [31], nomeadamente crises de dor nos ossos e articulações, causadas pela obstrução dos vasos sanguíneos; anemia, que causa fadiga e fraqueza; inchaço nas extremidades; icterícia, outro sintoma relacionado com a DCF; Indivíduos com DCF são também mais suscetíveis a infeções uma vez que as células falciformes podem danificar o baço e podem também possuir atrasos de crescimento; acidente vascular cerebral (AVC) devido à constrição dos vasos sanguíneos no cérebro e hipertensão, entre outros [84]–[88].

### 1.5.1. Diagnóstico

O diagnóstico é muito importante para aumentar a qualidade de vida dos doentes. Alguns dos diagnósticos para deteção da DCF envolvem a combinação do historial médico do paciente, onde médicos examinam o historial familiar e a probabilidade de distúrbios da hemoglobina (uma vez que se trata de uma doença genética). É realizado um exame físico à procura de sinais ou sintomas de DCF, como icterícia, inchaço ou sinais de anemia e exames sangue, através de hemogramas e eletroforese de hemoglobina, para medição do número de glóbulos

vermelhos, brancos e plaquetas no sangue e para identificar o tipo de hemoglobina no sangue do paciente, respetivamente [85].

Caso o diagnóstico se confirme, pode ser realizado um teste genético a fim de se confirmar o tipo de DCF, identificando as mutações específicas associadas. Dependendo do tipo de sintomas desenvolvidos, podem ser feitos exames adicionais para se avaliar lesões nos órgãos, como radiografias, ultrassons, etc.

Em alguns países, já é exigido o rastreio de DCF em recém-nascidos, este exame envolve uma análise ao sangue de maneira a verificar se o bebé tem DCF ou é portador da doença [86][85].

### ***1.5.2. Transplante de células estaminais hematopoiéticas***

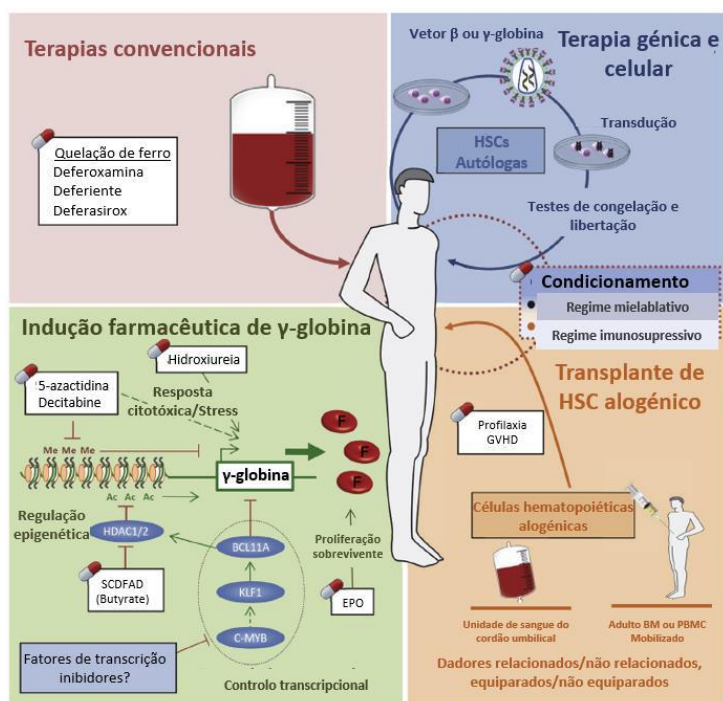
Embora não exista uma cura para a DCF, já existem várias abordagens terapêuticas para gerir a doença e aliviar os sintomas. O transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT), ou transplante de medula óssea, é atualmente o único tratamento curativo para indivíduos com  $\beta$ -hemoglobinopatias [89]. Este tratamento envolve a substituição de células estaminais hematopoiéticas existentes por células de um dador alogénico [90]–[92]. Os benefícios incluem a eritropoiese fisiológica normal, a redução de lesões nos órgãos e diminuição da mortalidade associada à DCF. Há no entanto algumas preocupações no que concerne a este tratamento, nomeadamente, a seleção do próprio doente (com base na gravidade da doença, idade, entre outros), o risco de toxicidade a curto prazo, possibilidade de efeitos adversos a longo prazo e a reserva limitada de dadores [90].

### ***1.5.3. Terapia génica***

A terapia génica é uma área promissora para o tratamento de hemoglobinopatias [93]. Esta terapia é autóloga, evitando riscos inerentes à rejeição do transplante. Atualmente são aplicadas duas abordagens quanto a este método: (1) adição de genes neste caso, os genes são transferidos para o genoma através de vetores virais (estes métodos têm sido replicados *ex vivo* e reinfundidos para evitar genotoxicidade noutros órgãos; [94]–[96] (2) edição de genes, onde são feitas alterações genómicas permanentes que envolvem a remoção ou substituição de sequências de DNA. Os editores mais utilizados são as meganucleases e o CRISPR-CAS9 [97]–[99].

### ***1.5.4. Transfusões de sangue***

As transfusões de sangue são também um tratamento eficaz e comprovado para algumas formas graves da doença falciforme, uma vez que reduzem complicações da doença e de sintomas de anemia grave [100]. A transfusão reduz a quantidade de HbS presente no sangue, impedindo que este se acumule e bloqueie os vasos sanguíneos. Este tratamento melhora a capacidade de transporte de oxigénio e fluxo de sangue. Contudo, com o tempo, o doente pode acumular demasiado ferro no organismo (sobrecarga de ferro), devido à gradual degradação do sangue que é transfundido, podendo levar à hemocromatose, sendo necessário o tratamento de quelação de ferro para eliminar o excesso presente no organismo do paciente [101]–[103].



**Figura 1.9** - Abordagens terapêuticas atuais e futuras para a  $\beta$ -talassemia. Adaptado de [97].

### 1.5.5. Indução farmacológica

A indução farmacológica da hemoglobina fetal (HbF) também é uma abordagem terapêutica que tem vindo a ser muito utilizada para tratar certas doenças, como a doença falciforme e a beta-talassemia [90], [91], [96]. A HbF é uma forma de hemoglobina encontrada nos recém-nascidos que tem uma maior afinidade pelo oxigénio e não polimeriza como a hemoglobina adulta (HbA) ou a hemoglobina S (HbS), que estão associadas a estas doenças [34]. Alguns agentes farmacológicos podem induzir a produção de HbF, como é o caso da Hidroxiureia [104], derivados de butirato [34], Decitabina, que é mais utilizado no tratamento do cancro, mas tem vindo a ter resultados promissores no aumento dos níveis de HbF, ainda a L-Glutamina [104], que é um suplemento de aminoácidos que foi aprovado no tratamento da anemia falciforme, o Vorinostat, um inibidor da histona desacetilase (HDAC) [34], entre outros.

A persistência hereditária da hemoglobina fetal (HFPH) é uma doença genética rara em que os indivíduos retêm a hemoglobina fetal (HbF) no sangue ao longo da vida. Esta produção elevada de HbF pode compensar os níveis baixos ou as mutações na hemoglobina adulta, como a hemoglobina falciforme (HbS) ou a beta-talassemia, resultando potencialmente em sintomas mais ligeiros ou mesmo num estado assintomático para os indivíduos com doenças de hemoglobina concomitantes [105].

A investigação tem sublinhado a importância da HbF, especialmente no contexto da DCF. Alguns indivíduos com herdam um fenótipo de HFPH caracterizado por níveis significativamente elevados de HbF durante a idade adulta [92]. A HFPH pode resultar de deleções no cluster do gene da  $\beta$ -globina, levando a aumentos compensatórios na síntese de gama-globina devido à síntese reduzida ou ausente de beta-globina. Também pode resultar de mutações

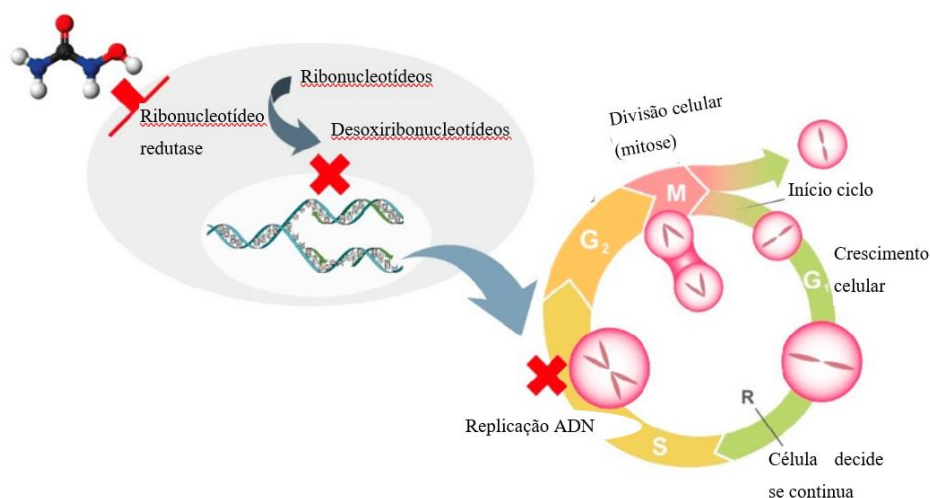
nas regiões promotoras da HBG ou da herança de loci de características quantitativas (QTL) que modulam a produção de HbF. Regiões de QTL notáveis incluem HBS1L-MYB (6q23) e BCL11A (2p16) [97].

Embora a HPFH em si não represente problemas de saúde, pode oferecer proteção em indivíduos com outros distúrbios da hemoglobina, melhorando os seus sintomas [106]. A importância da hemoglobina fetal na doença falciforme foi reconhecida há mais de 70 anos, quando a Dra. Janet Watson observou que os bebês com doença falciforme apresentavam menos sintomas e uma desoxigenação mais lenta dos glóbulos vermelhos do que as mães com a mesma característica. Esta proteção na infância foi associada a níveis elevados de hemoglobina fetal. Esta ideia ganhou apoio de um estudo de Pauling et al. em 1949, que relatou casos assintomáticos de doença falciforme em indivíduos que herdaram o fenótipo hereditário de persistência da hemoglobina fetal (HPFH) [107][108][109]. Como resultado, tem havido interesse em tratar potencialmente a anemia falciforme, aumentando a produção de HbF através da reativação dos genes HBG1 e HBG2. Esta síntese pode inibir a polimerização da HbS e reduzir a concentração de HbS nos glóbulos vermelhos [109],[110],[111].

### 1.5.6. Hidroxiureia

A hidroxiureia (HU), designada de hidroxycarbamida, é um composto hidroxilo simples de forma molecular  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$  [112]. Aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), tanto em adultos como em doentes pediátricos a partir dos 2 anos [113], a HU é utilizada no tratamento da anemia falciforme, pois reduz a frequência de crises e a necessidade de transfusões de sangue [114].

Até ao momento, a HU tem sido o fármaco com melhor eficácia e efeito “*anti-sickling*” comparativamente a outros medicamentos usados em diferentes abordagens terapêuticas [91]. Esta induz a paragem da proliferação celular na fase S do ciclo celular, devido a uma diminuição de dNTPs por inibição da atividade enzimática de ribonucleotídeo redutases (**Figura 1.10**) [112]. A terapia com HU levou a aumentos significativos nos níveis de hemoglobina e de hemoglobina fetal [115].



**Figura 1.10** – Mecanismo de ação da hidroxiureia. Adaptado de [116].

Apesar de muitos avanços na investigação, ainda não se sabe exatamente como funciona o mecanismo de atuação deste fármaco. A sua capacidade de estimular a produção de hemoglobina fetal é conhecida [117], embora o seu mecanismo permaneça pouco esclarecido. A sua utilização é limitada, particularmente em regiões com poucos recursos com uma incidência acentuada da doença [112].

A terapêutica com hidroxureia (HU) em doentes pediátricos com DCF produz normalmente efeitos adversos ligeiros, com a maioria das crianças a apresentar uma tolerância favorável. Há relatos de efeitos secundários ligeiros, incluindo dores de cabeça e sintomas gastrointestinais como desconforto abdominal e náuseas. As observações clínicas comprovam o impacto mielossupressor transitório e reversível da HU em doentes com DCF, que se manifesta principalmente como neutropenia. Em casos pediátricos específicos, as considerações limitadoras da dose podem estender-se à reticulocitopenia [115].

A HU reduz vários sintomas da DCF, no entanto, pode ter efeitos prejudiciais na fertilidade e na gravidez.

Durante o desenvolvimento do feto, o fármaco pode causar efeitos congénitos, aumentando o número de anomalias estruturais; pode ter efeitos hematológicos como a diminuição da contagem de glóbulos vermelhos, ou plaquetas no feto e ainda, um elevado risco de aborto, se a mulher estiver em tratamento durante a gravidez. Este risco associado à gravidez deve-se à inibição da HU no ciclo celular na fase S, que impede a síntese do DNA e a divisão celular [118]–[120].

Quando utilizada em adultos, pode causar infertilidade, nos homens (espermatogénese), a HU pode interferir na produção de espermatozoides, levando a uma redução da contagem de espermatozoides, afetando a fertilidade; nas mulheres (durante a ovulação), a HU, pode afetar o ciclo menstrual, havendo períodos irregulares ou de ausência de menstruação [121].

## **1.6. Compostos naturais indutores da HbF**

A indução da produção de hemoglobina (HbF) a partir de fontes naturais tem sido uma área na investigação em curso. Estas abordagens naturais são consideradas medidas complementares ao apoio e não como medida de tratamento primário para as  $\beta$ -talassemias e a anemia falciforme [122], [123]. A resposta a estas fontes naturais pode variar e é necessária mais investigação para estabelecer a segurança e eficácia em contexto clínico. Os indutores naturais utilizados para aumentar a produção da HbF são, por exemplo, a Angelicina, a Rapamicina, o Resveratrol, a Quercetina, *Curcuma comosa* entre outros [123].

### **1.6.1. *Carica papaya***

A *Carica papaya* pertence à família *Caricaceae* e é cultivada nas zonas tropicais e subtropicais [124]. Esta planta é uma fonte de vitaminas e minerais, em particular, vitamina A, B e C assim como ferro e cálcio [122], [123], [125]. Contém uma enzima que ajuda na digestão e é utilizada para tratar úlceras e algumas doenças microbianas, sendo eficaz contra bactérias gram-negativas em doses elevadas. A papaia possui atividade antioxidante desempenhando assim um papel fundamental na neutralização de radicais livres [124]. Experiências demonstraram que a *C. papaya* possui propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, anti-tumoral, anti-falciformação e diuréticas [123], [125].

Acredita-se que a papaia tem vários benefícios para a saúde. A **Tabela 1.1** ilustra as utilizações tradicionais da *C. papaya* em várias povoações.

**Tabela 1.1** – Uso medicinal tradicional da *Carica papaya* em diversas partes do mundo. Adaptado de [125].

Parte da planta	Método usado	Uso medicinal e localização
Fruto maduro	Sumo de fruta, cosméticos (pomadas)	Verrugas, calos, sinusite, eczema, usado no Caribe e Filipinas; digestivo, diurético, usado na Índia
Fruta verde	Sumo de fruta	Contracetivo e abortivo no Paquistão, Índia e Sri Lanka; Contra Malária, hipertensão, diabetes, itericia na Nigéria
Látex	Uso por via tópica	Dermatite e psoríase em África, e na Europa
Sementes	Sumo, pó, pasta	Analgésico, hemorroidas e aumento do fígado e do baço na Índia.
Folhas	Pasta fina, fumo, sumo, infusão	Febre, asma, itericia, em África e na Índia
Flor	Infusão	Icterícia, tosse, laringite, na Ásia
Raiz	Infusão	Digestivo, na Austrália e tratamento da Sífilis em África



**Figura 1.11** – *Carica papaya* fruto, folha e extrato. Fotos retiradas dos artigos [126], [127].

Julianti et al. [128] estudou o perfil de atividade baseado na cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e indicou que a folha da *C. papaya* é constituída por flavonóides e alcalóides [129].

Vários estudos indicam que os extratos das folhas da *C. papaya* (**Figura 1.11**) têm benefícios na saúde, tais como, redução de doenças cardiovasculares, atividade anti-inflamatória, alívio de distúrbios alérgicos, entre outros [123], [125], [129].

A *C. papaya* oferece uma série de benefícios para a anemia, as suas folhas são ricas em ferro, folato e antioxidantes, ajudando na produção de glóbulos vermelhos e fornecendo proteção contra infeções [130],[131]. O extrato melhora a digestão, reduz a inflamação e protege os glóbulos vermelhos com antioxidantes [132]. A própria papaia, rica em nutrientes e vitamina C, promove a absorção de ferro, a produção de glóbulos vermelhos e proporciona um aumento de energia para as pessoas com anemia [133].

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Questão da investigação

Podemos explorar abordagens inovadoras, baseadas em métodos tradicionais, para induzir a hemoglobina fetal e, assim, potencialmente fornecer um tratamento para as hemoglobinopatias?

### 2.2. Objetivos gerais

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

### 2.3. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a proliferação e a viabilidade celular da linhagem K562 exposta a diferentes concentrações dos extratos metanólicos e aquosos de folhas de *C. papaya*.
- 2) Avaliar os efeitos das diferentes concentrações dos extratos metanólicos e aquosos de folhas de *C. papaya* na expressão gênica das globinas (*HBA*, *HBB* e *HBG1*), de genes reguladores da HbF (*BCL11A*; *BGLT3* e *HIC2*) e de miRNAs (miR-148b-3p, miR-29c-3p e miR-30a-3p) na linha celular K562, através de PCR quantitativo em tempo real.

## 3. Material e métodos

---

### 3.1. Colheita e preparação do material vegetal

As folhas de *C. papaya* usadas para a extração foram colhidas e cedidas pelo Sr. Fernando Nunes, num jardim doméstico de Faro, Algarve, Portugal. Foram deixadas a secar à temperatura ambiente ( $T_a$ ) até obterem uma variação de massa constante. Antes do processo de extração, foram selecionadas 53g de folhas, pesadas previamente, para posterior pulverização. Este processo foi realizado com o auxílio de um almofariz e de um pilão. Foram utilizados 7,5g de folhas pulverizadas para a extração (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1** - Folhas de *Carica papaya* pulverizadas.  
(foto tirada durante o projeto)

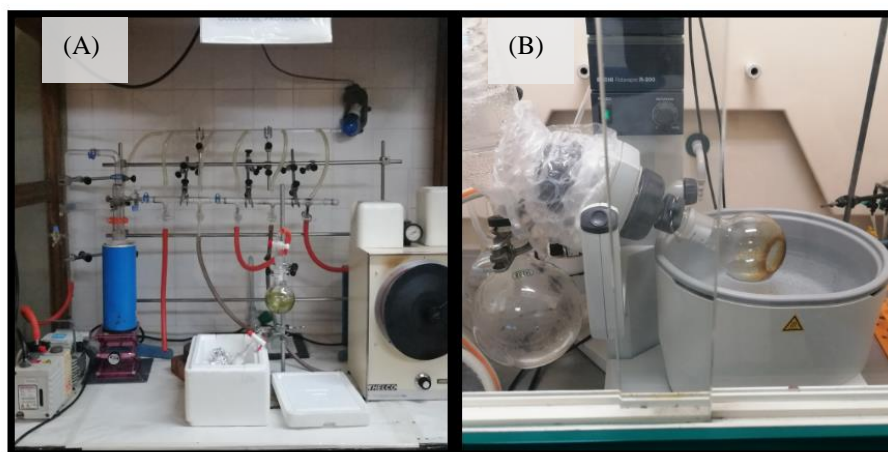
### 3.2. Extração

#### 3.2.1. Preparação do extrato aquoso de *C. papaya*

Num erlenmeyer de 250 mL foram aquecidos 150 mL de água, numa placa de aquecimento (Heidolph, MR 3001K). De seguida, foi pesado numa balança (KERN), com um erlenmeyer de 100 mL, 1g dos 7,5g de folha pulverizada. As folhas foram diluídas em água a 90°C durante 15 minutos com o auxílio de um agitador magnético. Realizou-se uma filtração a pressão reduzida vertendo toda a água do erlenmeyer de 250 mL para um funil de Büchner. Após a filtração, o papel de filtro foi descartado ficando apenas o filtrado (EAFCP), este foi passado do balão de Kitasato para um balão de 250 mL. Posteriormente, o concentrado foi colocado num evaporador rotativo (Rotavapor R-200 BÜCHI, Zurique, Suíça) a uma pressão de 70 atm a 40°C. Por fim, para garantir a secagem completa do extrato, foi necessário, numa primeira fase, liofilizar o extrato (UNICRYO MC-2L-60°, UNIEQUIP) e de seguida completar a secagem em linha de vácuo. Quando toda a água evaporou retirou-se o balão e foi preservado em papel de alumínio a -20°C (**Figura 3.2**).

### 3.2.2. Preparação do extrato metanólico de *C. papaya*

Para a preparação do (EMFCP), foi usado um erlenmeyer de 250 mL para pesar 1g de folhas pulverizadas. De seguida, com uma proveta, foram vertidos 100 mL de metanol para o erlenmeyer, este foi colocado numa placa de aquecimento durante 30 minutos, sem temperatura, com um agitador magnético até diluir. Seguidamente foi realizada uma filtração a pressão reduzida vertendo todo o metanol do balão de 250 mL para um funil de Büchner, o papel de filtro contendo o sólido foi descartado, e assim, o filtrado do Kitasato foi passado para um balão de 250 mL. O concentrado foi colocado no evaporador rotativo a uma pressão de 337 atm e a uma temperatura de 40°C. Quando todo o metanol evaporou foi retirado o balão e preservado em papel de alumínio a -20°C (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2** – Preparação do extrato metanólico.

(A) – Extrato metanólico em linha de vácuo do laboratório de Química Orgânica do ISEL; (B) – Extrato aquoso no evaporador rotativo do laboratório de Química da ESTeSL. (foto tirada durante o projeto)

## 3.3. Cultura de células

A cultura de células é uma técnica laboratorial fundamental na investigação biológica, que envolve o isolamento e o crescimento controlado de células de origem vegetal ou animal num ambiente artificial regulado com precisão. Estas células podem ser obtidas diretamente de tecidos, sujeitas a desagregação enzimática ou mecânica, ou derivadas de linhas ou estirpes celulares estabelecidas [134]. A cultura de células, permite o estudo da fisiologia, o comportamento e respostas celulares em condições experimentais rigorosamente controladas [134]–[136].

As condições de cultura de células variam, mas geralmente envolvem o uso de recipiente com um meio rico em nutrientes que controla fatores como o pH, a temperatura e a pressão osmótica. Algumas células precisam de estar ligadas a um substrato sólido ou semissólido, enquanto outras podem flutuar no meio de cultura [134].

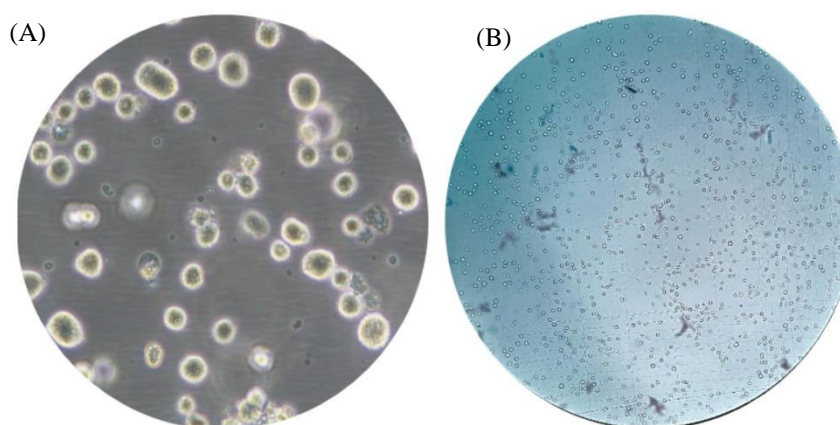
### 3.3.1. Linha celular K562

A linha celular K562 foi utilizada como modelo experimental no decurso deste estudo. Adquiridas a partir da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, UK), trata-se de uma linha de células imortalizadas e adaptadas à cultura *in vitro* derivadas de um doente com leucemia mieloide crónica (LMC) em crise blástica [137]. São células arredondadas e têm semelhança proteómica com granulócitos indiferenciados e eritrócitos. As K562

proliferam rapidamente e dividem-se de forma consistente e uniforme em suspensão. Nestas células o núcleo é significativamente maior do que o citoplasma que é basofílico e sem grânulos (**Figura 3.3**) [137], [138].

No contexto da anemia falciforme, as células K562 são utilizadas para compreender como a hemoglobina é produzida e como diferentes fatores afetam a sua produção.

As células exibem uma plasticidade notável, demonstrando a capacidade de se transformarem em células eritroides que produzem hemoglobina fetal (HbF) quando expostas a vários agentes químicos. Esta metodologia permite a análise dos mecanismos subjacentes à estimulação da expressão da hemoglobina, um processo de importante no tratamento da talassemia e da doença falciforme [139].



**Figura 3.3** – Cultura de células K562.

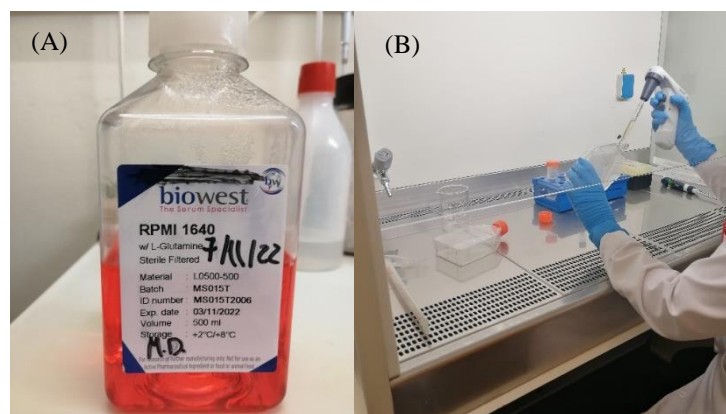
(A) Células K562 em suspensão com baixa densidade. Adaptado de [140]. (B) Células K562 em suspensão com elevada densidade. (Fotografia tirada durante o projeto).

### 3.3.2. *Técnicas de cultura de células K562: Seleção de reagentes e manutenção*

Primeiramente, a linha de células K562 foi submetida a um processo de descongelamento, sob condições estéreis numa câmara de fluxo laminar, de acordo com o protocolo fornecido em anexo (**Anexo 1**). Seguidamente, realizou-se a passagem de células em suspensão, descrito no anexo (**Anexo 2**) através de um *T-flask*. Para isso foi utilizado um meio de cultura RPMI 1640 (Catalog Number: L0500-500, Biowest) que contém L-Glutamina suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 500 µL de antibiótico (200 mM L-Glutamina, 10000 U penicilina e 10 mg/mL de streptomina) (Product Number: G6784, Sigma-Aldrich) (**Figura 3.4 (A)**). Para a passagem celular, foi necessário lavar o *pellet* com tampão fosfato salino (PBS) (Catalog number: 51226, Lonza) e de seguida ressuspender num novo meio.

Após a primeira passagem as subculturas são deixadas, durante cerca de 3 dias, numa atmosfera humidificada a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> a 37°C, até a densidade estabilizar em  $1 \times 10^5$  células/mL. Antes de cada subcultura observou-se a confluência, morfologia, proliferação e a viabilidade celular num microscópio invertido com contraste.

A linha de células K562 foi submetida a passagens em série, com experiências e tratamentos efetuados nas passagens que vão da 15<sup>a</sup> à 38<sup>a</sup> (**Figura 3.4 (B)**).



**Figura 3.4** – Linha de células K562 submetida a passagens em série.

(A) Meio RPMI 1640 (biowest); (B) Linha células K562 submetida à passagem celular P20 na câmara de fluxo laminar. (Fotografias tiradas durante o projeto).

Após a passagem final, as células designadas para tratamentos subsequentes são meticulosamente preservadas, enquanto as restantes células são sujeitas a criopreservação para utilização futura (**Anexo 3**). A concentração celular deve ser ajustada com precisão para  $1 \times 10^6$  células/mL antes de as aliquotar para frascos de 2 mL. Subsequentemente, estes frascos são sujeitos a exposição ao meio criopreservador Cellvation™, um produto da Protide Pharmaceuticals, e mantidos a  $-80^\circ\text{C}$  até uma próxima utilização.

### 3.4. Exposição de células K562 com EMFCP e EAFCP

Após a diluição das folhas numa mistura de metanol e outra de água, foram cuidadosamente pesados frascos de fundo redondo de 250 ml. Foram então meticulosamente obtidas massas de 0,2835 g para o EMFCP e 0,4498 g para o EAFCP, que foram subsequentemente dissolvidas num volume final de 7,0875 mL e 11,245 mL de PBS, respetivamente.

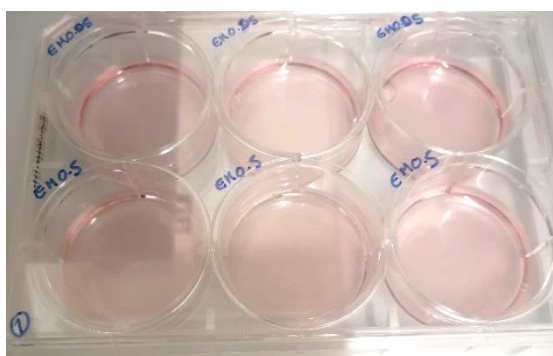
As soluções *stock* de EMFCP e EAFCP foram meticulosamente preparadas com uma concentração final de 40 mg/mL, dissolvendo o extrato vegetal em PBS. Os cálculos subsequentes foram utilizados para obter soluções de exposição celular com concentrações finais de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de EMFCP e EAFCP, todas derivadas da solução *stock* previamente preparada. As soluções preparadas foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  para utilização futura.

Para submeter as células K562 à exposição, era necessário atingir uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL. Depois de efetuar a contagem das células (como indicado no **Anexo 4**), determinou-se que a concentração inicial era de  $51,9 \times 10^5$  células/mL. Consequentemente, foi adicionado um volume de 60  $\mu\text{L}$  para ser distribuído pelos poços P6 e 20  $\mu\text{L}$  para os poços P96, e assim atingir a densidade celular desejada.

As células K562 foram expostas a 25  $\mu\text{g/mL}$  de Hidroxiureia (HU) (HYDREA®, USP), um indutor de HbF [95]. Uma cápsula de 500 mg de HU foi diluída em 100 ml de água ultrapura para criar uma solução de 5 mg/ml, que foi depois aliquoteada e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$ .

Subsequentemente foram atribuídos sete tubos falcon para acomodar volumes de EMFCP e EAFCP nas concentrações de 0,5, 0,05 e 5  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir dos tubos falcon preparados, um volume de 3 mL foi cuidadosamente dispensado em cada poço das placas P6 (**Figura 3.5**). Cada placa era composta por triplicados de concentrações distintas, tendo sido meticulosamente montadas quatro placas deste tipo. No caso das placas P96, foram cuidadosamente dispensados 100  $\mu$ L em cada poço, replicando triplicados biológicos. A preparação incluiu um grupo de controlo (meio de cultura e células), um poço em branco (apenas meio) e uma solução de controlo de libertação máxima de LDH (ML) adicionada a uma placa P6. Esta preparação foi concebida para o ensaio Cyto-Tox 96 (**Anexo 6**). Os extratos em estudo foram cultivados com o meio, mas sem células, para avaliar a absorvância dos respetivos extratos. As células foram incubadas num ambiente húmido a 37°C com 5% (v/vv) de CO<sub>2</sub> durante 24h sendo posteriormente retiradas para a análise da proliferação, da viabilidade celular e a citotoxicidade.



**Figura 3.5** – Tratamento em placas de 6 poços.

Exposição celular ao tratamento com EMFCP de 0,05 e 0,5  $\mu$ g/mL. (Fotos tiradas durante a realização do projeto)

## 3.5. Viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade

### 3.5.1. Azul tripano

Para avaliar os efeitos citotóxicos de vários compostos após um período de exposição de 24 horas, foi realizado um teste de exclusão do azul de tripano, seguindo o protocolo detalhado no **Anexo 4**. Este método determina o número de células viáveis numa suspensão de células utilizando uma câmara de Neubauer.

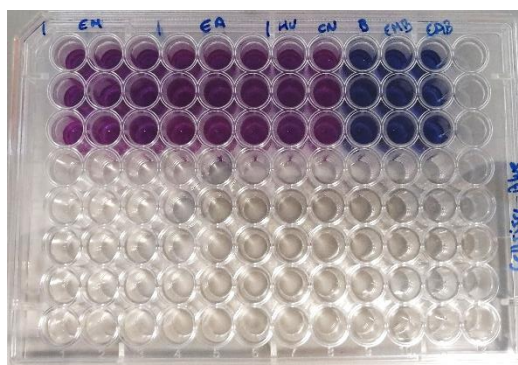
Neste procedimento, uma solução de azul de tripano a 0,4% (CAS Number: 72-57-1, Sigma-Aldrich) foi introduzida na suspensão de células dentro da câmara por ação capilar. As células vivas, caracterizadas por membranas celulares intactas e impermeáveis, permaneceram translúcidas com formas distintas. Por outro lado, as células não viáveis com membranas comprometidas absorveram o corante, manifestando uma coloração citoplasmática azul.

Posteriormente, as células foram examinadas num microscópio invertido com contraste de fase com uma ampliação de 20x, permitindo a enumeração das células. Utilizando as fórmulas descritas no **Anexo 4**, calculámos a taxa de proliferação e a percentagem de viabilidade celular. Esta avaliação metódica forneceu informações sobre o impacto dos compostos testados na viabilidade e proliferação celular.

### 3.5.2. CellTiter-Blue

O ensaio de viabilidade CellTiter-Blue, descrito em pormenor no **Anexo 5**, é uma ferramenta fundamental na biologia celular e na descoberta de medicamentos. Mede meticulosamente a viabilidade celular e a dinâmica da proliferação através da quantificação da atividade metabólica. Tem um duplo objetivo: avaliar a citotoxicidade e selecionar candidatos a medicamentos, monitorizando viabilidade celular.

Na sua essência, este ensaio baseia-se na medição da redução da resazurina, uma característica exclusiva das células metabolicamente ativas. A resazurina transforma-se em resorufina, levando a uma mudança de cor ou fluorescência. Esta alteração reflete diretamente a quantidade de células metabolicamente ativas (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6** – Ensaio de viabilidade CellTiter-Blue em placas de 96 poço.

Exposição ao tratamento dos triplicados com EMFCP, EAFCP (concentrações de 0,05; 0,5 e 5 µg/mL), HU, CN, B, EM Branco e EA Branco. (Fotos tiradas durante a realização do projecto).

Na prática, as células, os extratos e a HU são incubados durante 24 horas a 37°C com 5% (v/vv) de CO<sub>2</sub> numa placa de 96 poços com um volume final de 100 µL por poço. Após esta incubação, são adicionados 20 µL de reagente CellTiter-Blue (que contém resazurina) e as células são novamente incubadas. As células metabolicamente ativas convertem a resazurina em resorufina, alterando a cor ou a fluorescência da solução. A medição é efetuada a 560/590 nm utilizando um espectrofotómetro de fluorescência.

Este ensaio oferece simplicidade, é pouco invasivo e sensível, acomodando vários tipos de células e fornecendo dados em tempo real. No entanto, não permite avaliar os mecanismos citotóxicos, elucidar a morfologia celular ou desvendar as vias de morte celular, e pode não ser adequado para culturas prolongadas.

### 3.5.3. CytoTox-96

O ensaio de citotoxicidade não-radioativo CytoTox96 é uma ferramenta crucial na investigação em biologia celular e toxicologia, esclarecendo a citotoxicidade - agentes ou condições que causam danos ou morte celular.

No seu núcleo, o ensaio quantifica a lactato desidrogenase (LDH) libertada pelas células. A LDH é uma enzima citoplasmática presente na maioria dos tipos de células, e a sua libertação para o meio é um indicador de danos na membrana celular, uma característica comum da citotoxicidade. Este ensaio mede a atividade da LDH no sobrenadante da cultura para determinar a extensão dos danos celulares.



O rácio 260/280, baseado na absorvância a 260 nm e 280 nm, avalia a pureza do RNA. Idealmente, o RNA puro apresenta um rácio 260/280 próximo de 2,0, indicando uma contaminação proteica mínima. Um rácio 260/280 mais baixo (por exemplo, inferior a 1,8) sugere contaminação proteica, perturbando aplicações futuras como a transcrição reversa e a análise da expressão genética [141], [142].

O rácio 260/230 avalia as substâncias que absorvem a luz a 230 nm, tais como compostos orgânicos e sais. Um rácio 260/230 ideal é de aproximadamente 2,0, indicando que não existem impurezas que impeçam os processos a jusante. Uma relação 260/230 reduzida (por exemplo, inferior a 2,0) pode indicar contaminação (por exemplo, fenol, hidratos de carbono ou isotiocianato de guanidina) [143].

No **Apêndice I** encontram-se descritos as concentrações de RNA (ng/μL) de cada amostra.

De seguida, usou-se 0,01 μg de RNA total do primeiro ensaio para um volume final de 20 μL, seguindo as instruções do fabricante para converter em cDNA. Para isso, foi usado o kit “*SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System*” (Catalog Number: 180091050, Introgen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) (**Apêndice II**).

Finalmente, para a síntese de cDNA do estudo dos miRNAs utilizou-se o RNA extraído e o kit miRCURY LNA RT kit (Catalog Number: 339340, Qiagen), esta reacção está descrita no **Anexo 8**.

### 3.7. Amplificação por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A análise de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi efectuada utilizando o sistema avançado de detecção de PCR em tempo real CFX Connect™ da Bio-Rad. Para garantir o desempenho ideal dos primers, foi efectuada uma avaliação preliminar utilizando o cDNA obtido com o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix da Bio-Rad, seguida de uma avaliação subsequente utilizando o One-Step NZYSpeedy RT-qPCR Green Kit fornecido pela NZYTECH. Após a determinação das eficiências dos primers, o kit One-Step foi utilizado exclusivamente para avaliar a expressão dos genes. Entretanto, a expressão de miRNA foi analisada com o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). É de salientar que foram realizados ensaios em triplicado para cada réplica biológica, garantindo resultados robustos e replicáveis. Os primers para o estudo da expressão génica foram elaborados pela equipa do H&TRC e estão apresentados na **Tabela 3.1**.

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

**Tabela 3.1** – Sequência dos *primers* e temperaturas de *melting* específicas utilizadas na reação de PCR quantitativo em tempo real.

Função	Gene	Sequência do primer (5' – 3')		T <sub>m</sub> (°C)
Referência	<i>GAPDH</i>	<i>Foward</i>	TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC	58,05
		<i>Reverse</i>	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATT	56,95
Globinas	<i>HBA</i>	<i>Foward</i>	TCCCCACCACCAAGACCTAC	60,84
		<i>Reverse</i>	CCTTAACCTGGGCAGAGCC	60,08
	<i>HBB</i>	<i>Foward</i>	GCACGTGGATCCTGAGAACT	59,75
		<i>Reverse</i>	GCCACCACTTTCTGATAGGC	58,62
	<i>HBG1</i>	<i>Foward</i>	TGGATGATCTCAAGGGCAC	58,0
		<i>Reverse</i>	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTTGA	47,2
Sinalização	<i>HIC2</i>	<i>Foward</i>	CTTCAGCACCCCTCCTCACTG	57,60
		<i>Reverse</i>	CATCCACGAGCCCCTGATAC	57,49
	<i>BCL11A</i>	<i>Foward</i>	ATGCACAAATCGTCCCCCAT	57,30
		<i>Reverse</i>	GTCTCCTCTTCCTCCTCGT	57,84
	<i>BGLT3</i>	<i>Foward</i>	ACAAACCAGCATCCTGAACC	55,6
		<i>Reverse</i>	GTCTCATGTGCTGCACGTCT	57,7
Moduladores epigenéticos	<i>DNMT1</i>	<i>Foward</i>	CCTCCAAAACCCAGCCAAC	56,9
		<i>Reverse</i>	TCCAGGACCCTGGGGATTTC	59,0
	<i>DNMT3B</i>	<i>Foward</i>	CGAATTTTACCACCTGCTGAATT	53,9
		<i>Reverse</i>	AGAACGGCCGGTCATCAC	57,8
	<i>HDAC1</i>	<i>Foward</i>	GGAAATCTATCGCCCTCACA	54,3
		<i>Reverse</i>	AACAGGCCATCGAATACTGG	54,8
	<i>HDAC2</i>	<i>Foward</i>	CTGTTAATTGGGCTGGAGGA	54,6
		<i>Reverse</i>	AATTCAAGGATGGCAAGCAC	53,9
	<i>HDAC3</i>	<i>Foward</i>	GGACCAGATCCTCCAGACAA	56,1
		<i>Reverse</i>	CAGCCTCATCAGTCCTGTCA	56,5
	<i>HDAC8</i>	<i>Foward</i>	TTCCAGAGCTGAGGAGTGGT	57,9
		<i>Reverse</i>	ACTTGATGCCCTTGGAAT	54,7

Na **Tabela 3.2**, estão descritos os *primers* utilizados para o estudo dos miRNAs.

**Tabela 3.2** – Referência de *primers* com modificação LNA (Qiagen) utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real para estudo dos miRNAs.

Primer	Referência
<b>hsa-miR-423-3p</b>	YP00204488
<b>hsa-miR-148b-3p</b>	YP00204047
<b>hsa-miR-29c-3p</b>	YP00204729
<b>hsa-miR-30a-3p</b>	YP00204457

Na reação quantitativa em cadeia da polimerase (RT-qPCR), a eficiência tem um impacto profundo na precisão e fiabilidade dos resultados. A eficiência da RT-qPCR mede a eficácia com que a amostra é amplificada em cada ciclo de PCR. Idealmente, o RT-qPCR tem como objetivo uma eficiência próxima dos 100% [144]. No entanto, um intervalo aceitável é normalmente 90-110%. Este intervalo permite acomodar variações, mantendo resultados fiáveis e reproduzíveis. Os desvios podem indicar problemas com as condições de reação ou com os reagentes [145].

É possível calcular a eficiência de um ensaio de reação quantitativa em cadeia da polimerase (RT-qPCR) utilizando a seguinte equação [144], [145]:

$$Eficiência (E) = \left( 10^{\left(\frac{-1}{\text{declive}}\right)} \right) - 1 \times 100\%$$

A eficiência do RT-qPCR foi avaliada através da realização de uma experiência de diluições seriadas de 10 vezes. Depois de definir corretamente a linha de base e o limiar, o declive da curva padrão pode ser traduzido num valor de eficiência.

Por fim, foi realizado um estudo que comparou a expressão de genes e os níveis de expressão dos miRNAs reguladores entre amostras utilizando dados recolhidos e analisados através do CFX Manager software, empregando a quantificação relativa de RNA através de RT-qPCR. Esta abordagem permitiu a determinação precisa das diferenças relativas entre o gene de referência e o gene alvo, assim como para os miRNA de referência e o miRNA alvo. Para garantir a precisão dos dados, o gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi escolhido como gene de referência, assegurando uma normalização robusta dos dados. Da mesma forma, o miRNA-423-3p foi escolhido como miRNA de referência, garantindo a normalização dos dados no contexto da expressão do miRNA. Consequentemente, os valores de C<sub>q</sub> dos nossos genes ou miRNAs de interesse foram normalizados com os de *GAPDH* ou miRNA-423-3p, proporcionando um processo de padronização. As diferenças relativas nas expressões dos genes foram quantificadas através da utilização do método  $\Delta\Delta C_q$ , apresentando um modelo adequado para a avaliação abrangente das variações de expressão em todas as condições experimentais.

$$\begin{aligned} \Delta C_q(\text{amostra}) &= C_q(\text{gene de interesse}) - C_q(\text{GAPDH}) \\ \Delta C_q(\text{referência}) &= C_q(\text{Controlo, gene de interesse}) - C_q(\text{Controlo, GAPDH}) \\ \Delta\Delta C_q &= \Delta C_q(\text{amostra}) - \Delta C_q(\text{referência}) \\ \text{Quantificação relativa} &= 2^{-\Delta\Delta C_q} \end{aligned}$$

Como salientado anteriormente, cada reação foi submetida a iterações em triplicado, uma prática realizada para reforçar a robustez estatística dos valores C<sub>q</sub> obtidos para cada amostra individual. Posteriormente, foi avaliada a média e o desvio padrão destes valores em triplicado para cada réplica biológica, como parte do nosso protocolo.

### **3.8. Análise estatística**

A análise estatística dos dados de expressão gênica na linha celular K562 foi efetuada com recurso ao *Microsoft Excel 365* em conjunto com o *software IBM SPSS Statistics*, garantindo uma avaliação rigorosa e cientificamente correta dos dados. Os dados foram submetidos a uma análise em que foram calculados parâmetros estatísticos, incluindo a média e o desvio-padrão. O teste de significância foi efetuado utilizando um teste t bilateral com um limiar definido para a significância estatística fixado num valor de p inferior a 0,05.

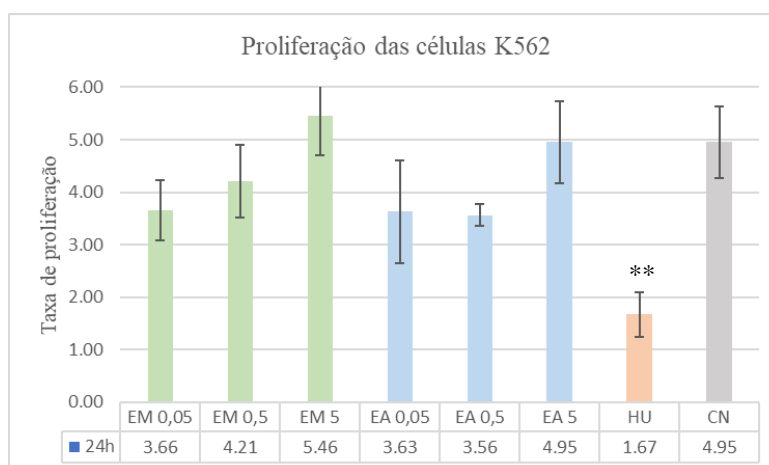
## 4. Resultados

Neste estudo, avaliamos os efeitos dos extratos metanólico (EMFCP) e aquoso (EAFCP) das folhas de *C. papaya* na reativação do gene *HBG1*, um passo fundamental na produção de hemoglobina fetal (HbF). Examinamos também a expressão de genes envolvidos neste processo, incluindo as globinas *HBA* e *HBB*, genes silenciadores (*BCL11A* e *HIC2*), um gene ativador (*BGLT3*), moduladores epigenéticos (*DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*) e miRNAs reguladores (miR-30a-3p, miR-29c-3p e miR-148-3p).

### 4.1. Viabilidade, proliferação e citotoxicidade

A taxa de proliferação celular quantifica a velocidade a que as células se multiplicam através da divisão. É calculada como o rácio de células viáveis após uma exposição específica relativamente à contagem inicial de células, no caso em estudo, representada como  $51,9 \times 10^5$  células.

Após uma exposição de 24h das células K562 às concentrações de EMFCP e EAMFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU = 25  $\mu\text{g/mL}$ ), foram analisadas as taxas de proliferação e viabilidade celular, observadas nas **Figuras 4.1 e 4.2**. A HU foi usada como controlo positivo, uma vez que este fármaco induz a expressão de HbF estando também associado à citotoxicidade [115].



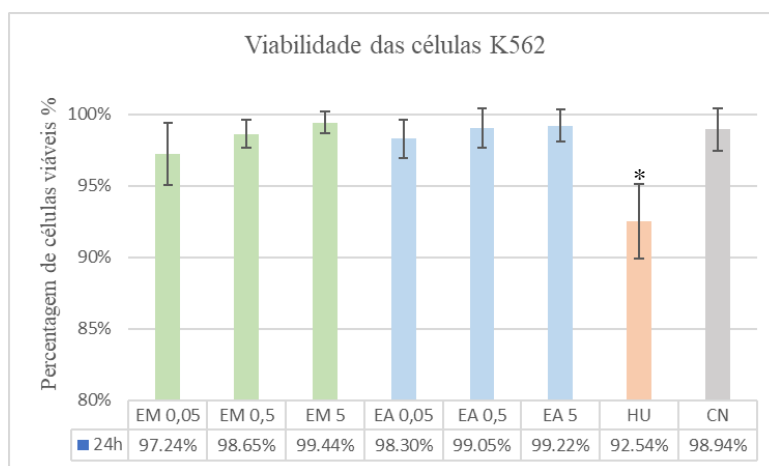
**Figura 4.1** – Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na proliferação das células K562.

Proliferação das células K562 após 24h de exposição ao meio de cultura RPMI (controlo - CN), aos EMFCP e EAFCP com concentrações de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$  e à hidroxiureia com concentração 25  $\mu\text{g/mL}$ . As variações estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo (CN) foram avaliadas através do teste-t, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05.

As taxas de proliferação observados na presença do EMFCP às concentrações de 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$  são de 3,66; 4,21 e 5,46, respetivamente. Entretanto, para o EAFCP, as taxas de proliferação correspondentes são 3,63, 3,56 e 4,95. Em particular, as células expostas à HU apresentam uma taxa de proliferação de 1,67. Observa-se um maior aumento da proliferação nas células expostas à concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  de EMFCP. Pelo contrário, a exposição à HU apresenta apenas um ligeiro aumento da proliferação após 24h de exposição.

É evidente uma variação estatística significativa na redução da proliferação celular no caso da HU ( $p = 0,005$ ), em comparação com o controlo negativo (CN). Esta observação sublinha o impacto da HU nas taxas de proliferação celular.

Os ensaios de viabilidade celular, por outro lado, são normalmente utilizados para avaliar a citotoxicidade dos compostos e o seu impacto na proliferação celular. Esta métrica é determinada dividindo as células viáveis pela população inicial e multiplicando por 100 para obter uma percentagem, esclarecendo a influência de fatores externos na vitalidade e replicação celular.



**Figura 4.2** – Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na viabilidade das células K562.

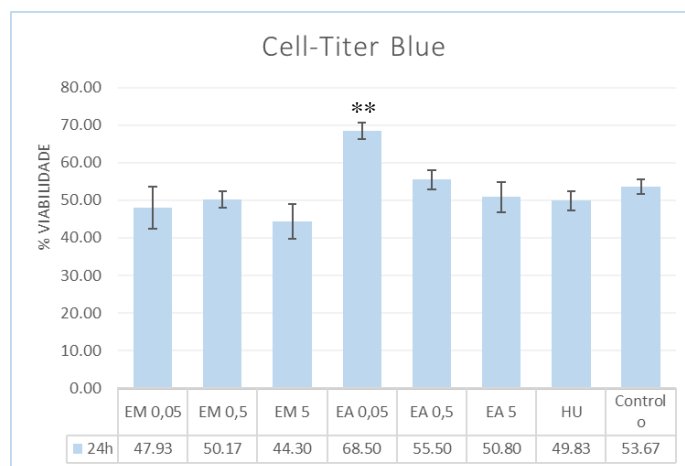
Proliferação das células K562 após 24h de exposição ao meio de cultura RPMI (controlo - CN), aos EMFCP e EAFCP com concentrações de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$  e à hidroxiureia com concentração 25  $\mu\text{g/mL}$ . As variações estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo (CN) foram avaliadas através do teste-t,  $**p < 0,01$  e  $*p < 0,05$ .

As percentagens de viabilidade celular observadas em células expostas ao EMFCP, às concentrações de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , são de 97,24%, 98,65% e 99,44%, respetivamente. Por outro lado, a exposição ao EAFCP produz viabilidades de 98,30%, 99,05% e 99,22% nas concentrações correspondentes. Em contraste, a HU apresenta uma taxa de viabilidade significativamente inferior de 92,54%.

Assim, a percentagem maior da viabilidade celular é evidente no grupo de tratamento com EMFCP, com um pico observado na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  (99,44%  $\pm$  0,79). Em contraste, a HU apresenta a menor viabilidade entre os compostos testados (92,54%  $\pm$  2,60).

É importante notar que é visível uma variação estatisticamente significativa na redução da viabilidade celular quando se avalia o impacto da HU ( $p = 0,039$ ), destacando um desvio substancial em relação ao controlo negativo (CN).

O estudo do ensaio do CellTiter-Blue e do Cytotox96 estão representados nas **Figuras 4.3 e 4.4**, respetivamente.



**Figura 4.3** - Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureira na viabilidade das células K562 no Ensaio CellTiter-Blue. Proliferação das células K562 após 24h de exposição ao meio de cultura RPMI (controlo), aos EMFCP e EAFCP com concentrações de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$  e à hidroxiureira com concentração 25  $\mu\text{g/mL}$ . As variações estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo (CN) foram avaliadas através do teste-t,  $**p < 0,01$  e  $*p < 0,05$ .

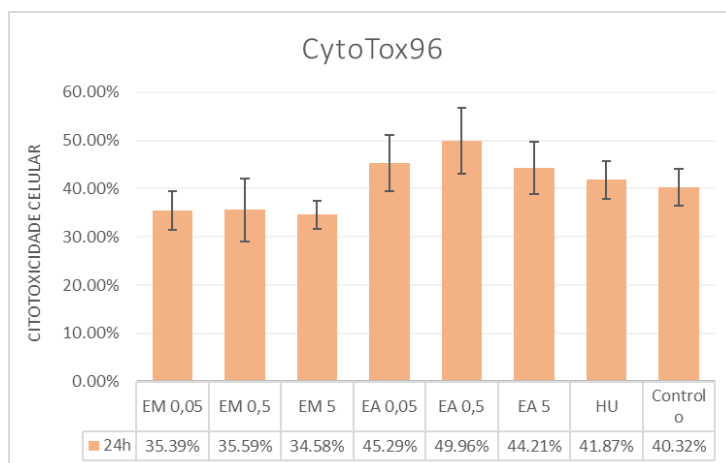
As percentagens de viabilidade celular relativamente ao Ensaio CellTiter-Blue observadas na presença do EMFCP, às concentrações de 0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , são de 47,93%, 50,17% e 44,30%, respetivamente. Por outro lado, as células expostas ao EAFCP tem viabilidades de 68,50%, 55,50% e 50,80% nas concentrações correspondentes.

As condições onde se observa maior viabilidade celular são as pertencentes ao grupo de células expostas a EAFCP, com um pico observado na concentração de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  (68,50%  $\pm$  2,16). Em contraste, a exposição ao EMFCP à concentração 5  $\mu\text{g/mL}$  apresenta a menor viabilidade entre os compostos testados (44,30%  $\pm$  4,661).

É importante notar que é visível uma variação estatisticamente significativa na viabilidade celular quando se avalia o impacto EA 0,05  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,002$ ), destacando um desvio significativo em relação ao controlo negativo (CN).

Os resultados dos testes de viabilidade celular com EMFCP, EAFCP e HU em diferentes concentrações sugerem que estes compostos têm efeitos variáveis na viabilidade das células testadas. Para o EMFCP e o EAFCP, a viabilidade celular é geralmente superior à da HU, sendo a viabilidade mais elevada observada no grupo EMFCP a uma concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  no teste de viabilidade celular padrão. Isto implica que o EMFCP e o EAFCP podem ser menos prejudiciais para a viabilidade celular em comparação com a HU. No entanto, quando se utiliza um ensaio diferente (CellTiter-Blue), os resultados mostram que o EAFCP tem a maior viabilidade celular a uma concentração inferior de 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o EMFCP a 5  $\mu\text{g/mL}$  resulta na menor viabilidade entre os compostos testados. Isto indica que a escolha do ensaio pode afetar significativamente os resultados e, neste ensaio específico, o EAFCP parece ser menos prejudicial para a viabilidade celular a uma concentração mais baixa.

Em ambos os casos, é crucial considerar as condições experimentais específicas e a escolha do ensaio ao interpretar os resultados. As discrepâncias nos resultados podem dever-se à sensibilidade e aos mecanismos dos ensaios utilizados. Poderá ser necessária mais investigação e validação para compreender os efeitos exatos destes compostos na viabilidade celular em diferentes contextos.



**Figura 4.4** – Efeitos dos Extratos metanólicos e aquosos e da Hidroxiureia na citotoxicidade das células K562 no Ensaio CytoTox96. Proliferação das células K562 após 24h de exposição ao meio de cultura RPMI (controle), aos EMFCP e EAFCP com concentrações de 0,05; 0,5 e 5 µg/mL e à hidroxiureia com concentração 25 µg/mL. As variações estatisticamente significativas em relação ao controle negativo (CN) foram avaliadas através do teste-t, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05.

As percentagens de citotoxicidade celular relativamente ao Ensaio Cytotox96 observadas em células expostas ao EMFCP, às concentrações de 0,05; 0,5 e 5 µg/mL, são de 35,39%, 35,59% e 34,58%, respetivamente. Por outro lado, a exposição das células ao EAFCP leva a valores de citotoxicidade de 45,29%, 49,96% e 44,21% nas concentrações correspondentes. A HU induz uma percentagem de citotoxicidade de 41,87% em células K562.

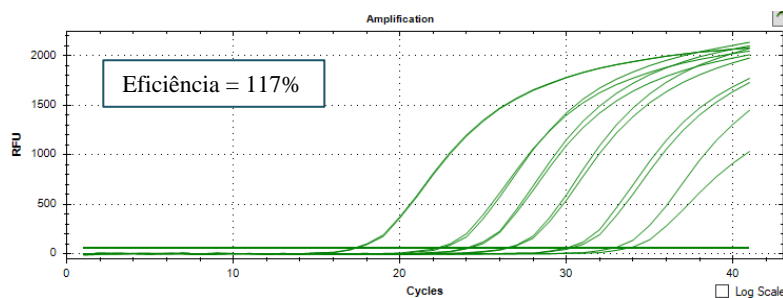
O tratamento com EAFCP, com um pico observado na concentração de 0,5 µg/mL (49,96% ± 0,068). Já a exposição ao EMFCP às concentrações de 0,05 e 5 µg/mL apresentam a menor percentagem de citotoxicidade entre os compostos testados (35,39% ± 0,040) e (35,59% ± 0,066).

Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as células expostas aos extratos metanólicos e aquosos nem à hidroxiureia relativamente ao controle negativo.

## 4.2. Análise da eficiência da amplificação dos genes por PCR em tempo real

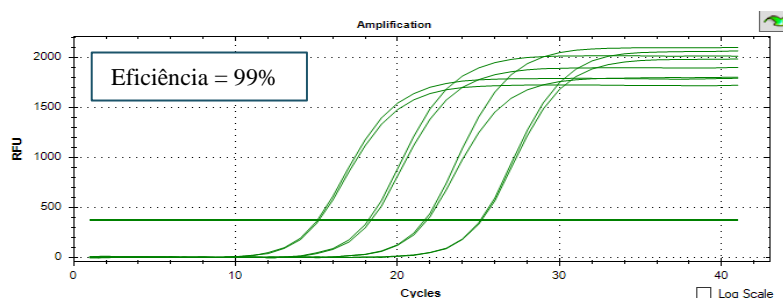
Nesta experiência, a reação de RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) foi crucial para a quantificação relativa da expressão genética. Um conhecimento sólido da eficiência da RT-qPCR e do seu cálculo foi essencial para corrigir as variações de amplificação e medir com precisão os níveis relativos da expressão dos mRNAs nas amostras.

A eficiência foi avaliada em duas etapas: inicialmente, os genes foram submetidos a uma análise de RT-qPCR após a extração de RNA e a síntese de cDNA. Foi utilizado o kit Bio-Rad iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, que apresentou uma eficiência superior à esperada para vários genes. Posteriormente, um exame pormenorizado e exaustivo da metodologia, da diluição e das técnicas de pipetagem conduziu a valores de eficiência próximos do intervalo aceitável de 90%-110%, com ligeiros desvios, como se pode ver na **Figura 4.5** para o gene *HBA*.



**Figura 4.5** – Gráfico de quantificação do gene HBA em PCR em tempo real no termociclador com o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix.

O gráfico mostra quantidades absolutas (unidade relativa de fluorescência – RFU) de produto amplificado em função do número de ciclos. As curvas representam da esquerda para a direita às quantidades de 100 ng, 10 ng, 0,1 ng, etc de RNA inicial.



**Figura 4.6** - Gráfico de quantificação do gene HBA em PCR em tempo real no termociclador com o One-Step NZYSpeedy RT-qPCR Green Kit.

O gráfico mostra quantidades absolutas (unidade relativa de fluorescência – RFU) de produto amplificado em função do número de ciclos. As curvas representam da esquerda para a direita às quantidades de 100 ng, 10 ng, 0,1 ng, etc de RNA inicial.

O segundo método, utilizando o One-Step NZYSpeedy RT-qPCR Green Kit, apresentou resultados eficazes, como se pode ver na **Figura 4.6** para o gene *HBA*. A amplificação de todos os genes testados situou-se consistentemente no intervalo de eficiência de 90%-110%. Este método foi então utilizado para a análise da expressão genética.

A eficiência da RT-qPCR é crucial para a quantificação exata da expressão genética, assegurando que os erros são minimizados e que os resultados são comparáveis entre amostras.

A **Tabela 4.1** apresenta os valores de eficiência da RT-qPCR obtidos utilizando o One-Step NZYSpeedy RT-qPCR Green Kit para os genes investigados neste estudo.

**Tabela 4.1** – Eficiência dos genes em estudo através do Green kit One-Step NZYSpeedy RT-qPCR

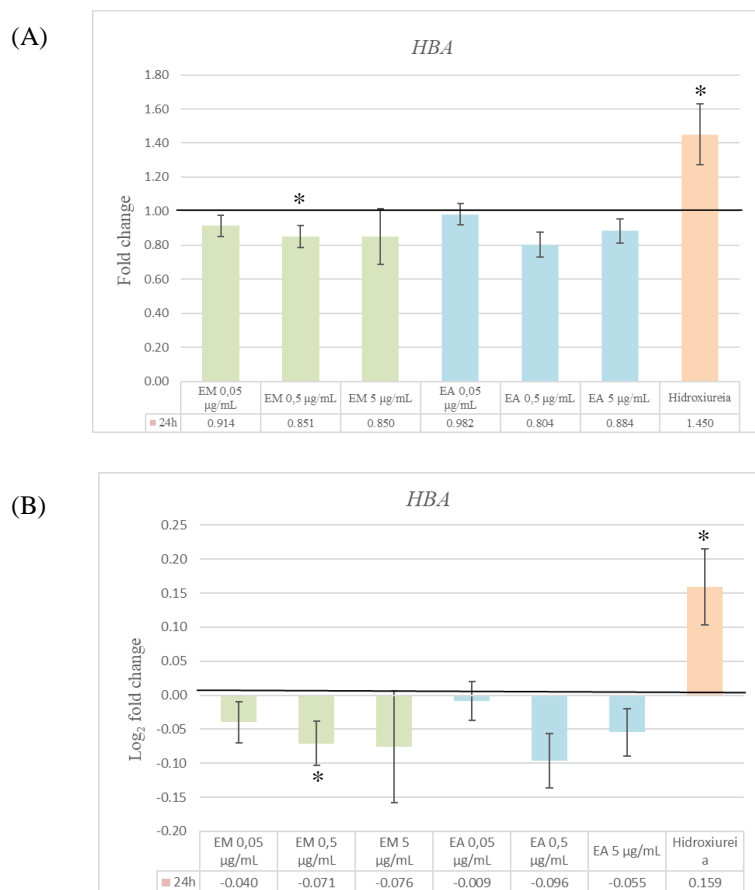
Gene	Eficiência (%) com o kit One-Step
<i>GAPDH</i>	91
<i>HBA</i>	99
<i>HBB</i>	95
<i>HBG1</i>	102
<i>BCL11A</i>	338
<i>BGLT3</i>	105
<i>DNMT1</i>	98
<i>DNMT3B</i>	102
<i>HDAC1</i>	102
<i>HDAC2</i>	199
<i>HDAC3</i>	110
<i>HDAC8</i>	111
<i>HIC2</i>	189

### 4.3. Análise da expressão génica das globinas

Todos os pontos de dados apresentados referem-se à normalização utilizando o gene housekeeping *GAPDH*. O controlo negativo representa as amostras de células que foram incubadas com o meio de cultura.

Na análise dos níveis de expressão do gene *HBA*, verifica-se que a incubação com a HU leva a um aumento significativo da expressão do gene ( $p = 0,036$ ). Já a incubação com o EMFCP 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  induz a diminuição da expressão do *HBA*, com uma variação estatisticamente significativas no EMFCP a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com  $p = 0,049$ .

Estes resultados são representados graficamente na **Figura 4.7 (B)**, com os níveis de expressão apresentados numa escala logarítmica ( $\text{Log}_2$ ). O maior aumento transcricional do *HBA* registado é da HU ( $\text{Log}_2\text{FC}$  (HU) de  $0,159 \pm 0,055$ ).

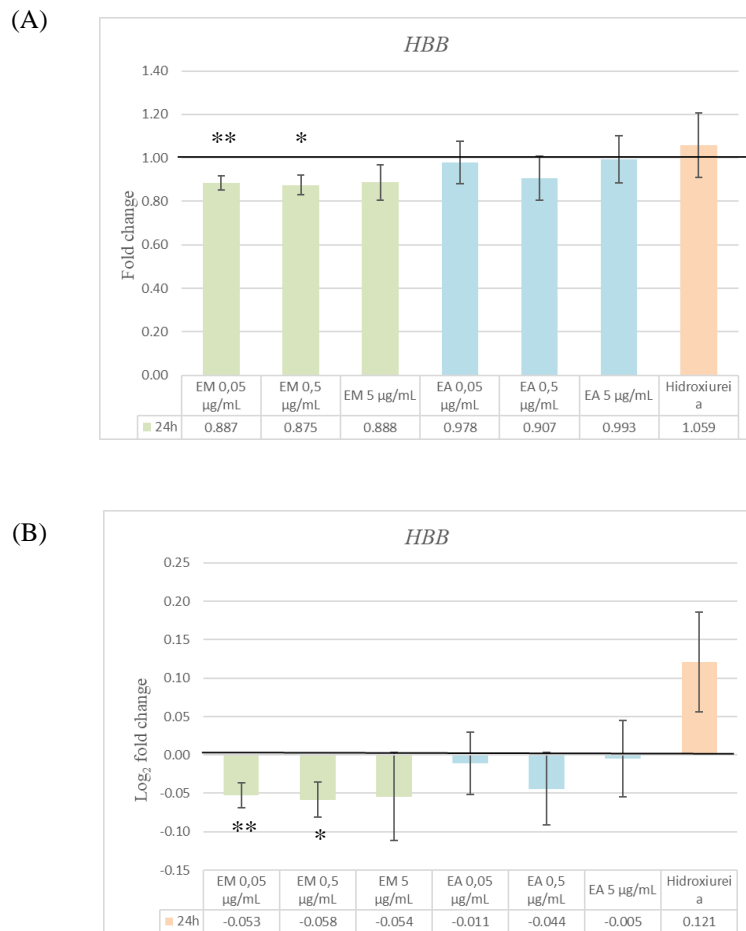


**Figura 4.7** – Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HBA*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBA* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão), (B)  $\text{Log}_2$  da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do  $\text{Log}_2$  da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

Através da análise dos resultados da transcrição do gene *HBB* (Figuras 4.8 A e B) observa-se a redução da expressão do gene *HBB* em células incubadas com EMFCP às concentrações de 0,05 e 0,5 µg/mL. Esta redução é estatisticamente significativa no caso da exposição ao EMFCP à concentração de 0,05 µg/mL com  $p = 0,003$  e a 0,5 µg/mL com  $p = 0,040$ .

Na Figura 4.8 (B), utilizando a transformação logarítmica (Log<sub>2</sub>) para representar os níveis de expressão, a regulação positiva mais substancial foi observada aquando da exposição à HU (Log<sub>2</sub>FC (HU) = 0,121 ± 0,065).

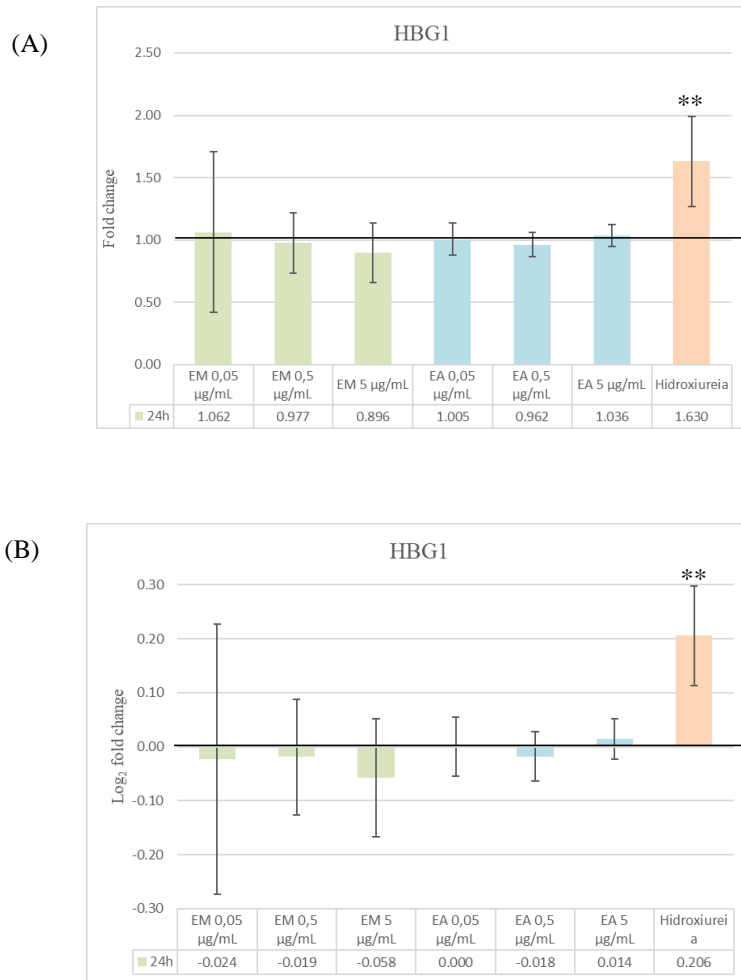


**Figura 4.8** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HBB*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBB* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

Na análise da expressão do gene *HBG1*, conforme ilustrado na (Figura 4.9 A e B), observa-se que a HU induz o aumento da expressão deste gene. A Figura 4.9 (B) ilustra estes resultados da atividade transcricional do gene *HBG1* mostrando o tratamento com HU induz o aumento da expressão deste gene com  $p = 0,010$ , não se tendo observado alterações de expressão na presença de EMFCP ou EAFCP.

Notavelmente, a regulação positiva mais pronunciada foi detetada em HU ( $\text{Log}_2\text{FC}(\text{HU}) = 0,206 \pm 0,092$ ).

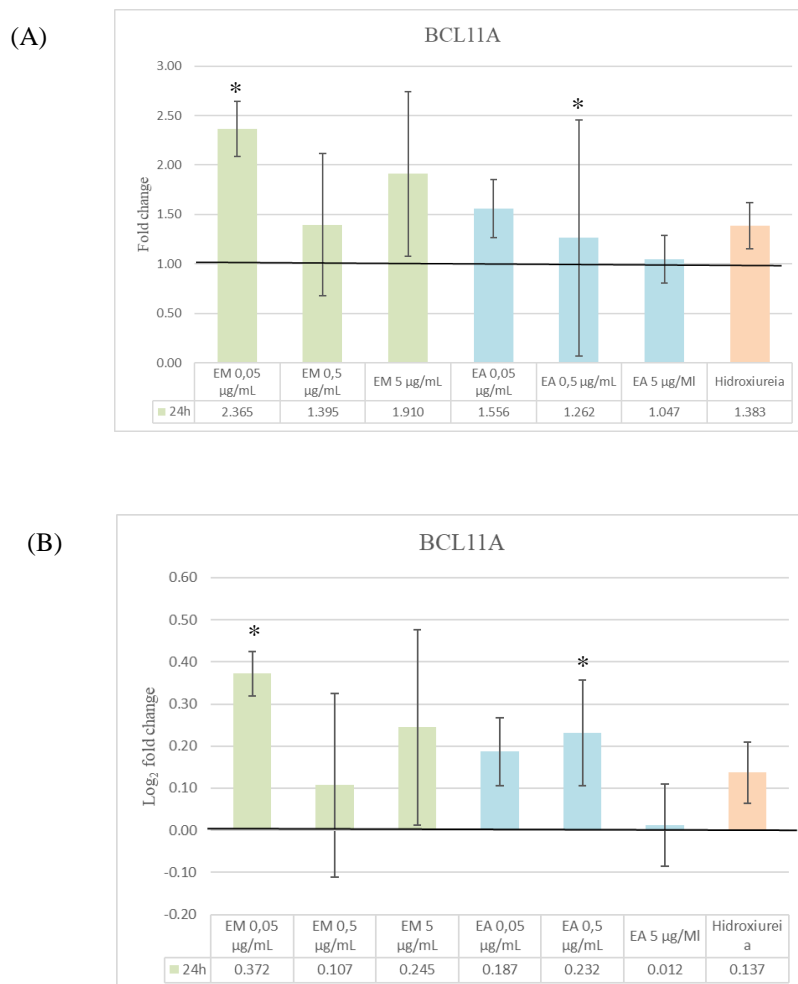


**Figura 4.9** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HBG1*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBG1* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B)  $\text{Log}_2$  da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do  $\text{Log}_2$  da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

#### 4.4. Análise da expressão génica dos reguladores transcricionais

Na análise da expressão do gene regulador transcricional, *BCL11A*, (**Figura 4.10 A e B**) observou-se que o EMFCP a 0,05 µg/mL e o EAFCP a 0,5 µg/mL induzem o aumento da expressão deste gene regulador. A **Figura 4.10 (B)**, evidencia estes resultados mostrando que nas células expostas ao EMFCP e ao EAFCP aumenta a expressão deste gene. Este aumento é estatisticamente significativo na presença do EMFCP à concentração de 0,05 µg/mL e do EAFCP à concentração de 0,5 µg/mL. Verifica-se um aumento da expressão do gene *BCL11A* particularmente relevante, com o aumento substancial da regulação observado a uma concentração de EMFCP de 0,05 µg/mL ( $\text{Log}_2\text{FC (EMFCP 0,05 } \mu\text{g/mL)} = 0,372 \pm 0,052$ ).

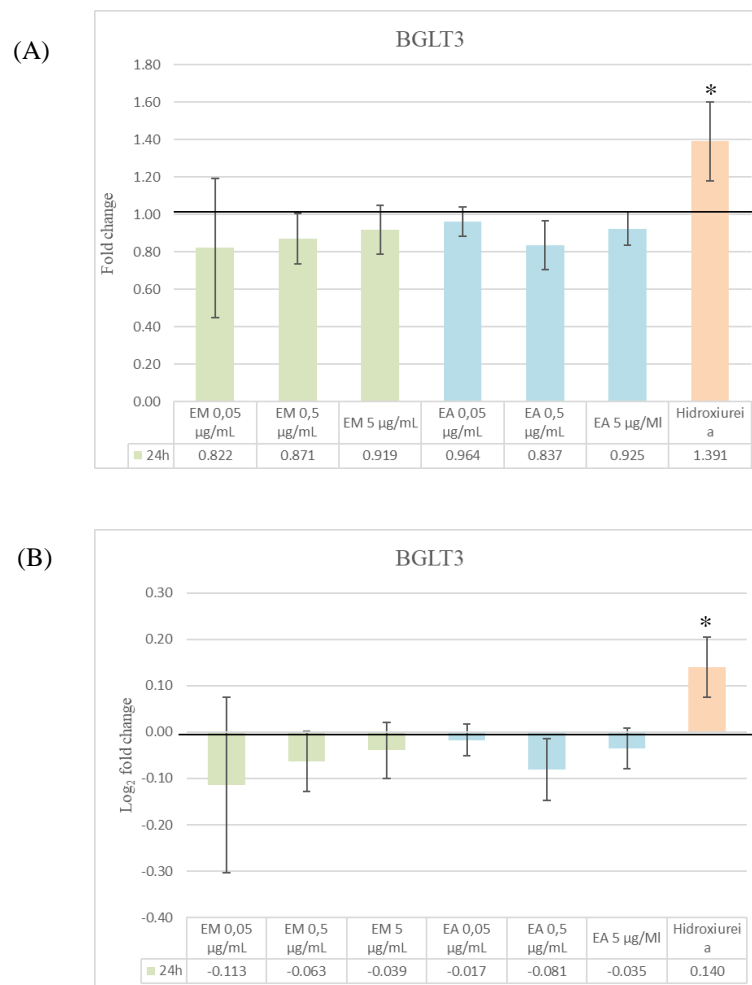


**Figura 4.10** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *BCL11A*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *BCL11A* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B)  $\text{Log}_2$  da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do  $\text{Log}_2$  da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

O *BGLT3* é um estimulador reconhecido da expressão do gene da  $\gamma$ -globina. Os resultados relativos à expressão deste gene ativador estão representados nas **Figuras 4.11 (A) e (B)**. Pela **Figura 4.11 (B)**, verifica-se o aumento da transcrição do gene com o tratamento com HU estatisticamente significativo ( $p = 0,033$ ).

Assim, o tratamento onde se verifica um maior aumento transcripcional do *BGLT3* é no tratamento com HU ( $\text{Log}_2\text{FC}(\text{HU}) = 0,140 \pm 0,064$ ).

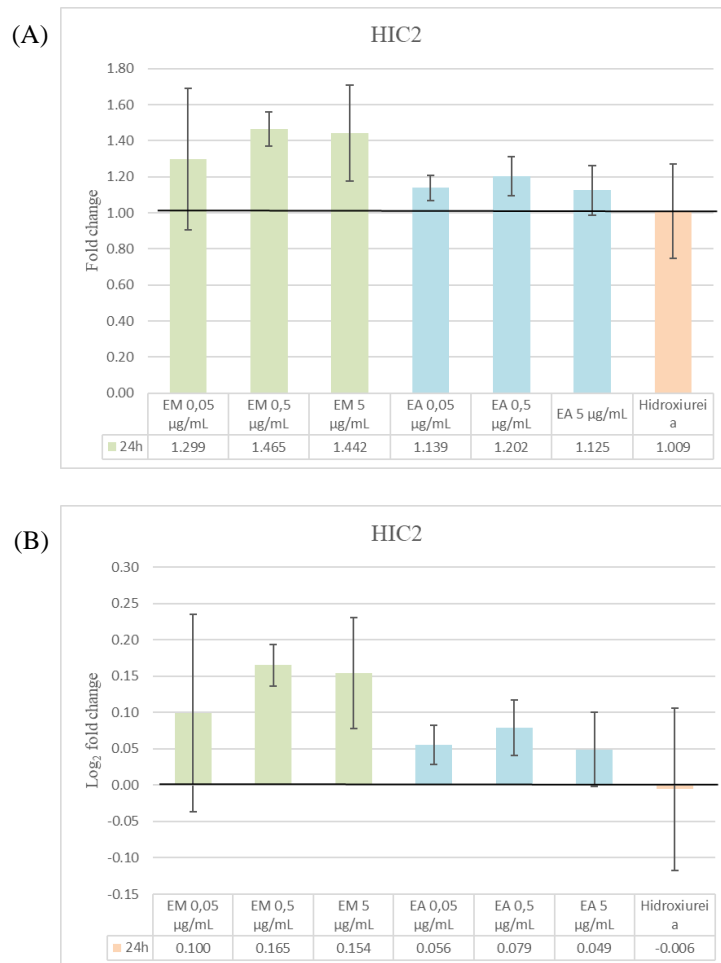


**Figura 4.11** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *BGLT3*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *BGLT3* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão), (B)  $\text{Log}_2$  da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do  $\text{Log}_2$  da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

Os resultados relativos à expressão do gene *HIC2* são apresentados nas **Figuras 4.12 (A) e (B)**. Os tratamentos com os extratos aquosos e metanólicos não tiveram resultados significativos na expressão deste gene.

Na **Figura 4.12 (B)**, após 24h do tratamento verifica-se que o maior aumento da expressão do gene *HIC2* foi com o tratamento do EMFCP a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto não existem variações significativas.

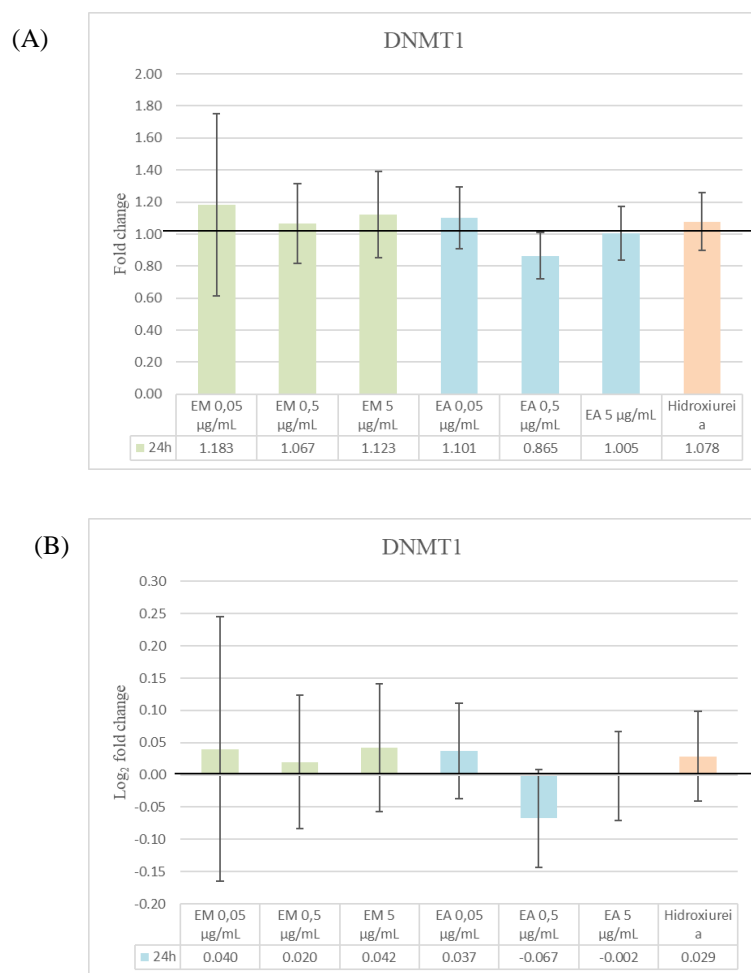


**Figura 4.12** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HIC2*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HIC2* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão gênica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controle negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

## 4.5. Análise da expressão génica dos moduladores epigenéticos

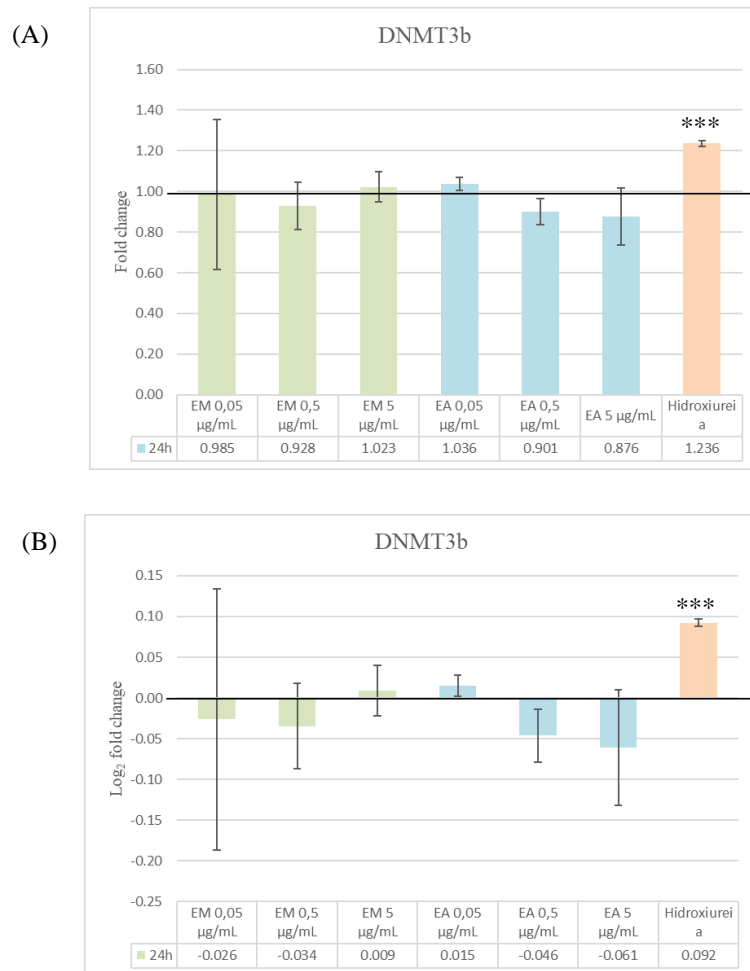
A análise da expressão do gene *DNMT1* está representado nas **Figuras 4.13 (A) e (B)**. Assim como no caso do gene *HIC2*, não se obtiveram diferenças de expressão após resultados no tratamento com os extratos nem com a HU. Na **Figura 4.12 (B)**, após 24h do tratamento verifica-se que o maior aumento da expressão do gene *DNMT1* foi com o tratamento do EMFCP a 5  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto não há variações significativas.



**Figura 4.13** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *DNMT1*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *DNMT1* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

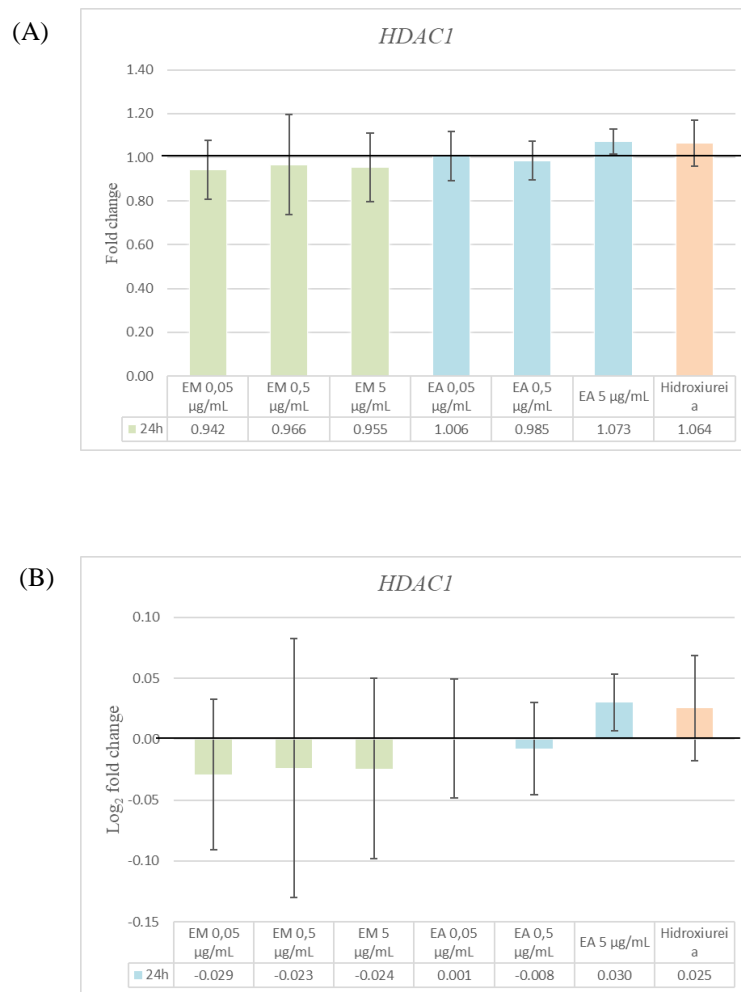
Os perfis de expressão do gene *DNMT3B* estão ilustrados na **Figura 4.14 (A) e (B)**. Através da **Figura 4.14 (B)**, observa-se que HU aumenta estatisticamente a expressão de forma significativa ( $p = 0,001$ ). O maior aumento transcricional aconteceu nas células expostas à HU ( $\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 0,092 \pm 0,005$ ).



**Figura 4.14** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *DNMT3B*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *DNMT3B* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

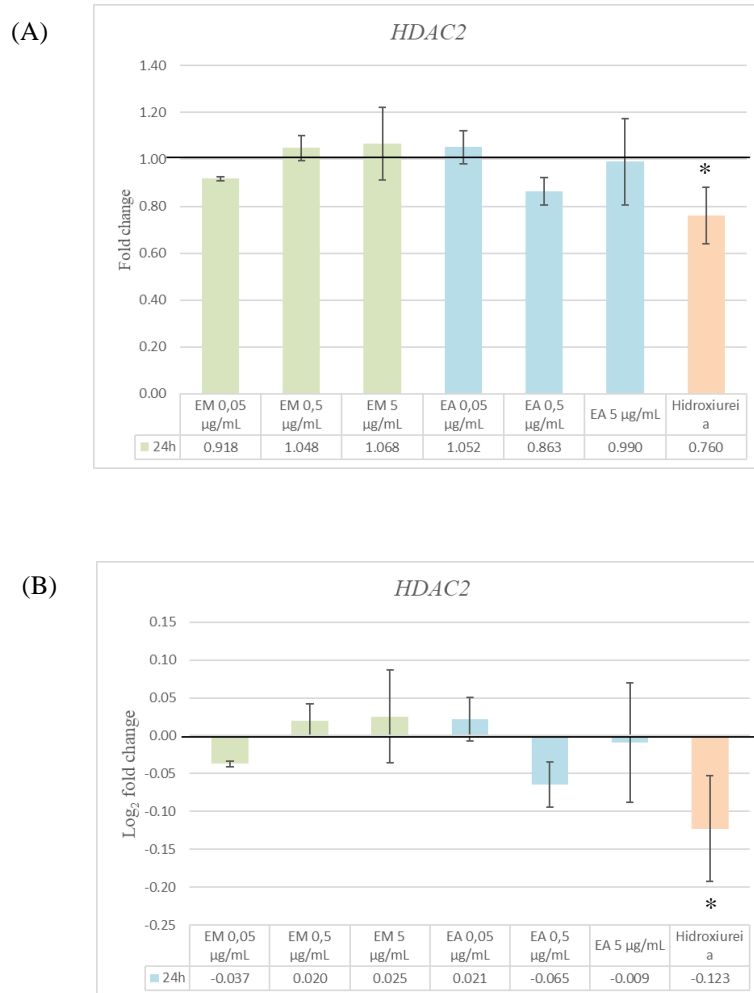
Os padrões de expressão do gene *HDAC1* estão representados na **Figura 4.15 (A) e (B)**, e assim como o *HIC2* e o *DNMT1* não se observaram diferenças de expressão deste gene após tratamento com os EMFCP, os EAFCP nem com a HU. O maior aumento transcrricional aconteceu nas células expostas ao EAFCP 5  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto não existem variações significativas.



**Figura 4.15** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HDAC1*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC1* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

Os perfis de expressão do gene *HDAC2* estão representados visualmente nas **Figuras 4.16 (A) e (B)**, destacando a redução da expressão do gene ao tratamento com HU. Esta diminuição é estatisticamente significativa ( $p = 0,032$ ). Contrariamente, o tratamento com os EMFCP (0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e os EAFCP (0,05  $\mu\text{g/mL}$ ) induziram o aumento da expressão deste gene, no entanto, estes não apresentam variações estatisticamente significativas.

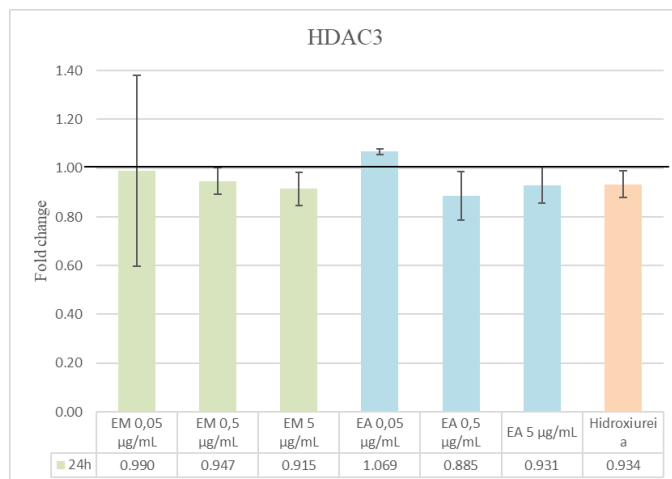


**Figura 4.16** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HDAC2*.

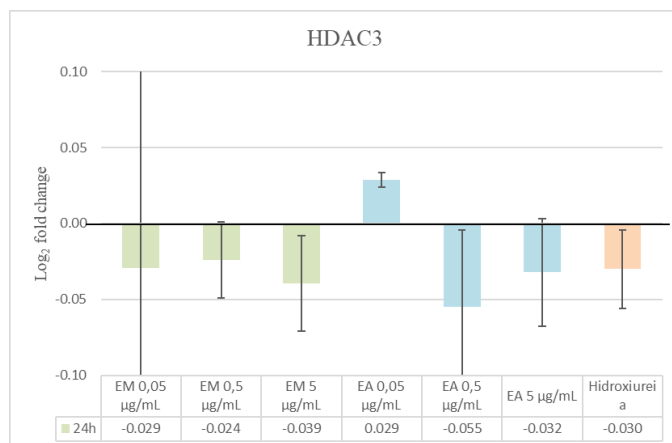
Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC2* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

Os padrões de expressão do gene *HDAC3* são ilustrados na **Figura 4.17 (A) e (B)** e assim como o *HIC2*, o *DNMT1* e o *HDAC1* não se observaram diferenças de expressão deste gene após tratamento com os EMFCP, os EAFCP nem com a HU. O maior aumento transcricional aconteceu nas células expostas ao EAFCP 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto não há variações significativas.

(A)



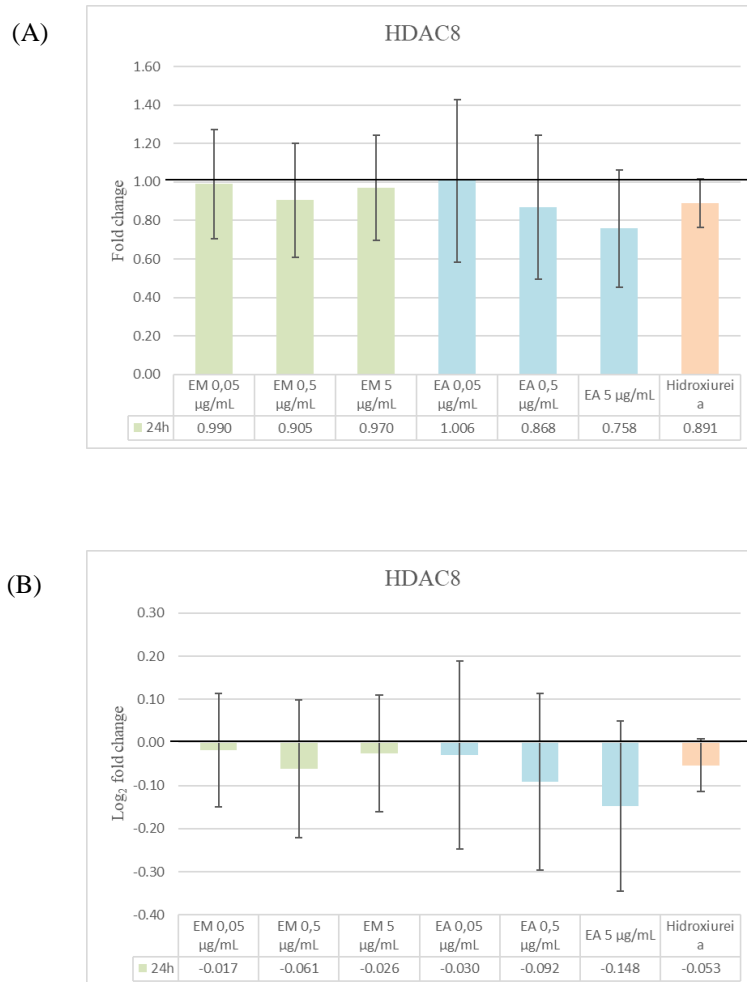
(B)



**Figura 4.17** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HDAC3*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC3* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

A análise dos níveis de expressão do gene HDAC8 estão representados na **Figura 4.18 (A) e (B)**. Este gene, tal como o *HIC2*, o *DNMT1*, o *HDAC1* e *HDAC3* não se observaram diferenças de expressão deste gene após o tratamento com os EMFCP, os EAFCP nem com a HU. A maior redução transcricional aconteceu nas células expostas ao EAFCP 5 µg/mL, no entanto não há variações significativas.



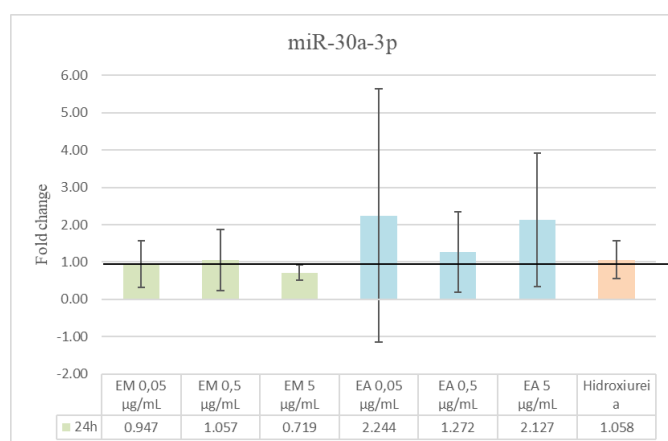
**Figura 4.18** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do gene *HDAC8*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HDAC8* após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

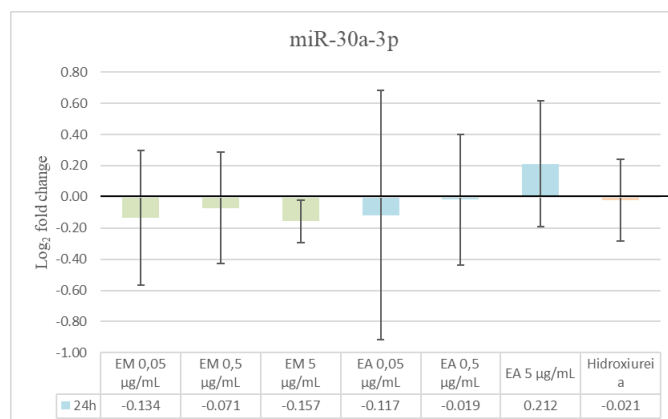
## 4.6. Análise da expressão dos miRNAs reguladores pós-transcricionais

Relativamente à análise transcricional do miR-30a-3p (**Figura 4.19 A e B**) verifica-se que em células expostas ao EMFCP e ao EAFCP às concentrações 0,05 e 5 µg/mL, respetivamente, bem como à HU parece ocorrer uma redução da expressão do miR-30a-3p, comparativamente a células não expostas a estes agentes. No entanto essa redução não é significativa do ponto de vista estatístico. Verifica-se também uma tendência para um aumento da expressão após a exposição ao EAFCP à concentração de 5 µg/mL que também não é estatisticamente significativa.

(A)



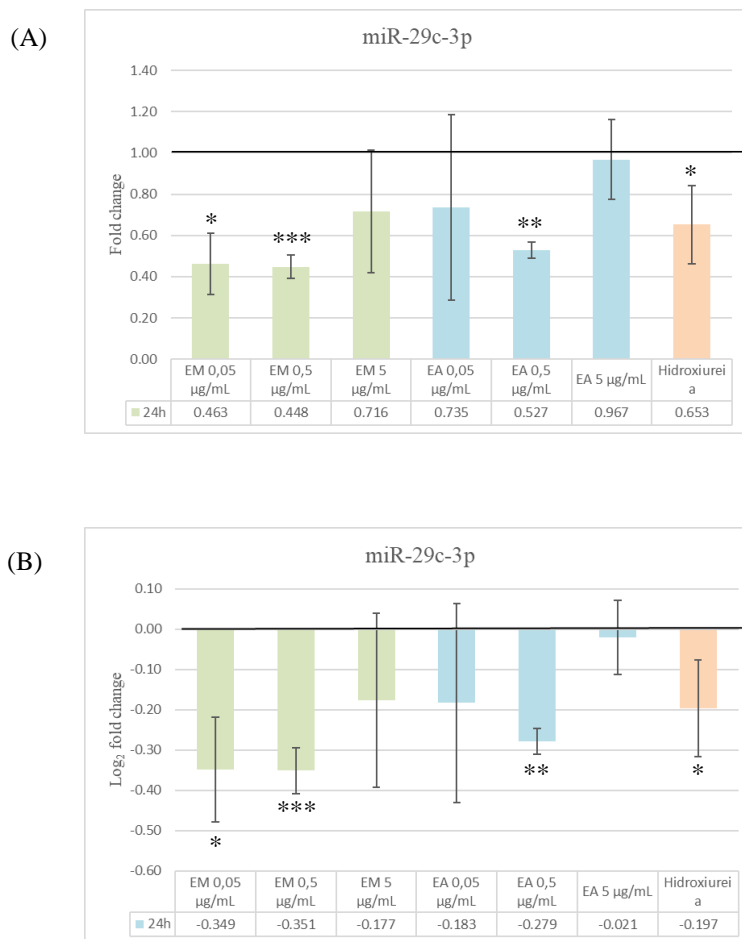
(B)



**Figura 4.19** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do miR-30a-3p.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do miR-30a-3p após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

Na análise transcricional do miR-29c-3p que se apresenta na **Figura 4.20 (A) e (B)**, verifica-se a diminuição da expressão deste miRNA em todas as concentrações do EMFCP, e do EAFCP comparativamente às células expostas, tendo estes compostos o mesmo comportamento que a HU. Estes resultados são estatisticamente significativos no EMFCP (0,05 µg/mL) com um  $p = 0,034$ ; no EMFCP (0,5 µg/mL) com  $p < 0,001$ ; no EAFCP (0,5 µg/mL) com  $p = 0,002$  e na HU  $p = 0,025$ .

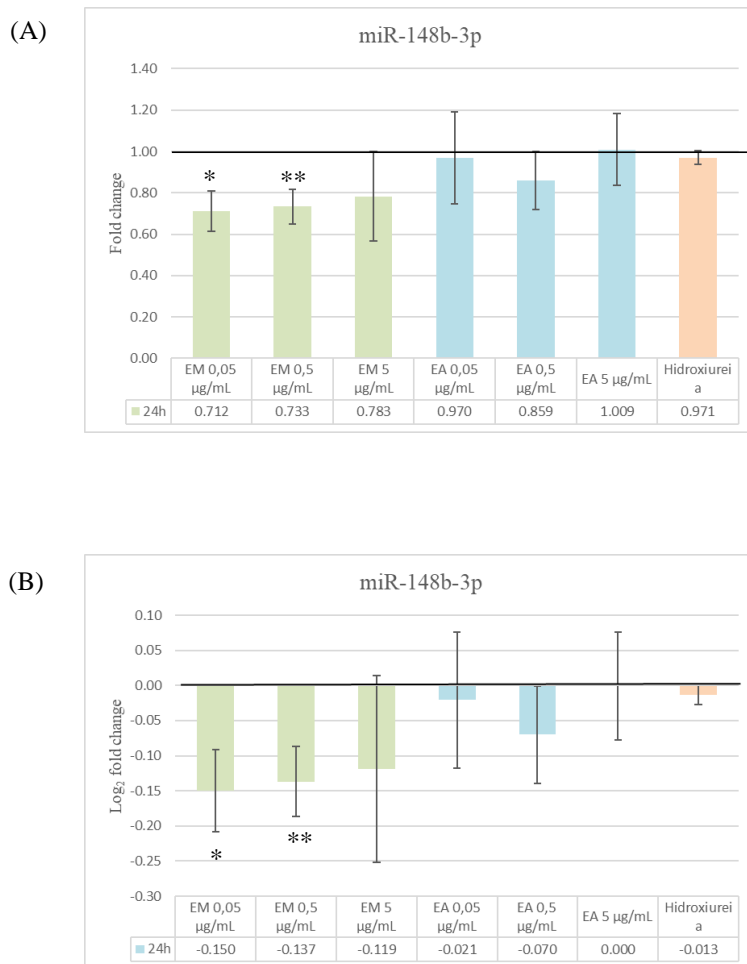


**Figura 4.20** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do miR-29c-3p.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do miR-29c-3p após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

A análise transcricional do miR-148b-3p que se apresenta na **Figura 4.21 (A)** e **(B)**, mostra a diminuição da expressão deste miRNA em todas as concentrações do EMFCP, EAFCP comparativamente às células não expostas, tendo estes compostos o mesmo comportamento que a HU.

Estes resultados são estatisticamente significativos no extrato metanólico EMFCP a 0,05 µg/mL com  $p = 0,014$  e EMFCP a 0,5 µg/mL com  $p = 0,003$ .



**Figura 4.21** - Efeitos dos EMFCP e EAFCP na expressão relativa do miR-148b-3p.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do miR-148b-3p após exposição ao EMFCP, EAFCP (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e à Hidroxiureia (HU). (A) Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão), (B) Log<sub>2</sub> da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio padrão) da expressão génica. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log<sub>2</sub> da expressão relativa, em relação ao controlo negativo (CN), representadas como  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , foram calculadas através do teste t.

## 5. Discussão

---

O objetivo deste trabalho experimental foi comparar os efeitos dos extratos metanólicos (EMFCP) e aquosos (EAFCP) de folhas de *Carica papaya*, em diferentes concentrações e avaliar se este composto natural tem potencial ao nível da regulação da expressão de genes das globinas, dos genes reguladores/silenciadores transcricionais da HbF, de genes moduladores epigenéticos e de miRNAs reguladores da HbF. Para isso, foram utilizadas linhas de células K562 expostas ao EMFCP e ao EAFCP, a diferentes concentrações, nomeadamente, 0,05; 0,5 e 5 µg/mL. Para além dos extratos, a células foram expostas ao fármaco mais viável na reativação da HbF, a hidroxiureia (HU).

Historicamente, em regiões como a África e a Índia, uma prática comum envolvia a pulverização de folhas de plantas para criar infusões, decocções ou preparações tópicas que tradicionalmente se acreditava possuírem eficácia terapêutica contra doenças específicas. A investigação científica contemporânea tem subsequentemente substanciado a noção de que estes compostos que ocorrem naturalmente possuem de facto propriedades medicinais com vantagens demonstráveis para a saúde [146]. Por conseguinte, é essencial que o pó da folha de papaia seja preparado através de metodologias de extração precisas em condições ótimas. A água é o solvente mais seguro, mais amigo do ambiente e mais facilmente disponível para a extração de plantas, como a papaia. Em contraste com os solventes orgânicos habitualmente utilizados, a água é mais económica [131]. Atualmente, faltam dados publicados sobre a utilização otimizadas da água para a extração e análise de potenciais compostos bioativos das folhas de papaia. Os extratos metanólicos das folhas exibem propriedades vasodilatadoras, sugerindo o seu potencial na mitigação dos fatores de risco cardiovascular. Por outro lado, o extrato aquoso das folhas de papaia apresentou efeitos hipoglicémicos e antioxidantes [129], [131]. É de notar que os extratos de *C. papaya* apresentam propriedades protetoras sobre a membrana das hemácias, preservando a sua integridade e aumentando a resistência ao stress osmótico, reduzindo assim a fragilidade da membrana. Este efeito revelou-se particularmente significativo nas células falciformes, que têm uma relação volume/área superficial alterada em comparação com os eritrócitos normais [130].

Com estes factos em conta, o presente estudo avaliou, numa primeira fase, a proliferação, a viabilidade e a citotoxicidade do EMFCP, do EAFCP e da HU, em células K562. A HU é um fármaco que induz a HbF mas está associada a alguma citotoxicidade, que é evidente na **Figura 4.1**, uma vez que a sua proliferação é bastante reduzida, em comparação ao controlo (células e meio). O EMFCP apresenta taxas de proliferação bastante elevadas, sendo a maior taxa correspondente ao EMFCP de concentração 5 µg/mL. O EAFCP também apresenta uma elevada proliferação, quando comparado à HU, no entanto, encontra-se abaixo do controlo, com exceção ao EAFCP à concentração de 5 µg/mL que apresenta a mesma taxa de proliferação que o controlo negativo.

A viabilidade celular foi avaliada através de duas metodologias distintas: a técnica inicial utilizou o ensaio de viabilidade com Azul tripano, enquanto o segundo método envolveu o ensaio de viabilidade CellTiter-Blue. O método do Azul tripano apresenta-se na **Figura 4.2**, onde é possível constatar que a HU diminui a viabilidade celular comparativamente ao controlo, que mais uma vez, sustenta a sua natureza citotóxica. O EMFCP apresenta uma viabilidade acima dos 97 %, apesar de apenas o EMFCP de concentração 5 µg/mL, apresentar maior viabilidade que o controlo. Já o EAFCP, apresenta uma viabilidade superior a 98%. O EAFCP às concentrações 0,5 e 5 µg/mL, apresentam uma viabilidade superior ao controlo.

O segundo método de viabilidade foi através de um ensaio CellTiter-Blue, que se baseia na capacidade das células vivas reduzirem um corante resazurina num composto fluorescente designado resorufina. O nível de fluorescência é proporcional ao número de células vivas. A **Figura 4.3** representa os resultados deste ensaio após 24h de exposição celular. Ao comparar os resultados, é importante observar que a HU exerce um efeito na diminuição da viabilidade das células K562, embora não apresente o desvio mais significativo em relação ao grupo de controlo. Em particular, a incubação de EMFCP, administrado às concentrações de 0,05 e 5 µg/mL, manifesta a redução mais acentuada da viabilidade celular em relação ao controlo. Em contraste, o EAFCP apresenta uma viabilidade celular superior em comparação com o EMFCP, com o EAFCP a 0,05 µg/mL a aumentar acentuadamente a viabilidade celular quando comparado ao grupo de controlo.

Em suma, os dois ensaios (Azul tripano e CellTiter-Blue) fornecem informações diferentes sobre a viabilidade celular e os resultados mostram variações nos efeitos das substâncias testadas (HU, EMFCP e EAFCP) na viabilidade celular. O ensaio CellTiter-Blue parece ser mais sensível aos efeitos do EMFCP e do EAFCP, com o EAFCP a apresentar uma viabilidade celular superior em determinadas concentrações. Estes resultados sugerem que a escolha do ensaio de viabilidade pode influenciar a interpretação dos dados de viabilidade celular e que os efeitos específicos dos compostos na viabilidade celular podem variar consoante o ensaio utilizado.

Para analisar a citotoxicidade dos extratos e da HU, foi realizado um teste não radioativo, designado CytoTox96. A intensidade da cor está diretamente relacionada com a quantidade de LDH libertada, servindo como indicador direto de citotoxicidade. Utilizando a análise de fluorescência, conforme ilustrado na **Figura 4.4**, o controlo negativo demonstra uma percentagem de citotoxicidade de aproximadamente 40%. Consequentemente, a HU apresenta um ligeiro aumento em comparação com o controlo, afirmando a sua natureza citotóxica. Por sua vez, o EMFCP regista valores de citotoxicidade inferiores a 36%, o que indica o seu baixo potencial citotóxico. Contrariamente, o EAFCP manifesta uma percentagem de citotoxicidade superior a 44%. Estes dados sugerem que os extratos aquosos parecem ter uma citotoxicidade mais elevada do que os extratos metanólicos no contexto em estudo.

A principal distinção entre extractos metanólicos e aquosos reside na sua composição, com variações nos tipos e quantidades de constituintes. Esta distinção deve ser realçada e subsequentemente utilizada para racionalizar as diferenças de expressão após a exposição a ambos os tipos de extrato. As propriedades de solvente diferentes do metanol em comparação com a água podem influenciar a solubilidade e a acessibilidade de diversos compostos. Consequentemente, pode ter impacto na forma como as células reagem à presença de metanol ou de água no seu ambiente. É de salientar que as folhas de *C. papaya* contêm um amplo espectro de fitoquímicos, incluindo compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides e outros metabolitos secundários. A composição destes fitoquímicos pode apresentar variações entre extratos metanólicos e aquosos [131]. É possível que o extrato aquoso contenha uma maior proporção de compostos mais biodisponíveis para as células. Este ensaio vai contra o estudo feito por *Young et al.*, que usou um método de extração com água considerando-o com potencial “para uma maior purificação e aplicação em estudos futuros”.

No contexto deste estudo experimental, a técnica de RT-qPCR foi uma ferramenta analítica essencial. Para realizar a RT-qPCR de forma eficaz, é fundamental compreender a eficiência da RT-qPCR e o seu cálculo, assegurando a quantificação meticulosa dos níveis de expressão génica. Esta compreensão da eficiência da PCR

serviu como um meio fundamental para retificar variações na eficiência da amplificação, permitindo assim a determinação precisa das quantidades iniciais de genes nas amostras examinadas.

A avaliação da eficiência da PCR foi efetuada através de um processo em duas fases. Inicialmente, os genes foram submetidos à análise por RT-qPCR após a extração do RNA total e a subsequente síntese de DNA complementar (cDNA). Para a avaliação da eficiência na fase inicial, o kit *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* da Bio-Rad foi selecionado como reagente preferencial. Ao analisar vários genes, tornou-se evidente que a eficiência dos mesmos ultrapassava os critérios estabelecidos na literatura existente. Posteriormente, foi efetuada uma investigação aprofundada sobre a metodologia, o processo de diluição e as técnicas de pipetagem. Após esta análise, os valores de eficiência registaram um declínio, aproximando-se de valores próximos do intervalo aceitável estabelecido (90%-110%). De notar que se mantiveram ligeiramente elevados para além deste intervalo, como demonstrado na **Figura 4.5**, que apresenta um caso ilustrativo envolvendo o gene *HBA* entre os examinados. O segundo método foi realizado para uma avaliação subsequente utilizando o *One-Step NZYSpeedy RT-qPCR Green Kit*. Com esta análise, os valores de eficiência do RT-qPCR dos primers ficou dentro dos limites estabelecidos, como é possível verificar através do gene *HBA*, na **Figura 4.6**. Neste estudo, todos os genes investigados foram submetidos a uma avaliação de eficiência, revelando eficiências consistentes na maioria dos genes, no intervalo de 90% a 110%. No entanto, é de salientar que alguns genes (**Tabela 4.1**), como o gene *HIC2*, com uma eficiência de 189%, e o gene *BCL11A*, com uma eficiência de 338%, se desviaram significativamente dos limites aceitáveis definidos. Estes desvios de eficiência podem ter implicações substanciais na análise dos padrões de expressão génica. O gene *HIC2*, com um valor de eficiência muito acima da norma, pode resultar numa falta de valores de expressão significativos, tornando difícil tirar conclusões significativas. Por outro lado, o gene *BCL11A*, com um desvio padrão extremamente elevado, pode introduzir variabilidade que afeta a consistência dos dados de expressão.

A importância da eficiência da RT-qPCR na análise da expressão génica é diversa. Uma curva de calibração serve para avaliar a precisão de um ensaio PCR, um aspeto crítico quando se quantificam números de cópias de genes ou alterações na expressão genética [147]. No contexto do método  $\Delta Cq$ , que é frequentemente utilizado para essa quantificação, o estudo da eficiência, uma medida da exatidão do ensaio, é fundamental [147], [148]. Negligenciar as considerações relativas à eficiência pode introduzir erros, causando uma subestimação ou sobrestimação da expressão genética, conduzindo assim potencialmente a inferências biológicas incorretas. Além disso, promove uma melhor comparabilidade entre diversas amostras [149].

O desempenho positivo do segundo método pode ser atribuído a fatores mencionados anteriormente, tais como potenciais problemas com a precisão da pipetagem, imprecisões na série de diluições ou a presença de inibidores que afetam a enzima polimerase [148], [149].

A expressão da hemoglobina pode ser regulada através de proteínas reguladoras da cromatina que modulam a acessibilidade dos genes através da alteração do empacotamento do DNA em torno das proteínas histonas, influenciando a atividade transcricional [40],[60],[64]. Os fatores de transcrição, por outro lado, atuam como interruptores moleculares, ligando-se a sequências específicas de DNA para ativar ou reprimir a transcrição dos genes [40] [150]. Os miRNAs funcionam como reguladores negativos pós-transcricionais. Estas pequenas moléculas de RNA podem ter como alvo os RNA mensageiros (mRNA), reduzindo a sua estabilidade ou

bloqueando a tradução em proteínas. Ao fazê-lo, os miRNAs desempenham um papel vital na regulação da expressão genética numa fase posterior [70], [71], [151].

Neste sentido, começou-se pela análise dos padrões de expressão dos genes referentes às globinas. Ao analisar os resultados, é possível observar, de acordo com o esperado, que a HU aumentou a transcrição dos genes *HBA* e *HBG1* de forma estatisticamente significativa. Para o gene *HBB*, a exposição da HU não apresentou variações. Os resultados demonstraram ainda que para o gene *HBA*, o EMFCP para uma concentração de 0,5 µg/mL diminuiu a transcrição deste gene, enquanto as restantes concentrações deste extrato e as concentrações do EAFCP não apresentam variações significativas. Para o gene *HBB*, o EMFCP (0,05 e 0,5 µg/mL), apresenta uma diminuição da transcrição de forma estatisticamente significativa.

Até agora, vários fatores têm surgido como potenciais participantes no controlo da  $\gamma$ -globina. Entre estes fatores, vários genes desempenham um papel importante. O *BCL11A* [49] e o *HIC2* [54], por exemplo, foram identificados em estudos como supressores da  $\gamma$ -globina, enquanto o gene não codificante *BGLT3* foi caracterizado como um ativador da expressão da HbF [50].

Ao analisar os resultados dos genes silenciadores da HbF, observou-se que os EMFCP (0,05 µg/mL) e os EAFCP (0,5 µg/mL) induzem a expressão do gene *BCL11A*. As restantes concentrações do EMFCP e do EAFCP não apresentaram variações estatisticamente significativas. Sendo este gene um inibidor, quando exposto à HU, a sua expressão deveria de diminuir, no entanto, não há variações estatisticamente significativas aquando da exposição desta. A observação de uma eficiência invulgarmente elevada de 338% no contexto do gene *BCL11A* sugere uma potencial discrepância nos resultados esperados dos resultados associados. Estes resultados servem como indicador de potenciais problemas na experiência RT-qPCR ou na análise de dados, exigindo um exame minucioso dos procedimentos experimentais e da integridade das sequências de primers.

Quanto aos resultados do gene *HIC2*, o gráfico deste gene este não apresenta dados estatisticamente significativos. A amplificação, por RT-qPCR, deste gene apresentou uma eficiência de 189% podendo estar na origem desta falta de variação. Sabe-se que o *HIC2* é um repressor transcricional que regula negativamente a expressão do gene *BCL11A*. O resultado esperado para o *HIC2* neste contexto era um aumento da sua expressão, um mecanismo destinado a desativar o *BCL11A* e, assim, modular a expressão da HbF. Indo ao encontro com o estudo feito por *Huang et al.* que afirma que aumentando a expressão do gene *HIC2*, este exerce controlo no desenvolvimento do cluster de  $\beta$ -globina, inativando o *BCL11A* na fase de desenvolvimento [54]. No entanto, uma vez que os resultados relativos ao gene *HIC2* carecem de dados quantitativos, não é possível tirar conclusões definitivas com base na literatura disponível.

Analisando os níveis de expressão de um dos genes ativadores da expressão de HbF, o gene *BGLT3*, verifica-se que a exposição ao EMFCP e o EAFCP em todas as concentrações não conduz a variações estatisticamente significativas do mesmo. Já o tratamento com a HU, ativa a expressão deste gene ativador. Um estudo realizado por *Ivaldi* e colaboradores que indica a inibição do *BGLT3* reduz a expressão da HbF em células K562, uma vez que este é um ativador da HbF [50]. Este estudo apresenta um exemplo do comportamento esperado deste gene em particular.

Tanto a investigação pré-clínica como a clínica fornecem provas irrefutáveis de que as modificações epigenéticas, facilitadas pelas DNA metiltransferases (DNMTs) e pelas histonas desacetilases (HDACs), possam estar

envolvidas na indução HbF [56]. Como tal, neste estudo foram analisados os padrões de expressão dos genes *DNMT1* e *DNMT3B*, envolvidos na metilação do DNA e os genes *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*, envolvidos na desacetilação de histonas.

Em relação ao gene *DNMT1* verifica-se que nenhum composto testado altera a expressão do gene.

O gene referente às DNA metiltransferases *de novo* (*DNMT3B*) tem um aumento da sua transcrição aquando do tratamento com a HU. Os restantes tratamentos não afetam a expressão deste gene.

Os elevados níveis de metilação, inibem o aumento da expressão da  $\gamma$ -globina e, conseqüentemente, a níveis mais baixos de HbF [60].

Em relação aos genes que codificam as HDACs nucleares, observa-se que apenas a exposição à HU, reduz a expressão do gene *HDAC2*. Para os genes *HDAC1*, *HDAC3* e *HDAC8*, nenhum tratamento tem variações significativas ao nível da sua expressão.

Estudos revelam que a inibição da *HDAC1* e *HDAC2* pode aumentar a produção de hemoglobina fetal [67]. Aquando da exposição aos extratos, este não apresenta variações.

No âmbito deste estudo, foi dada especial atenção aos miRNAs devido ao seu potencial como indutores promissores da síntese de HbF, ao promoverem a regulação pós-transcricional negativa dos seus repressores, o que poderia melhorar a severidade clínica da DCF. Estes pequenos RNAs não codificantes também podem regular diretamente os genes que codificam a HbF [78].

Os genes alvo dos miRNAs estudados, para além de se encontrarem descritos na literatura, foram também analisados pelo programa de previsão de alvos de miRNA, miRDIP, tendo-se utilizado uma classe de pontuação de filtragem de consenso de 1-5% (Classe muito alta e alta, respetivamente) [80].

Assim, no trabalho realizado, analisaram-se os padrões de expressão dos seguintes miRNAs envolvidos na regulação da HbF: miR-30a-3p, miR-29c-3p e miR-148b-3p.

Relativamente ao miR-30a-3p, que tem como alvo o gene *BCL11A* [83] nenhum composto altera a sua expressão. Era esperado que a inibição da transcrição do miR-30a-3p, aumentasse a expressão do *BCL11A* [83].

Analisando o miR-29c-3p, quem tem como alvos os genes *BCL11A* [77] e *DNMT3B* [152] observa-se que, tanto a exposição ao EMFCP (0,05 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) como a exposição ao EAFCP (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) reduzem a expressão deste miRNA, assim como a HU. Observou-se nos genes alvos, nestas condições o aumento da transcrição do gene *BCL11A* na presença de EMFCP (0,05  $\mu\text{g/mL}$ ), EAFCP (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e um aumento da expressão do gene *DNMT3B* aquando da exposição a HU. Uma vez que o miRNAs são reguladores negativos da expressão dos genes, a diminuição da expressão do mesmo é consistente com o aumento da expressão dos seus genes alvo. [77][152].

Ao analisar a expressão do miR-148b-3p, que tem como alvos os genes *BCL11A* [77] e *DNMT1* [153], [154], observa-se que a exposição ao EMFCP (0,05 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) reduz a expressão do mesmo. Uma vez que o gene *DNMT1* não apresenta variações estatisticamente significativas, nada se pode concluir sobre este gene. Já o *BCL11A*, apresenta um aumento da expressão ao tratamento com EMFCP (0,05  $\mu\text{g/mL}$ ). Uma vez que o miRNAs são reguladores negativos da expressão dos genes, a diminuição da expressão do mesmo é consistente com o

aumento da expressão dos seus genes alvo, assim, a diminuição da expressão do miR148b-3p e o aumento da expressão do seu gene alvo, o *BCL11A* vai ao encontro com estudos realizados por *Mnika* et al. [77], no entanto vai contra estudos realizados por *Sankaran* et al. [155] pois a regulação negativa da expressão de *BCL11A* em células eritróides adultas primárias conduz à expressão de HbF.

Os efeitos dos extratos metanólico e aquoso em genes inibidores ou ativadores da hemoglobina podem ser dependentes da dose. Diferentes concentrações do extrato podem levar a diferentes graus de interação, com concentrações mais elevadas e terem efeitos potencialmente mais pronunciados.

No trabalho realizado por *Canteiro* et al. [156] avaliou-se o efeito de diferentes concentrações dos extratos metanólicos nas folhas de *C. papaya* em células K562, nomeadamente a 0,5; 50 e 100 µg/mL, já no presente trabalho as concentrações dos extratos são de 0,05; 0,5 e 5 µg/mL. As diferentes concentrações utilizadas nestes estudos levantam pontos importantes a considerar.

No contexto do presente estudo, é provável que as concentrações selecionadas possam ter sido insuficientes para provocar efeitos significativos nos genes e compostos em investigação. Por outro lado, a utilização de concentrações mais elevadas no estudo anterior poderá ter sido mais eficaz na elucidação de alterações na atividade dos genes. No entanto, vale a pena notar que concentrações excessivamente elevadas, como observado na investigação preliminar, não produziram respostas fenotípicas.

Como resultado, foi adotada uma redução estratégica dos níveis de concentração no presente estudo, com o objetivo de investigar a potencial influência de concentrações mais baixas. É importante sublinhar que a seleção de uma gama de concentrações adequada é uma decisão fundamental, com um impacto profundo na interpretação dos resultados do estudo.

Para além disso, deve-se ter em conta o estado do material vegetal utilizado. Durante o ensaio realizado, foram utilizadas folhas que tinham sido secas durante um período prolongado - cerca de um ano após a secagem inicial. Este período de secagem prolongado pode ter alterado as propriedades do material vegetal, conduzindo a diferenças na composição do extrato e no seu comportamento.

Além disso, a exposição prolongada ao ar e aos fatores ambientais pode ter provocado a oxidação de alguns dos compostos presentes nas folhas. Este processo pode alterar a composição química e o funcionamento dos extratos, o que, por sua vez, afeta os genes que estão a ser estudados.

Em resumo, a escolha das concentrações e o estado do material vegetal podem ter um impacto significativo nos resultados e na forma como são interpretados. Para compreender plenamente como é que os extratos afetam a expressão dos genes e a atividade dos compostos, ter-se-á de considerar cuidadosamente estes fatores e a sua potencial influência nos resultados para investigações futuras.

Idealmente, o EMFCP e o EAFCP deveriam induzir a expressão das hemoglobinas e diminuir a expressão dos repressores, como é o caso de fatores de transcrição negativos, das desacetilases e das metilases, e aumentarem a expressão de indutores, no entanto essa situação não se verifica para a maioria dos genes, nomeadamente o *HBA*, o *HBB*, o *HBG1*, que são indutores da expressão da hemoglobina, no entanto, nos resultados observados estes funcionam como inibidores. No caso dos genes reguladores transcricionais como o *BCL11A* que é um gene

repressor da expressão de HbF [46], e o *BGLT3*, um ativador da expressão de HbF [51],[52], também se obtém resultados contrários ao pretendido da sua expressão.

A regulação da transcrição do gene *BCL11A* está intrinsecamente ligada ao *HIC2*, um conhecido repressor da transcrição. Nos casos em que *HIC2* exerce um controlo regulador positivo, e funciona como um inibidor da expressão de *BCL11A*, promovendo consequentemente o início da transcrição de HbF [54],[55]. No entanto, no presente estudo, não foram observadas variações significativas na expressão do gene *HIC2*, o que sugere a ausência de um impacto regulador evidente na expressão do *BCL11A*.

Relativamente aos moduladores epigenéticos, os genes *DNMT1* e *DNMT3B* exibem a capacidade de aumentar os níveis de HbF quando as respetivas expressões são inibidas [56],[60],[61]. No entanto, este efeito é visível apenas para o gene *DNMT3B* na presença de HU.

No contexto das histona desacetilases (HDACs), a inibição da sua expressão está correlacionada com um aumento da expressão de HbF [66], [67],[69]. Especificamente, os genes *HDAC1*, *HDAC3* e *HDAC8* não apresentam variações significativas nos seus níveis de expressão. Por outro lado, a exposição à HU resulta na inibição da expressão de *HDAC2*, o que está de acordo com os resultados estabelecidos e documentados na literatura científica.

Quando a expressão de um miRNA aumenta, deve resultar numa diminuição da expressão do seu gene alvo, de acordo com o modo de ação fundamental de todos os miRNAs, que é o de exercer uma regulação negativa sobre a expressão dos seus genes alvo [70], [75]. Inversamente, se a expressão de um miRNA diminuir numa determinada condição, deverá levar a um aumento da expressão do seu gene alvo.

O miR-29c-3p tem como genes alvo, o *BCL11A* e *DNMT3B*. A exposição ao EMFCP, EAFCP e HU reduziu os níveis de miR-29c-3p, levando a um aumento da atividade do gene *BCL11A*. O tratamento com HU também aumentou a expressão do *DNMT3B*.

Para o miR-148b-3p os seus efeitos nos genes *BCL11A* e *DNMT1* revelou que a exposição ao EMFCP levou a níveis reduzidos de miRNA comparativamente a células não expostas ao extrato. No entanto, não foi possível estabelecer variações significativas na expressão do gene *DNMT1*. Por outro lado, o *BCL11A* mostrou um aumento da expressão quando tratado com EMFCP numa concentração mais baixa (0,05 µg/mL).

Em conclusão, a investigação do miR-30a-3p, um regulador do gene *BCL11A*, revelou que nenhum dos compostos testados teve um impacto significativo na sua expressão.

Os extratos metanólicos apresentam uma maior bioatividade devido à sua capacidade de abranger um espectro mais amplo de compostos, incluindo os que possuem potenciais atributos farmacológicos [131]. Por outro lado, os extratos aquosos manifestam geralmente uma bioatividade reduzida quando comparados com os metanólicos, encontrando frequentemente aplicação em contextos mais suaves, como a preparação de infusões de ervas ou como componentes fundamentais em formulações nos sectores alimentar e cosmético [130], [131],[133], [157]. O metanol assume o papel de conservante, atenuando eficazmente a proliferação de microrganismos, contribuindo assim para o prolongamento da estabilidade do extrato [130]. Em contraste, os extratos aquosos estão predispostos

à degradação devido ao seu conteúdo de água, tornando-os inerentemente menos resistentes e necessitando da implementação de técnicas de armazenamento e preservação[157]. O extrato aquoso pode ter uma maior proporção de compostos que são mais facilmente absorvidos pelas células, resultando potencialmente em respostas celulares diferentes em comparação com outros extratos. A compreensão destas variações na disponibilidade dos compostos é crucial para a interpretação dos resultados experimentais.

## 6. Conclusão

---

A regulação da hemoglobina envolve uma interação complexa de mecanismos moleculares que controlam a produção de diferentes tipos de hemoglobina em várias fases da vida [1][8]. Os fatores de transcrição, que atuam como interruptores genéticos, desempenham um papel central neste processo, determinando quais os genes da hemoglobina que são ativados ou desativados durante o desenvolvimento celular [38]–[40].

A hemoglobina fetal (HbF) é o tipo mais predominante de hemoglobina durante o desenvolvimento fetal, mas os seus níveis diminuem após o nascimento, dando lugar à hemoglobina adulta [13]. No entanto, em determinadas condições, é possível induzir ou manter níveis elevados de HbF nos glóbulos vermelhos adultos [92]. Isto é importante porque a HbF tem propriedades únicas que podem ser benéficas para indivíduos com determinadas hemoglobinopatias, como a doença falciforme ou a talassemia [105], [108], [158].

Desde esta descoberta que se tenta encontrar soluções para reverter o *switch* entre as hemoglobinas. Nesta troca estão envolvidos diversos mecanismos genéticos e epigenéticos e miRNAs que regulam os níveis de expressão da HbF. Alguns dos genes sujeitos a essa regulação são as formas adultas da hemoglobina (*HBA* e *HBB*), as formas fetais (*HBG1* e *HBG2*) e os genes reguladores, o *MYB*, o *KLF1*, o *BCL11A*, o *HIC2* e o *BGLT3* que codificam fatores de transcrição. Ainda estão envolvidos os moduladores epigenéticos da globina, nomeadamente o *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* e os miRNAs (miR-30a-3p, miR-29c-3p, miR-148b-3p) que podem regular diretamente os genes que codificam para a HbF ou podem indiretamente a diminuir aos níveis expressão dos seus reguladores.

Em suma, obtiveram-se os seguintes resultados:

- A proliferação celular não é afetada significativamente pelos compostos a que as células são expostas;
- Os compostos estudados não apresentam sinais de citotoxicidade;
- As células expostas a concentrações do EMFCP afetam a expressão da HbF, porém apenas os resultados obtidos para o gene *HBA*, *HBB*, *BCL11A* e para os miRNAs miR-29c-3p e miR-148-3p são estatisticamente significativos.
- As células expostas a concentrações do EAFCP afetam a expressão da HbF, no entanto, os resultados são estatisticamente significativos no gene *BCL11A* e para o miR-29c-3p.

Em conclusão, este estudo oferece uma nova perspetiva sobre o potencial dos compostos naturais como moduladores da HbF. Embora os resultados observados, que envolvem a regulação negativa dos genes das hemoglobinas e a ativação dos genes inibidores da HbF, possam não estar alinhados com as abordagens terapêuticas atuais para as hemoglobinopatias, representam uma via promissora para investigação futura. Estas descobertas sugerem um método de tratamento potencialmente mais acessível e eficaz no futuro, oferecendo esperança de uma melhor abordagem em comparação com as atuais.

## 7. Perspetivas futuras

---

Numerosas investigações têm sublinhado o potencial terapêutico dos miRNAs no tratamento dos distúrbios da hemoglobina, em virtude da sua capacidade de se ligarem seletivamente e inibirem as moléculas repressoras da HbF. No entanto, é necessária mais investigação para compreender como funcionam os miRNAs e quais os genes a que se dirigem.

No futuro, é importante ter em conta que a maioria das linhas celulares atualmente utilizadas para a investigação de glóbulos vermelhos provém de indivíduos com tipos específicos de leucemia, o que as torna inadequadas para o estudo de glóbulos vermelhos normais. Existe uma quantidade limitada de investigação que explora a criação de linhas imortalizadas de glóbulos vermelhos humanos normais. Estudos recentes deram um passo significativo em direção a esta perspetiva futura ao estabelecer a primeira linha imortalizada de glóbulos vermelhos adultos normais, conhecida como BEL-A [159], [160]. É uma técnica robusta e reproduzível, tendo gerado com sucesso várias linhas adicionais. Para além de contribuir para a criação de novos produtos terapêuticos, a linha celular BEL-A é facilmente transmissível e constitui um instrumento excepcional para a investigação da eritropoiese.

Em estudos futuros, seria útil testar diferentes concentrações dos compostos e alargar a duração da exposição para encontrar as doses mais seguras e eficazes de reforço da HbF. Além disso, é necessário proceder a uma análise exaustiva dos constituintes químicos exatos dos extratos derivados de EMFCP e EAFCP, responsáveis por induzir a transcrição de HbF. Técnicas avançadas como a cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) podem ser utilizadas para identificar e medir os componentes químicos destes extratos. Este perfil químico detalhado aumenta a compreensão das suas propriedades bioativas e potencial utilidade terapêutica nos doentes com hemoglobinopatias.

## 8. Referências bibliográficas

- [1] C. Mussolino and J. Strouboulis, “Recent Approaches for Manipulating Globin Gene Expression in Treating Hemoglobinopathies,” *Front. Genome Ed.*, vol. 3, no. August, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3389/fged.2021.618111.
- [2] G. Stamatoyannopoulos, “Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation,” *Exp. Hematol.*, vol. 33, no. 3, pp. 259–271, 2005, doi: 10.1016/j.exphem.2004.11.007.
- [3] M. Mukherjee, M. Rahaman, S. K. Ray, P. C. Shukla, T. K. Dolai, and N. Chakravorty, “Revisiting fetal hemoglobin inducers in beta-hemoglobinopathies: a review of natural products, conventional and combinatorial therapies,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 49, no. 3, pp. 2359–2373, 2022, doi: 10.1007/s11033-021-06977-8.
- [4] A. J. Marengo-Rowe, “Structure-Function Relations of Human Hemoglobins,” *Baylor Univ. Med. Cent. Proc.*, vol. 19, no. 3, pp. 239–245, 2006, doi: 10.1080/08998280.2006.11928171.
- [5] B. M. P. V. Nova, “Diagnóstico e tratamento da drepanocitose: novas metodologias,” pp. 1–58, 2022.
- [6] J. G. Cominal, “Mutações causadoras de  $\beta$  -talassemia em Ribeirão Preto-SP : identificação e correlação com o fenótipo da doença,” p. 93, 2015.
- [7] “Blood and the respiratory system: 4.2 Haemoglobin - OpenLearn - Open University.” <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/blood-and-the-respiratory-system/content-section-4.2> (accessed Aug. 16, 2023).
- [8] D. R. Higgs, “The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a011718.
- [9] H. P. J. Voon and J. Vadolas, “Controlling  $\alpha$ -globin: A review of  $\alpha$ -globin expression and its impact on  $\beta$ -thalassemia,” *Haematologica*, vol. 93, no. 12, pp. 1868–1876, 2008, doi: 10.3324/haematol.13490.
- [10] R. Galanello and A. Cao, “Alpha-thalassemia,” *Genet. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 83–88, 2011, doi: 10.1097/GIM.0b013e3181fcb468.
- [11] E. H. Margulies *et al.*, “Identification and characterization of multi-species conserved sequences,” *Genome Res.*, vol. 13, no. 12, pp. 2507–2518, 2003, doi: 10.1101/gr.1602203.
- [12] R. Galanello and A. Cao, “Alpha-thalassemia,” *Genet. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 83–88, 2011, doi: 10.1097/GIM.0b013e3181fcb468.
- [13] G. Barbarani, A. Labeledz, S. Stucchi, A. Abbiati, and A. E. Ronchi, “Physiological and Aberrant  $\gamma$ -Globin Transcription During Development,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. April, pp. 1–10, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.640060.
- [14] S. L. Thein, “Genetic insights into the clinical diversity of  $\beta$  thalassaemia,” *Br. J. Haematol.*, vol. 124, no. 3, pp. 264–274, 2004, doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04769.x.
- [15] A. Cao and R. Galanello, “Beta-thalassemia,” *Genet. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 61–76, 2010, doi: 10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed.
- [16] CDC, “Hemoglobinopathies : Current Practices for Screening , Confirmation and Follow-up,” *Assoc. Public Heal. Lab.*, no. December, pp. 5–57, 2015, [Online]. Available: [https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/documents/nbs\\_hemoglobinopathy-testing\\_122015.pdf](https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/documents/nbs_hemoglobinopathy-testing_122015.pdf)
- [17] S. N. Costa, S. Madeira, M. A. Sobral, and G. Delgadinho, “Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família,” *Rev. Port. Clínica Geral*, vol. 32, no. 6, pp. 416–424, 2016, doi: 10.32385/rpmgf.v32i6.11963.
- [18] D. J. Weatherall and J. B. Clegg, “Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 79, no. 8, pp. 704–712, 2001.
- [19] K. Esoh and A. Wonkam, “Evolutionary history of sickle-cell mutation: Implications for global genetic medicine,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 30, no. R1, pp. R119–R128, 2021, doi: 10.1093/hmg/ddab004.
- [20] M. C. Martins, G. Olim, J. Melo, H. A. Magalhaes, and M. O. Rodrigues, “Hereditary anaemias in Portugal: Epidemiology, public health significance, and control,” *J. Med. Genet.*, vol. 30, no. 3, pp. 235–239, 1993, doi: 10.1136/jmg.30.3.235.
- [21] “Análise crítica do programa de triagem neonatal para detecção de hemoglobinopatias em Dourados - MS NEONATAL PARA DETECÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS,” no. June, 2014.
- [22] J. Richer and A. E. Chudley, “The hemoglobinopathies and malaria,” *Clin. Genet.*, vol. 68, no. 4, pp. 332–336, 2005, doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00503.x.
- [23] “Malária.” <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/malaria/#o-que-e> (accessed Sep. 04, 2023).
- [24] L. Luzzatto, “Sickle cell anaemia and malaria,” *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 4, no. 1, 2012, doi: 10.4084/MJHID.2012.065.

- [25] N. M. Archer, N. Petersen, M. A. Clark, C. O. Buckee, L. M. Childs, and M. T. Duraisingh, "Resistance to *Plasmodium falciparum* in sickle cell trait erythrocytes is driven by oxygen-dependent growth inhibition," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 28, pp. 7350–7355, 2018, doi: 10.1073/pnas.1804388115.
- [26] S. Ali *et al.*, "Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies," *Mol. Genet. Genomic Med.*, vol. 9, no. 12, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1002/mgg3.1788.
- [27] R. Origa, "β-Thalassemia," *Genet. Med.*, vol. 19, no. 6, pp. 609–619, 2017, doi: 10.1038/gim.2016.173.
- [28] E. Fibach and E. A. Rachmilewitz, "Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia - an update," *F1000Research*, vol. 6, no. 0, 2017, doi: 10.12688/f1000research.12688.1.
- [29] S. Eridani, F. Avemaria, and A. Mosca, "Reactivation of fetal hemoglobin in thalassemia and sickle cell disease," *Thalass. Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 55–61, 2014, doi: 10.4081/thal.2014.2196.
- [30] A. M. Brandow and R. I. Liem, "Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01237-z.
- [31] S. M. Shahid and M. Jawed, "Journal of Medicine and Healthcare," *Scholar.Archive.Org*, vol. 2, no. 2, pp. 1–4, [Online]. Available: <https://scholar.archive.org/work/d6jtxiilcfesjltxtbk4tsk2jm/access/wayback/https://www.onlinescientificresearch.com/articles/covid19-nutrition-to-boost-immune-system-to-fight-infection.pdf>
- [32] Y. Sauntharajah *et al.*, "Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease," *Blood*, vol. 102, no. 12, pp. 3865–3870, 2003, doi: 10.1182/blood-2003-05-1738.
- [33] X. Wang and S. L. Thein, "Switching from fetal to adult hemoglobin," *Nat. Genet.*, vol. 50, no. 4, pp. 478–480, 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0094-z.
- [34] A. Paikari and V. A. Sheehan, "Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease," *Br. J. Haematol.*, vol. 180, no. 2, pp. 189–200, 2018, doi: 10.1111/bjh.15021.
- [35] J. M. Manning, L. R. Manning, A. Dumoulin, J. C. Padovan, and B. Chait, "Embryonic and Fetal Human Hemoglobins: Structures, Oxygen Binding, and Physiological Roles," *Subcell. Biochem.*, vol. 94, pp. 275–296, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-41769-7\_11.
- [36] A. Fantoni, A. De la Chapelle, and P. A. Marks, "Synthesis of embryonic hemoglobins during erythroid cell development in fetal mice.," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 4, pp. 675–681, 1969, doi: 10.1016/s0021-9258(18)94407-8.
- [37] W. G. Wood, "Haemoglobin synthesis during human fetal development," *Br. Med. Bull.*, vol. 32, no. 3, pp. 282–287, 1976, doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071376.
- [38] A. Starlard-Davenport, A. Fitzgerald, and B. S. Pace, "Exploring epigenetic and microRNA approaches for  $\gamma$ -globin gene regulation," *Exp. Biol. Med.*, vol. 246, no. 22, pp. 2347–2357, 2021, doi: 10.1177/15353702211028195.
- [39] B. Wienert, G. E. Martyn, A. P. W. Funnell, K. G. R. Quinlan, and M. Crossley, "Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for  $\beta$ -Hemoglobinopathies," *Trends Genet.*, vol. 34, no. 12, pp. 927–940, 2018, doi: 10.1016/j.tig.2018.09.004.
- [40] A. X. Fan, M. A. Hossain, J. Stees, E. Gavriloova, and J. Bungert, *Regulation of erythroid cell differentiation by transcription factors, chromatin structure alterations, and noncoding RNA*. Elsevier Inc., 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-799958-6.00011-1.
- [41] Y.-L. Cheng *et al.*, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %," *Intech*, vol. 11, no. tourism, p. 13, 2016, [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- [42] Y. Y. Yien and J. J. Bieker, "EKLF/KLF1, a Tissue-Restricted Integrator of Transcriptional Control, Chromatin Remodeling, and Lineage Determination," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 1, pp. 4–13, 2013, doi: 10.1128/mcb.01058-12.
- [43] S. L. Thein *et al.*, "Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 27, pp. 11346–11351, 2007, doi: 10.1073/pnas.0611393104.
- [44] X. Wang, N. Angelis, and S. L. Thein, "MYB – A regulatory factor in hematopoiesis," *Gene*, vol. 665, pp. 6–17, 2018, doi: 10.1016/j.gene.2018.04.065.
- [45] M. Roosjen, B. McColl, B. Kao, L. J. Gearing, M. E. Blewitt, and J. Vadolas, "Transcriptional regulators Myb and BCL11A interplay with DNA methyltransferase 1 in developmental silencing of embryonic and fetal  $\beta$ -like globin genes," *FASEB J.*, vol. 28, no. 4, pp. 1610–1620, 2014, doi: 10.1096/fj.13-242669.
- [46] V. G. Sankaran, J. Xu, and S. H. Orkin, "Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1202, pp. 64–68, 2010, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05574.x.
- [47] H. Fathallah, R. S. Weinberg, Y. Galperin, M. Sutton, and G. F. Atweh, "Role of epigenetic modifications in normal globin gene regulation and butyrate-mediated induction of fetal hemoglobin," *Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3391–3397, 2007, doi: 10.1182/blood-2007-02-076091.

- [48] H. Cao, G. Stamatoyannopoulos, and M. Jung, “Induction of human  $\gamma$  globin gene expression by histone deacetylase inhibitors,” *Blood*, vol. 103, no. 2, pp. 701–709, 2004, doi: 10.1182/blood-2003-02-0478.
- [49] Z. Chen, H. Yuan Luo, M. H. Steinberg, and D. H. K. Chui, “BCL11A represses HBG transcription in K562 cells,” *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 42, no. 2, pp. 144–149, 2009, doi: 10.1016/j.bcmd.2008.12.003.
- [50] M. S. Ivaldi, L. F. Diaz, L. Chakalova, J. Lee, I. Krivega, and A. Dean, “Fetal  $\gamma$ -globin genes are regulated by the BGLT3 long noncoding RNA locus,” *Blood*, vol. 132, no. 18, pp. 1963–1973, 2018, doi: 10.1182/blood-2018-07-862003.
- [51] P. Huang *et al.*, “Comparative analysis of three-dimensional chromosomal architecture identifies a novel fetal hemoglobin regulatory element,” *Genes Dev.*, vol. 31, no. 16, pp. 1704–1713, 2017, doi: 10.1101/gad.303461.117.
- [52] V. Chondrou *et al.*, “LRF Promotes Indirectly Advantageous Chromatin Conformation via BGLT3-lncRNA Expression and Switch from Fetal to Adult Hemoglobin,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 13, 2022, doi: 10.3390/ijms23137025.
- [53] “HIC2 HIC ZBTB transcriptional repressor 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23119> (accessed Sep. 11, 2023).
- [54] P. Huang *et al.*, “HIC2 controls developmental hemoglobin switching by repressing BCL11A transcription,” *Nat. Genet.*, vol. 54, no. 9, pp. 1417–1426, 2022, doi: 10.1038/s41588-022-01152-6.
- [55] S. A. Peslak *et al.*, “Regulation of Fetal Hemoglobin Production in Adult Erythroid Cells By Protein Phosphatase 6C (PPP6C),” *Blood*, vol. 140, no. Supplement 1, pp. 2502–2503, 2022, doi: 10.1182/blood-2022-165286.
- [56] A. S. Quina, M. Buschbeck, and L. Di Croce, “Chromatin structure and epigenetics,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, no. 11, pp. 1563–1569, 2006, doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.016.
- [57] S. Cheedipudi, O. Genolet, and G. Dobрева, “Epigenetic inheritance of cell fates during embryonic development,” *Front. Genet.*, vol. 5, no. FEB, pp. 1–7, 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00019.
- [58] P. Chaturvedi and S. C. Tyagi, “Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 173, no. 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1016/j.ijcard.2014.02.008.
- [59] H. Khan *et al.*, “Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 61, no. 10, pp. 1616–1639, 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1763910.
- [60] C. M. Kiefer, C. Hou, J. A. Little, and A. Dean, “Epigenetics of  $\beta$ -globin gene regulation,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 647, no. 1–2, pp. 68–76, 2008, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.014.
- [61] Q. Zhao *et al.*, “PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 304–311, 2009, doi: 10.1038/nsmb.1568.
- [62] Y. Gong *et al.*, “A natural DNMT1 mutation elevates the fetal hemoglobin level via epigenetic derepression of the  $\gamma$ -globin gene in  $\beta$ -thalassemia,” *Blood*, vol. 137, no. 12, pp. 1652–1657, 2021, doi: 10.1182/blood.2020006425.
- [63] D. Rossetto, N. Avvakumov, J. Côté, D. Rossetto, N. Avvakumov, and J. Côté, “A chromatin modification involved in diverse nuclear events Histone phosphorylation,” *Landes Biosci.*, vol. 2294, no. April, pp. 1098–1108, 2016.
- [64] M. H. Kuo and C. D. Allis, “Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation,” *BioEssays*, vol. 20, no. 8, pp. 615–626, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H.
- [65] P. Gallinari, S. Di Marco, P. Jones, M. Pallaoro, and C. Steinkühler, “HDACs, histone deacetylation and gene transcription: From molecular biology to cancer therapeutics,” *Cell Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 195–211, 2007, doi: 10.1038/sj.cr.7310149.
- [66] A. J. M. De Ruijter, A. H. Van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, and A. B. P. Van Kuilenburg, “Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family,” *Biochem. J.*, vol. 370, no. 3, pp. 737–749, 2003, doi: 10.1042/BJ20021321.
- [67] R. D. W. Kelly and S. M. Cowley, “The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: Complex co-stars with multiple leading parts,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 41, no. 3, pp. 741–749, 2013, doi: 10.1042/BST20130010.
- [68] E. B. Esrick, M. Mcconkey, K. Lin, A. Frisbee, and B. L. Ebert, “Inactivation of HDAC1 or HDAC2 induces gamma globin expression without altering cell cycle or proliferation,” *Am. J. Hematol.*, vol. 90, no. 7, pp. 624–628, 2015, doi: 10.1002/ajh.24019.
- [69] S. A. Park, H. Yoo, J. H. Seol, and K. Rhee, “HDAC3 and HDAC8 are required for cilia assembly and elongation,” *Biol. Open*, vol. 8, no. 8, 2019, doi: 10.1242/bio.043828.
- [70] C. Cyrus, “The role of mirnas as therapeutic tools in sickle cell disease,” *Med.*, vol. 57, no. 10, 2021, doi: 10.3390/medicina57101106.
- [71] Q. Yao, Y. Chen, and X. Zhou, “The roles of microRNAs in epigenetic regulation,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 51, pp. 11–17, 2019, doi: 10.1016/j.cbpa.2019.01.024.

- [72] S. Morales, M. Monzo, and A. Navarro, “Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression,” *Biomol. Concepts*, vol. 8, no. 5–6, pp. 203–212, 2017, doi: 10.1515/bmc-2017-0024.
- [73] Y. Wang *et al.*, “MiR-148b-3p functions as a tumor suppressor in GISTs by directly targeting KIT,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1186/s12964-018-0228-z.
- [74] G. D. Pule, S. Mowla, N. Novitzky, and A. Wonkam, “Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF - 1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce  $\gamma$ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease ,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 5, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s40169-016-0092-7.
- [75] A. Starlard-Davenport, Q. Gu, and B. S. Pace, “Targeting Genetic Modifiers of HBG Gene Expression in Sickle Cell Disease: The miRNA Option,” *Mol. Diagnosis Ther.*, vol. 26, no. 5, pp. 497–509, 2022, doi: 10.1007/s40291-022-00589-z.
- [76] S. S. Das *et al.*, “MicroRNA expression patterns in HbE/ $\beta$ -thalassemia patients: The passwords to unlock fetal hemoglobin expression in  $\beta$ -hemoglobinopathies,” *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 87, no. October 2020, p. 102523, 2021, doi: 10.1016/j.bcmd.2020.102523.
- [77] K. Mnika *et al.*, “Hydroxyurea-induced miRNA expression in sickle cell disease patients in Africa,” *Front. Genet.*, vol. 10, no. MAY, pp. 1–6, 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00509.
- [78] K. M. Taufiqul Arif, E. K. Elliot, L. M. Haupt, and L. R. Griffiths, “Regulatory mechanisms of epigenetic mirna relationships in human cancer and potential as therapeutic targets,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 10, pp. 1–26, 2020, doi: 10.3390/cancers12102922.
- [79] G. Chen, T. Zhou, Y. Li, Z. Yu, and L. Sun, “p53 target miR-29c-3p suppresses colon cancer cell invasion and migration through inhibition of PHLDB2,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 487, no. 1, pp. 90–95, 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.023.
- [80] “Unidirectional.” <https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index.jsp#r> (accessed Sep. 29, 2023).
- [81] H. Wang *et al.*, “MiR-30a-3p suppresses the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by downregulating CNPY2,” *Oncol. Rep.*, vol. 43, no. 2, pp. 646–654, 2020, doi: 10.3892/or.2019.7423.
- [82] Y. Chen *et al.*, “MiR-30a-3p inhibits renal cancer cell invasion and metastasis through targeting ATG12,” *Transl. Androl. Urol.*, vol. 9, no. 2, pp. 646–653, 2020, doi: 10.21037/tau.2019.12.10.
- [83] M. A. Gholampour, M. Asadi, M. Naderi, A. Azarkeivan, M. Soleimani, and A. Atashi, “miR-30a regulates  $\gamma$ -globin expression in erythroid precursors of intermedia thalassemia through targeting BCL11A,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, no. 5, pp. 3909–3918, 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05483-7.
- [84] A. Piccin *et al.*, “Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment,” *Eur. J. Haematol.*, vol. 102, no. 4, pp. 319–330, 2019, doi: 10.1111/ejh.13212.
- [85] G. J. Kato *et al.*, “Sickle cell disease,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 4, pp. 1–22, 2018, doi: 10.1038/nrdp.2018.10.
- [86] P. Zúñiga *et al.*, “Enfermedad de células falciformes: Un diagnóstico para tener presente Sickle cell disease: a diagnosis to keep in mind,” *Soc. Chil. Pediatr.*, vol. 89, no. 4, pp. 525–529, 2018, [Online]. Available: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v89n4/0370-4106-rcp-00604.pdf>
- [87] E. M. Novelli and M. T. Gladwin, “Crises in sickle cell disease,” *Chest*, vol. 149, no. 4, pp. 1082–1093, 2016, doi: 10.1016/j.chest.2015.12.016.
- [88] S. A. AlRyalat, M. Nawaiseh, B. Aladwan, A. Roto, Z. Alessa, and A. Al-Omar, “Ocular Manifestations of Sickle Cell Disease: Signs, Symptoms and Complications,” *Ophthalmic Epidemiol.*, vol. 27, no. 4, pp. 259–264, 2020, doi: 10.1080/09286586.2020.1723114.
- [89] M. Meremikwu, “Sickle cell disease.,” *Clin. Evid. (Online)*, no. 15, pp. 45–59, 2006.
- [90] S. Kapoor, J. A. Little, and L. H. Pecker, “Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 93, no. 12, pp. 1810–1824, 2018, doi: 10.1016/j.mayocp.2018.08.001.
- [91] G. Salinas Cisneros and S. L. Thein, “Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease,” *Front. Physiol.*, vol. 11, no. May, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00435.
- [92] B. S. Pace, A. Starlard-Davenport, and A. Kutlar, “Sickle cell disease: progress towards combination drug therapy,” *Br. J. Haematol.*, vol. 194, no. 2, pp. 240–251, 2021, doi: 10.1111/bjh.17312.
- [93] P. Germino-Watnick, M. Hinds, A. Le, R. Chu, X. Liu, and N. Uchida, “Hematopoietic Stem Cell Gene-Addition/Editing Therapy in Sickle Cell Disease,” *Cells*, vol. 11, no. 11, pp. 1–31, 2022, doi: 10.3390/cells11111843.
- [94] Y. Ikawa, A. Miccio, E. Magrin, J. L. Kwiatkowski, S. Rivella, and M. Cavazzana, “Gene therapy of hemoglobinopathies: Progress and future challenges,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 28, no. R1, pp. R24–R30, 2019, doi: 10.1093/hmg/ddz172.
- [95] M. Cavazzana and F. Mavilio, “Gene Therapy for Hemoglobinopathies,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 29, no. 10, pp. 1106–1113, 2018, doi: 10.1089/hum.2018.122.
- [96] C. Brendel and D. A. Williams, “Current and future gene therapies for hemoglobinopathies,” *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 27, no. 3, pp. 149–154, 2020, doi: 10.1097/MOH.0000000000000581.
- [97] E. de Dreuzy, K. Bhukhai, P. Leboulch, and E. Payen, “Current and future alternative therapies for beta-

- thalassemia major,” *Biomed. J.*, vol. 39, no. 1, pp. 24–38, 2016, doi: 10.1016/j.bj.2015.10.001.
- [98] N. Y. H. Ng and C. H. Ko, “Natural Remedies for the Treatment of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Anemia—Current Status and Perspectives in Fetal Hemoglobin Reactivation,” *Int. Sch. Res. Not.*, vol. 2014, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1155/2014/123257.
- [99] R. E. Ware, M. de Montalembert, L. Tshilolo, and M. R. Abboud, “Sickle cell disease,” *Lancet*, vol. 390, no. 10091, pp. 311–323, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9.
- [100] G. E. Linder and S. T. Chou, “Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease ABSTRACT Correspondence :,” *Haematologica*, vol. 106, no. 7, pp. 10–15, 2021.
- [101] R. J. Adams *et al.*, “Prevention of a First Stroke by Transfusions in Children with Sickle Cell Anemia and Abnormal Results on Transcranial Doppler Ultrasonography,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 1, pp. 5–11, 1998, doi: 10.1056/nejm199807023390102.
- [102] E. Drasar *et al.*, “Blood transfusion usage among adults with sickle cell disease - a single institution experience over ten years,” *Br. J. Haematol.*, vol. 152, no. 6, pp. 766–770, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08451.x.
- [103] J. Howard, “Sickle cell disease: When and how to transfuse,” *Hematol. (United States)*, vol. 2016, no. 1, pp. 625–631, 2016, doi: 10.1182/asheducation-2016.1.625.
- [104] G. Onimoe and S. Rotz, “Sickle cell disease: A primary care update,” *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 87, no. 1, pp. 19–27, Jan. 2020, doi: 10.3949/CCJM.87A.18051.
- [105] J. Old, *Hemoglobinopathies and Thalassemias*. Elsevier Ltd, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-383834-6.00075-6.
- [106] G. Galarneau, C. D. Palmer, V. G. Sankaran, S. H. Orkin, J. N. Hirschhorn, and G. Lettre, “Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation,” *Nat. Genet.*, vol. 42, no. 12, pp. 1049–1051, 2010, doi: 10.1038/ng.707.
- [107] I. Rahimmanesh *et al.*, “Gene Editing-Based Technologies for Beta-hemoglobinopathies Treatment,” *Biology (Basel)*, vol. 11, no. 6, pp. 1–19, 2022, doi: 10.3390/biology11060862.
- [108] C. Antwi-Boasiako *et al.*, “Sickle Cell Disease: Reappraisal of the Role of Foetal Haemoglobin Levels in the Frequency of Vaso-Occlusive Crisis,” *Ghana Med. J.*, vol. 49, no. 2, pp. 102–106, 2015, doi: 10.4314/gmj.v49i2.7.
- [109] N. A. Imaga, “Phytomedicines and nutraceuticals: Alternative therapeutics for sickle cell anemia,” *Sci. World J.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/269659.
- [110] J. WATSON, “The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants,” *The American journal of the medical sciences*, vol. 215, no. 4, pp. 419–423, 1948. doi: 10.1097/0000441-194804000-00008.
- [111] B. S. Pace, S. F. Ofori-Acquah, and K. R. Peterson, “Sickle cell disease: Genetics, cellular and molecular mechanisms, and therapies,” *Anemia*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/143594.
- [112] S. Kapor, V. Čokić, and J. F. Santibanez, “Mechanisms of Hydroxyurea-Induced Cellular Senescence: An Oxidative Stress Connection?,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/7753857.
- [113] “FDA approves hydroxyurea for treatment of pediatric patients with sickle cell anemia | FDA.” <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-hydroxyurea-treatment-pediatric-patients-sickle-cell-anemia> (accessed Sep. 09, 2023).
- [114] “Hydroxyurea Toxicity - StatPearls - NCBI Bookshelf.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537209/> (accessed Sep. 09, 2023).
- [115] L. Tshilolo *et al.*, “Hydroxyurea for Children with Sickle Cell Anemia in Sub-Saharan Africa,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 2, pp. 121–131, 2019, doi: 10.1056/nejmoa1813598.
- [116] A. Malato, E. Rossi, G. A. Palumbo, P. Guglielmelli, and N. Pugliese, “Drug-related cutaneous adverse events in philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: A literature review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 11, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/ijms21113900.
- [117] M. W. Musiałek and D. Rybaczek, “Hydroxyurea—the good, the bad and the ugly,” *Genes (Basel)*, vol. 12, no. 7, 2021, doi: 10.3390/genes12071096.
- [118] B. L. Kroner *et al.*, “Pregnancy outcomes with hydroxyurea use in women with sickle cell disease,” *Am. J. Hematol.*, vol. 97, no. 5, pp. 603–612, 2022, doi: 10.1002/ajh.26495.
- [119] S. U. Abdullahi *et al.*, “Hydroxyurea for secondary stroke prevention in children with sickle cell anemia in Nigeria: a randomized controlled trial,” *Blood*, vol. 141, no. 8, pp. 825–834, 2023, doi: 10.1182/blood.2022016620.
- [120] A. Power-Hays and R. E. Ware, “Effective use of hydroxyurea for sickle cell anemia in low-resource countries,” *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 27, no. 3, pp. 172–180, 2020, doi: 10.1097/MOH.0000000000000582.
- [121] L. Joseph *et al.*, “Effect of hydroxyurea exposure before puberty on sperm parameters in males with sickle cell disease,” *Blood*, vol. 137, no. 6, pp. 826–829, 2021, doi: 10.1182/blood.2020006270.
- [122] N. Bianchi, C. Zuccato, I. Lampronti, M. Borgatti, and R. Gambari, “Fetal hemoglobin inducers from the

- natural world: A novel approach for identification of drugs for the treatment of  $\beta$ -thalassemia and Sickle-cell anemia,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 6, no. 2, pp. 141–151, 2009, doi: 10.1093/ecam/nem139.
- [123] A. Kukreja, N. Wadhwa, and A. Tiwari, “Therapeutic role of natural agents in beta-thalassemia: A review,” *J. Pharm. Res.*, vol. 6, no. 9, pp. 954–959, 2013, doi: 10.1016/j.jopr.2013.10.002.
- [124] N. Gogna, N. Hamid, and K. Dorai, “Metabolomic profiling of the phytochemical constituents of *Carica papaya* L. leaves and seeds by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 115, pp. 74–85, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.06.035.
- [125] T. T. T. Nguyen, P. N. Shaw, M. O. Parat, and A. K. Hewavitharana, “Anticancer activity of *Carica papaya*: A review,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 153–164, 2013, doi: 10.1002/mnfr.201200388.
- [126] “*Carica papaya* L (Papaya leaves/പപ്പാണി ഇலை) Powder - Herb Square.” <https://www.herbsquare.in/shop/herbal-powder/carica-papaya-l-papaya-leaves-powder/> (accessed Sep. 11, 2023).
- [127] “Ripe Papaya, Pawpaw Or Tree Melon (*Carica Papaya* L) Which Rich In Betacarotene, Vitamin C, Fiber And Papine Enzyme. Stock Photo, Picture and Royalty Free Image. Image 58336296.” [https://www.123rf.com/photo\\_58336296\\_ripe-papaya-pawpaw-or-tree-melon-carica-papaya-l-which-rich-in-betacarotene-vitamin-c-fiber-and.html](https://www.123rf.com/photo_58336296_ripe-papaya-pawpaw-or-tree-melon-carica-papaya-l-which-rich-in-betacarotene-vitamin-c-fiber-and.html) (accessed Sep. 11, 2023).
- [128] T. Julianti *et al.*, “HPLC-based activity profiling for antiplasmodial compounds in the traditional Indonesian medicinal plant *Carica papaya* L,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 155, no. 1, pp. 426–434, 2014, doi: 10.1016/j.jep.2014.05.050.
- [129] A. Nugroho, H. Heryani, J. S. Choi, and H. J. Park, “Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 7, no. 3, pp. 208–213, 2017, doi: 10.1016/j.apjtb.2016.12.009.
- [130] N. O. a Imaga *et al.*, “Antisickling property of *Carica papaya* leaf extract,” *African J. Biochem. Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 102–106, 2009, [Online]. Available: <http://www.academicjournals.org/AJBR>
- [131] Q. V. Vuong, S. Hirun, P. D. Roach, M. C. Bowyer, P. A. Phillips, and C. J. Scarlett, “Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts,” *J. Herb. Med.*, vol. 3, no. 3, pp. 104–111, 2013, doi: 10.1016/j.hermed.2013.04.004.
- [132] S. P. Singh *et al.*, “Therapeutic application of *Carica papaya* leaf extract in the management of human diseases,” *DARU, J. Pharm. Sci.*, vol. 28, no. 2, pp. 735–744, 2020, doi: 10.1007/s40199-020-00348-7.
- [133] A. Adetayo, M. Adetayo, O. Shokunbi, and A. Oyelese, “In-vitro antisickling and sickling-reversal activities of *Carica papaya* fruit at different stages of ripening,” *Babcock Univ. Med. J.*, vol. 3, no. 2, pp. 10–18, 2020, doi: 10.38029/bumj.v3i2.38.
- [134] “CELL CULTURE BASICS Handbook”.
- [135] Sigma-Aldrich Co. LLC, “Fundamental techniques in cell culture 3,” *Sigma Aldrich*, p. 80, 2016, [Online]. Available: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf)
- [136] “Table of Contents / Содержание,” *J. Lang. Relatsh.*, vol. 12, no. 1, pp. vii–viii, 2020, doi: 10.31826/jlr-2015-120101.
- [137] B. B. Lozzio and C. B. Lozzio, “Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia,” *Int. J. Cancer*, vol. 19, no. 1, p. 136, 1977, doi: 10.1002/ijc.2910190119.
- [138] B. Carmen and B. Lozzio, “Human With Chronic Positive,” vol. 45, no. 3, pp. 321–334, 1975.
- [139] A. Delgado-Cañedo, J. A. B. Chies, and N. B. Nardi, “Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells - A model based on iron availability signalling,” *Med. Hypotheses*, vol. 65, no. 5, pp. 932–936, 2005, doi: 10.1016/j.mehy.2005.02.046.
- [140] “-Detailed Information [JCRB1402]-” [https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1402](https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1402) (accessed Sep. 15, 2023).
- [141] T. Okamoto and S. Okabe, “Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 657–659, 2000, doi: 10.3892/ijmm.5.6.657.
- [142] C.-H. Shen, “Detection and Analysis of Nucleic Acids,” *Diagnostic Mol. Biol.*, pp. 167–185, 2019, doi: 10.1016/b978-0-12-802823-0.00007-9.
- [143] ThermoScientific, “NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity,” *Protoc. Prod. Manuals*, pp. 1–2, 2011, [Online]. Available: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- [144] T. Forum, “qPCR efficiency calculations,” *Biotechniques*, vol. 51, no. 6, pp. 401–402, 2011, doi: 10.2144/000113776.
- [145] D. Svec, A. Tichopad, V. Novosadova, M. W. Pfaffl, and M. Kubista, “How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments,” *Biomol. Detect.*

- Quantif.*, vol. 3, pp. 9–16, 2015, doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005.
- [146] M. Hariono *et al.*, “The future of carica papaya leaf extract as an herbal medicine product,” *Molecules*, vol. 26, no. 22, 2021, doi: 10.3390/molecules26226922.
- [147] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [148] R. Sanders, D. J. Mason, C. A. Foy, and J. F. Huggett, “Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 26, pp. 6471–6483, 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7857-x.
- [149] J. Schwaber, S. Andersen, and L. Nielsen, “Shedding light: The importance of reverse transcription efficiency standards in data interpretation,” *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 17, no. February, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1016/j.bdq.2018.12.002.
- [150] M. Cavazzana, C. Antoniani, and A. Miccio, “Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies,” *Mol. Ther.*, vol. 25, no. 5, pp. 1142–1154, 2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.024.
- [151] D. Costa, M. Capuano, L. Sommese, and C. Napoli, “Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies,” *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 55, no. 2, pp. 95–100, 2015, doi: 10.1016/j.bcmd.2015.05.004.
- [152] H. Wu *et al.*, “miR-29c-3p regulates DNMT3B and LATS1 methylation to inhibit tumor progression in hepatocellular carcinoma,” *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 2, 2019, doi: 10.1038/s41419-018-1281-7.
- [153] C. Miao, H. Yu, J. Chang, G. Zhang, G. Zhou, and C. Zhao, “miR-148b-3p affects the pathogenesis of adjuvant-induced arthritis rats through the direct target DNMT1,” *Autoimmunity*, vol. 51, no. 2, pp. 43–52, 2018, doi: 10.1080/08916934.2018.1442441.
- [154] R. Chen, X. Ma, and L. Zhang, “MicorRNA-148b inhibits cell proliferation and facilitates cell apoptosis by regulating DNA Methyltransferase 1 in endometrial cancer,” *Transl. Cancer Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 1100–1112, 2020, doi: 10.21037/tcr.2019.12.79.
- [155] V. G. Sankaran *et al.*, “Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. Sankaran, V. G., Menne, T. F., Xu, J., Akie, T. E., Lettre, G., Van Handel, B., ... Orkin, S. H. (2008). Human fetal hemoglobin expression is regulated by th,” *Science*, vol. 322, no. 5909, pp. 1839–42, 2008, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056937>
- [156] S. Malainho, C. Orientadores, and R. M. Duque, “Efeitos dos extratos de Carica papaya na regulação transcricional e pós-transcricional da hemoglobina fetal,” 2022.
- [157] T. Oduola, T. O. Idowu, I. S. Bello, F. A. Adeniyi, and E. O. Ogunyemi, “Haematological response to intake of unripe Carica papaya fruit extract and the isolation and characterization of caricapinoside: A new antisickling agent from the extract,” *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 5, no. SUPPL. 3, pp. 77–81, 2012.
- [158] G. C. S. Carrocini, L. S. Ondei, P. J. A. Zamaro, and C. R. Bonini-Domingos, “Evaluation of HPFH and  $\delta\beta$ -thalassemia mutations in a Brazilian group with high Hb F levels,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 3213–3219, 2011, doi: 10.4238/2011.December.21.3.
- [159] K. Trakarnsanga *et al.*, “An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May 2016, 2017, doi: 10.1038/ncomms14750.
- [160] E. Asians, “etters to the E ; ditor,” vol. 9, no. 6, pp. 898–900, 2012.
- [161] L. Garibyan and N. Avashia, “Polymerase chain reaction,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 3, pp. 1–4, 2013, doi: 10.1038/jid.2013.1.
- [162] J. Schacht, “Biochemical Basis of Polymerase Chain Reaction,” *Polym. Chain React.*, vol. 26, no. 5, pp. 243–250, 1993.
- [163] S. A. Bustin, V. Benes, T. Nolan, and M. W. Pfaffl, “Quantitative real-time RT-PCR - A perspective,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 34, no. 3, pp. 597–601, 2005, doi: 10.1677/jme.1.01755.
- [164] F. Postollec, H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson, and D. Sohier, “Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology,” *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 5, pp. 848–861, 2011, doi: 10.1016/j.fm.2011.02.008.
- [165] M. A. Hoy, *DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction*. 2013. doi: 10.1016/b978-0-12-415874-0.00008-1.
- [166] J. Nestorov, G. Matić, I. Elaković, and N. Tanić, “Gene expression studies: How to obtain accurate and reliable data by quantitative real-time RT PCR,” *J. Med. Biochem.*, vol. 32, no. 4, pp. 325–338, 2013, doi: 10.2478/jomb-2014-0001.

### Anexo 1: Descongelamento celular

#### Procedimento

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

## **Anexo 2: Passagem de células em suspensão**

### Procedimento

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

## **Anexo 3: Criopreservação**

### Procedimento

1. Examinar a cultura para verificar a ausência de contaminação, crescimento saudável, confluência, etc.
2. Se congelar as células aderentes, remover usando tripsina 0,25% durante 1 a 3 minutos a 37°C.
3. Efetuar uma contagem de células para determinar o número total de células viáveis.
4. Centrifugar as células a 600 a 800 rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante.
5. Resuspender suavemente as células num volume apropriado de Cellvation™ numa concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml.
6. Dispensar a suspensão celular em alíquotas de 1 a 2 ml em ampolas de plástico ou de vidro.
7. Selar as ampolas e armazenar à temperatura ambiente durante 30 minutos com uma agitação ocasional e suave para expor as células completamente ao criopreservante.
8. Colocar as ampolas num recipiente isolado e armazenar num congelador a -20°C durante uma hora. Remover o isolamento e transferir para um congelador a -80°C durante um dia. Criopreservar, se possível, em azoto líquido.

## Anexo 4: Contagem de células com azul tripano

### Procedimento

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

$$\begin{aligned} \text{Contagem de células viáveis (cells/mL)} &= \\ &= \frac{\text{Número de células viáveis em cada quadrante}}{\text{Número de quadrantes com células viáveis}} \times \text{Fator de diluição (2)} \times 10^4 * \end{aligned}$$

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

$$\text{Percentagem de viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número total de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

## **Anexo 5: Ensaio de viabilidade celular CellTiter-Blue**

### Procedimento

1. Montar placas de ensaio de 96 poços contendo células em meio de cultura;
2. Adicionar os compostos de ensaio e controlos aos poços apropriados para que o volume final seja de 100µL em cada poço;
3. Incubar 24 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>;
4. Descongelar o Reagente CellTiter-Blue® à temperatura ambiente. Pode ser utilizado um banho de água a 37°C para descongelar o reagente e proteger o Reagente CellTiter-Blue® da luz direta;
5. Remover placas de ensaio da incubadora e adicionar 20µL/poço do reagente CellTiter-Blue;
6. Agitar durante 10 segundos;
7. Incubar durante 1-4 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>;
8. Agitar a placa durante 10 segundos e registar fluorescência a 560/590 nm.

### Procedimento adaptado de:

Promega Cooperation, “CellTiter-Blue Assay Protocol, TB317,” *Tech. Bull.*, p. 16, 2016.

## **Anexo 6: Ensaio de citotoxicidade não-radioativo CytoTox 96**

### Procedimento:

1. Montar placas de ensaio de 96 poços contendo células em meio de cultura.
2. Adicionar compostos de ensaio e controlos aos poços apropriados para que o volume final seja de 100µl em cada poço.
3. Incubar as células a 37°C durante 24 horas.
4. Opcional: Se a Solução de Lise for utilizada para gerar um Controlo de Libertação de LDH máximo, adicionar 10µl de Solução de Lise 10X (por 100µl volume original) aos poços de controlo positivo 45 minutos antes de adicionar o Reagente CytoTox 96®.
5. Transferir 50µl de todos os poços de teste e de controlo para uma nova placa de fundo transparente de 96 poços.
6. Adicionar 50µl do Reagente CytoTox 96® a cada poço de amostra. Cobrir a placa com folha ou uma caixa opaca para a proteger da luz e incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Acrescentar 50µl de Stop Solution a cada poço da placa de 96 poços.
8. Rebentar quaisquer bolhas grandes usando uma agulha de seringa, e registar a absorvância a 490 nm ou 492 nm após 1 hora de adicionar a Solução Stop.

### Cálculo dos resultados

1. Subtrair os valores médios do fundo do meio de cultura de todos os valores dos poços experimentais.
2. Utilizar os valores corrigidos na seguinte fórmula para calcular a percentagem de citotoxicidade:

$$\text{Percentagem de citotoxicidade(\%)} = 100 \times \frac{\text{Libertação experimental de LDH (OD}_{490})}{\text{Libertação máxima de LDH (OD}_{490})}$$

### Procedimento adaptado de:

Promega Corporation, "CytoTox 96(R) Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin, TB163," pp. 1–11, 2010.

## Anexo 7: Extração de RNA

### Procedimento:

1. Descongelar as amostras celulares e centrifugar durante 5 minutos a 300 x g numa centrifuga e retirar todo sobrenadante.
2. Adicionar 700 µL de *QIAzol Lysis Reagent* e vortexar durante 1 minuto para homogeneizar.
3. Colocar o tubo homogeneizado à temperatura ambiente (15°C – 25°C) durante 5 minutos.
4. Adicionar 140 µL de **Clorofórmio** no tubo que contém o homogeneizado e fechar bem a tampa. De seguida, agitar vigorosamente o tubo por 15 segundos.
5. Repousar o tubo na bancada à temperatura ambiente entre 2 a 3 minutos.
6. Centrifugar a 1100 x g a 4°C durante 15 minutos. O volume da fase aquosa será aproximadamente 400 µL.
7. Transferir a fase aquosa para um novo tubo coletor. Adicionar 600 µL de etanol a 100% e misturar cuidadosamente com uma pipeta, sem centrifugar.
8. Pipetar até 700 µL da amostra, incluindo qualquer precipitado que se tenha formado, para uma coluna *RNeasy Mini spin* acoplada a um tubo coletor de 2 mL. Centrifugar a  $\geq 10,000$  rpm por 1 minuto à temperatura ambiente e descartar o filtrado. Reutilizar o tubo para o passo 9.
9. Repetir o passo 8 usando a amostra restante. Voltar a descartar o filtrado e reutilizar o tubo para o passo 10.
10. Adicionar 700 µL do *Buffer RWT* na coluna *RNeasy Mini spin*. Fechar a tampa e centrifugar a  $\geq 10,000$  rpm durante 1 minuto para lavar a coluna. Descartar o filtrado e reutilizar o tubo para o passo 11.
11. Pipetar 500 µL do *Buffer RPE* à coluna *RNeasy Mini spin*. Fechar a tampa e centrifugar a  $\geq 10,000$  rpm durante 1 minuto, descartar o filtrado e reutilizar o tubo para o passo 12.
12. Repetir a lavagem com 500 µL de *Buffer RPE* na coluna *RNeasy Mini spin*. Fechar a tampa e centrifugar durante 2 minutos a  $\geq 10,000$  rpm para secar a membrana da coluna. Descartar o filtrado.
13. Centrifugar à velocidade máxima durante 1 minuto para remover restos de tampão.
14. Transferir a *RNeasy Mini spin column* para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Adicionar 40 µL de *RNase-free water* diretamente na membrana da *RNeasy Mini spin column*. Fechar a tampa e centrifugar 1 minuto a  $\geq 10,000$  rpm para eluir o RNA.
15. Guardar o RNA a -80°C.

### Procedimento adaptado de:

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

## Anexo 8: Reação síntese de cDNA (estudo miRNAs)

### Procedimento:

1. Manter os reagentes e reações no gelo (4°C);
2. Ajustar cada uma das amostras de RNA do template para uma concentração de 6 ng/μL utilizando nuclease free water;
3. Preparar os reagentes conforme a **Tabela 9.1**;
4. Configurar a reação de transcriptase reversa (3,3 μL de amostra + 6,7 μL de master mix);

**Tabela 9.1** – Volumes dos reagentes utilizados na reação síntese de cDNA.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (μL)</b>
5X miRCURY SYBR Green RT reaction Buffer	2
RNase-free water	3,2
10 x miRCURY RT Enzyme Mix	1
UniSP6 RNA Spike-in	0,5
Template RNA	3,3

\*no kit recomenda-se adicionar 1 μL de spike-in sintético (10<sup>8</sup> cópias/μL) a 20 ng de RNA

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

### Procedimento adaptado de:

Qiagen, “Sample to Insight: miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR Handbook For highly sensitive, real-time RT-PCR detection of miRNAs using SYBR® Green,” no. October, 2019.

---

**Apêndice I: Quantificação de RNA**
**Tabela 10.1** – Resultados da quantificação do RNA presente nas amostras celulares.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/μL)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
<b>EM 0,05 A</b>	203.232	2.006	1.208
<b>EM 0,05 B</b>	292.639	1.983	1.382
<b>EM 0,05 C</b>	202.393	2.03	1.105
<b>EM 0,5 A</b>	274.48	2.059	1.537
<b>EM 0,5 B</b>	279.854	2.059	1.279
<b>EM 0,5 C</b>	329.473	1.993	1.557
<b>EM 5 A</b>	303.884	2.063	2.164
<b>EM 5 B</b>	231.95	2.007	0.865
<b>EM 5 C</b>	288.399	2.03	1.778
<b>EA 0,05 A</b>	320.576	2.022	1.581
<b>EA 0,05 B</b>	236.282	2.054	2.125
<b>EA 0,05 C</b>	295.674	2.014	1.676
<b>EA 0,5 A</b>	297.189	1.902	1.085
<b>EA 0,5 B</b>	266.541	2.06	1.337
<b>EA 0,5 C</b>	182.98	2.036	0.807
<b>EA 5 A</b>	171.155	2.056	0.629
<b>EA 5 B</b>	166.154	2.044	1.143
<b>EA 5 C</b>	206.836	2.054	1.231
<b>HU A</b>	254.756	1.995	1.203
<b>HU B</b>	213.432	2.065	1.461
<b>HU C</b>	247.776	2.063	1.888
<b>CN A</b>	268.374	2.066	2.185
<b>CN B</b>	244.003	2.066	2
<b>CN C</b>	266.838	2.065	2.068

## Apêndice II: Reação de síntese de cDNA SuperScript™ IV First-Strand

### Procedimento:

O exemplo de procedimento seguinte mostra os volumes adequados para uma única reação de transcrição reversa de 20 µL. Para reações múltiplas, preparar uma mistura principal de componentes comuns a todas as reações para minimizar o erro de pipetagem e, em seguida, dispensar os volumes adequados em cada tubo de reação antes de adicionar o RNA modelo e os primers recozidos.

1. Num tubo de PCR combinou-se os seguintes componentes.

**Tabela 10.2** – Volumes dos reagentes utilizados na reação

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

2. Misturar e centrifugar os componentes de forma a homogeneizar todos os constituintes.
3. Colocar no termociclador *Bio-Rad iCycler*® durante 5 minutos a 65°C. Incubar em gelo durante 1 minuto.
4. De seguida, vortexar e centrifugar o 5 x SSIV Buffer.
5. Combinar, num tubo, os componentes da tabela abaixo.

**Tabela 10.3** - Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação

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

6. Fechar o tubo e misturar os componentes e centrifugar.

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

A técnica de reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de biologia molecular amplamente utilizada para amplificar sequências de DNA específicas. Foi desenvolvida pela primeira vez por Kary Mullins em 1983 [161].

Esta técnica é fundamental em diversos procedimentos utilizados em testes e investigação genética. Baseia-se num processo cíclico que envolve aquecimento e arrefecimento para fazer cópias de um fragmento específico de DNA. Este processo permite a síntese de fragmentos de DNA através da enzima DNA polimerase. Além disso, estão também envolvidos componentes como Desoxirribonucleotídeos Fosfatos (dNTPs), primers específicos (forward e reverse) e ainda os fragmentos de DNA ou cDNA que se pretende amplificar [161].

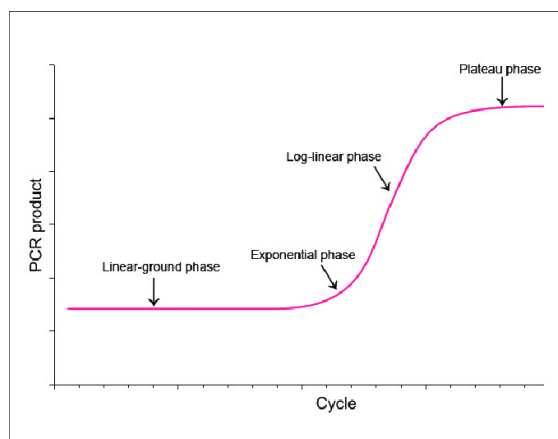
As temperaturas e o período de tempo durante o qual são aplicadas em cada ciclo dependem de uma variedade de parâmetros, incluindo a enzima utilizada, a concentração de iões bivalentes e dNTPs na reação e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos primers [161], [162].

Os passos individuais comuns à maioria dos métodos de PCR são os seguintes: a fase de desnaturação (separação das cadeias), *annealing* (união dos primers) e extensão (síntese de novas cadeias) [162].

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) distingue-se do PCR convencional pela sua capacidade de análise quantitativa. Deteta e quantifica a quantidade de DNA ou RNA presente em ciclos de amplificação sucessivos [163]. Esta metodologia analítica torna o qPCR adequado a aplicações que implicam a quantificação do conteúdo de ácidos nucleicos, incluindo a caracterização da expressão genética e a deteção precisa dos níveis de DNA ou RNA [164].

A técnica de qPCR utiliza marcadores fluorescentes (por exemplo, o SYBR Green) [163] ou sondas marcadas com fluorescência (por exemplo, sondas TaqMan) que se ligam à molécula de DNA ou RNA [165]. Durante a reação de qPCR, as moléculas de DNA ou RNA são amplificadas em ciclos, tal como na PCR convencional. No entanto, o que distingue a qPCR é o facto de monitorizar e quantificar continuamente o processo de amplificação em tempo real [163] [164].

O ponto em que o sinal de fluorescência atravessa um nível de limiar predeterminado é conhecido como Ciclo de Limiar (Ct) ou Quantificação de Ciclo (Cq). O valor Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do DNA ou RNA alvo: quanto mais baixo for o valor Ct, mais elevada é a quantidade inicial do alvo [164].



**Figura 10.1** - Fases da curva de amplificação do qPCR.

(inicial, exponencial, linear e plateau) da quantidade relativa de fluorescência emitida em função do número de ciclos. O ciclo de quantificação (Cq) representa o número de ciclos necessários para que o final fluorescente seja superior à fluorescência de fundo, sendo inversamente proporcional à quantidade de amostra inicial. Adaptado de [166].

É uma técnica altamente sensível e pode detetar baixos níveis de ácidos nucleicos, proporciona uma quantificação exata, tornando-a adequada para medições precisas. A monitorização em tempo real permite a aquisição rápida de dados, pode cobrir uma ampla gama dinâmica de quantidades alvo e oferece uma excelente especificidade devido à utilização de primers e sondas específicos [165].

#### Preparação da mistura de reação (estudo dos genes):

1. Preparou-se a mistura conforme descrito na **Tabela 10.4** para a amplificação de cada gene colocaram-se todos os componentes, à exceção do RNA na mistura de reação. Como controlo positivo utilizou-se água (NTC – No Template Control) de modo a validar os resultados.

**Tabela 10.4** – Reagentes utilizados na reação de RT-qPCR para análise dos genes

Reagentes	Volume (µL)
One-Step NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)	10
10 µM forward primer	0,8
10 µM reverse primer	0,8
NZYRT mix	0,8
Nuclease-free water	2,6
Template	5
Volume total	20

**Tabela 10.5** – Condições de amplificação da reação de RT-qPCR

Ciclos	Fase	Temperatura(°C)	Tempos
1	Transcriptase reversa	50	20 minutos
1	Ativação da polimerase	95	5 minutos
40	Desnaturação	95	10 segundos
	Annealing	60	30 segundos

#### Preparação da mistura de reação (miRNAs):

1. Diluíram-se as amostras de cDNA (1:40) em nuclease free water e centrifugaram-se os tubos;
2. Preparou-se a mistura conforme descrito na **Tabela 10.6**. Para a amplificação de cada miRNA colocaram-se todos os componentes, à exceção do cDNA na mistura de reação;

**Tabela 10.6** – Reagentes usados na reação de RT-qPCR (miRNAs)

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5
PCR primer mix	1
Template de cDNA diluído	4
Volume final	10

**Tabela 10.7** – Condições de amplificação da reação de RT-qPCR (miRNAs)

<b>Ciclos</b>	<b>Fase</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempos</b>
1	Desnaturação	95	10 minutos
50	Amplificação	95	10 segundo
		60	1 minuto