



Perfil de expressão diferencial de moléculas reguladoras chave após exposição a extratos de *Carica papaya*

ISA INÊS DE SÁ DINIS E SILVA VITORINO
(Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutora Anita Raquel Quintal Gomes
Doutor Rui Miguel Duque Brito

Júri:

Presidente: Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado

Vogais:

Doutor Rui Miguel Duque Brito
Doutora Noélia Maria Fernandes Custódio

**Perfil de expressão diferencial de moléculas
reguladoras chave após exposição a extratos de
*Carica papaya***

ISA INÊS DE SÁ DINIS E SILVA VITORINO
(Licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutora Anita Raquel Quintal Gomes, ESTeSL e H&TRC
Doutor Rui Miguel Duque Brito, ESTeSL e H&TRC

Júri:

Presidente: Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado, ISEL

Vogais:

Doutor Rui Miguel Duque Brito, ESTeSL e H&TRC
Doutora Noélia Maria Fernandes Custódio, Faculdade de
Medicina, Universidade de Lisboa

Julho de 2025



Perfil de expressão diferencial de moléculas reguladoras chave após exposição a extratos de *Carica papaya*

Isa Inês de Sá Dinis e Silva Vitorino

2025

Este projeto foi financiado pelo **Instituto Politécnico de Lisboa** para o projeto “Perfil de expressão diferencial de moléculas reguladoras chave após exposição a extratos de *Carica papaya*”, registado como IPL/IDI&CA2024/DifCaya_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 Duque Brito (ESTeSL) e da Professora Doutora Anita Raquel 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.

Agradecimentos

Pretendo expressar o meu agradecimento e reconhecimento a todos os que contribuíram para o meu percurso académico e realização deste Trabalho.

Aos meus orientadores de Trabalho Final de Mestrado, Professor Doutor Miguel Brito e Professora Doutora Anita Gomes, agradeço por me terem acolhido neste projeto e direcionado para a sua realização, mas, especialmente, por terem confiado em mim, no meu trabalho e dedicação, mesmo perante todas as adversidades, limitações e dificuldades acrescidas que exigi.

Aos Professores Doutores Edna Ribeiro, Mário Pádua, Mário Gomes e Carina Silva, agradeço pelos ensinamentos, auxílio e disponibilidade prestados para que a realização deste Trabalho fosse possível.

À Catarina Ginete, agradeço pela mestria na gestão de horários e tarefas laboratoriais, por todo o apoio profissional e emocional que prestou, pela paciência que teve e pelas risadas que partilhou.

À Catarina Pascoal, agradeço por se disponibilizar a fazer-me companhia e ajudar-me nas atividades laboratoriais.

Aos meus Professores, que me acompanharam ao longo de todo o percurso académico, não só aos que me ensinaram, mas também aos que me formaram. Gostaria de destacar, a quem guardo um enorme carinho e admiração: Professora Rosa, a minha professora primária; Professor Paulo Ramos, de português e sabedoria; Professor Osvaldo Henriques, de matemática e resiliência.

Às colegas de Licenciatura que levei para a vida, Filipa, Jéssica e Marina, agradeço por todos os desabafos ouvidos, por todos os abraços, por todas as chapadas de realidade, por todos os conselhos, por toda a confiança que me passaram e, principalmente, por serem minhas amigas.

À colega de Mestrado, Susana, agradeço por ser a minha alma gémea escolar, por me complementares e por te ter encontrado neste caminho.

À Família que me criou, agradeço por me terem dado tudo. À minha mãe, por me ter influenciado a gostar de estudar, por ter sido Mãe e Pai, por nunca deixar que me faltasse nada e por me permitir, a seu próprio custo, o privilégio de me licenciar. Ao meu

pai, por me despoletar o sonho da Engenharia. Aos meus irmãos, por me tornarem mais especial (e irritarem). À minha avó, que se mantém a rezar por nós e a ajudar com o que consegue.

À Família que criei, agradeço todos os dias por existir. Ao meu marido, por me incentivar a perseguir os meus sonhos, por me dar sempre o carinho que preciso, por assegurar todas as condições para que eu continue esta caminhada, por confiar em mim (mesmo sem acreditar) e por me apoiar nas minhas loucuras. À nossa filha, por nos ter escolhido e por não me deixar acabar este Mestrado sem ela.

Desejo ter estado à altura de todos vós e não vos desiludir.

Declaração de integridade

Declaro que este trabalho final de mestrado é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

O autor



Lisboa, 30 de Julho de 2025

Perfil de expressão diferencial de moléculas reguladoras chave após exposição a extratos de *Carica papaya*

Resumo

Introdução: As hemoglobinopatias, como a anemia falciforme, são doenças genéticas hereditárias com elevada prevalência mundial. A indução da hemoglobina fetal (HbF), por exemplo através de hidroxiureia (HU) tem sido uma abordagem terapêutica eficaz e associa-se a formas clínicas menos graves. Compostos naturais, como os presentes nas folhas de *Carica papaya*, têm despertado interesse como potenciais indutores de HbF, por mecanismos epigenéticos e transcricionais.

Objetivo: Avaliar o impacto da exposição a extratos aquosos de folhas de *Carica papaya* (EAFCP) na viabilidade celular e expressão de genes envolvidos na regulação da síntese de HbF, utilizando como modelo uma linha de células eritróides humanas.

Material e Métodos: Foram utilizadas células de linhagem K562, cultivadas e expostas a diferentes concentrações de EAFCP e a HU. Realizaram-se ensaios de viabilidade, proliferação e citotoxicidade, com azul de tripano, CellTiter-Blue® e CytoTox 96®. A expressão génica foi avaliada por RT-qPCR, com foco em genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), reguladores epigenéticos (*HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*) e transcricionais (*BCL11A* e *BGLT3*).

Resultados: O EAFCP não comprometeu a viabilidade celular nas concentrações testadas e apresentou baixa citotoxicidade, revelando ter efeitos citoestáticos na proliferação celular. A nível molecular, observou-se um aumento significativo na expressão dos genes *HBG1* e *HBG2*, associados à produção de HbF. Paralelamente, houve redução da expressão de genes inibidores da HbF, como *BCL11A*, *HDAC1* e *DNMT1*. Estes resultados sugerem que o extrato exerce um efeito indutor sobre a expressão de HbF através da modulação de vias epigenéticas e transcricionais.

Conclusão: Os extratos de *Carica papaya* demonstraram potencial para modular positivamente a expressão de HbF, sendo promissores como agentes complementares no tratamento de hemoglobinopatias. Estudos adicionais são necessários para validar estes efeitos em modelos *in vivo* e identificar os compostos bioativos responsáveis.

Palavras-chave: *Carica papaya*, hemoglobina fetal, expressão génica, epigenética, hemoglobinopatias.

Differential expression profile of key regulatory molecules after exposure to *Carica papaya* extracts

Abstract

Introduction: Hemoglobinopathies, such as sickle cell disease, are inherited genetic disorders with high global prevalence. The pharmacological induction of fetal hemoglobin (HbF), through compounds such as hydroxyurea (HU), is an effective therapeutic strategy and associated with milder clinical outcomes. Natural compounds found in *Carica papaya* leaves have shown potential to modulate HbF expression through epigenetic and transcriptional mechanisms.

Objective: To evaluate the impact of aqueous extracts of *Carica papaya* leaves (EAFCP) on cell viability and the expression of genes involved in the regulation of HbF synthesis using a human erythroid cell model.

Material and Methods: Human K562 erythroleukemic cells were cultured and exposed to different concentrations of EAFCP and to HU. Cell viability, proliferation, and cytotoxicity assays were performed with trypan blue, CellTiter-Blue® and CytoTox 96®. Gene expression was analyzed using RT-qPCR, targeting globin genes (*HBA*, *HBB*, *HBG1* and *HBG2*), epigenetic regulators (*HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3B*), and transcriptional regulators (*BCL11A* and *BGLT3*).

Results: EAFCP did not compromise cell viability at the tested concentrations and exhibited low cytotoxicity, revealing to have cytostatic effects on cell proliferation. RT-qPCR analysis revealed a significant increase in the expression of *HBG1* and *HBG2*, both associated with HbF production. Additionally, there was a downregulation of key repressors of HbF expression, including *BCL11A*, *HDAC1*, and *DNMT1*. These findings suggest that EAFCP may induce HbF expression through the modulation of epigenetic and transcriptional pathways.

Conclusion: *Carica papaya* leaf extracts demonstrated promising effects on the natural induction and modulation of fetal hemoglobin and may serve as complementary agents in the treatment of hemoglobinopathies. Further studies are needed to validate these results *in vivo* and to isolate the active bioactive compounds responsible for the observed gene modulation.

Keywords: *Carica papaya*, fetal hemoglobin, gene expression, epigenetics, hemoglobinopathies.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HEMOGLOBINA	1
1.1.1. HEMOGLOBINA FETAL	3
1.2. HEMOGLOBINOPATIAS	3
1.2.1. ANEMIA FALCIFORME	4
1.2.2. EPIDEMIOLOGIA	5
1.3. DIAGNÓSTICO	5
1.4. TERAPÊUTICAS	6
1.4.1. TRANSFUÇÃO DE SANGUE	7
1.4.2. TRANSPLANTE DE CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS	7
1.4.3. TERAPIA GÊNICA	8
1.4.4. INDUÇÃO FARMACOLÓGICA DE HbF	8
1.4.5. COMPOSTOS NATURAIS INDUTORES DE HbF	10
1.5. REGULAÇÃO MOLECULAR DA EXPRESSÃO DE HEMOGLOBINA	12
1.5.1. REGULAÇÃO EPIGENÉTICA	12
1.5.2. REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL / DE SINALIZAÇÃO	15
1.6. MODELOS CELULARES IN VITRO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO	22
2.2. OBJETIVOS GERAIS	22
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. FOLHAS DE <i>CARICA PAPAYA</i>	24
3.2. EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>CARICA PAPAYA</i>	24
3.3. CULTURA DE CÉLULAS	25
3.3.1. LINHAGEM K562	26
3.3.2. REAGENTES	26
3.3.3. MANUTENÇÃO E MANIPULAÇÃO	27
3.4. EXPOSIÇÃO CELULAR	27
3.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR, PROLIFERAÇÃO E CITOTOXICIDADE	29
3.5.1. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULARES COM AZUL DE TRIPANO	29
3.5.2. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULARES COM CELLTITER-BLUE	30
3.5.3. CITOTOXIDADE COM CYTOX 96	30
3.6. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA (RT)	31

3.7.	AMPLIFICAÇÃO POR QPCR	33
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS	36
4.	RESULTADOS	38
4.1.	VIABILIDADE CELULAR, PROLIFERAÇÃO E CITOTOXICIDADE	38
4.2.	EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO POR RT-QPCR	41
4.3.	EXPRESSÃO GÊNICA	42
4.3.1.	GLOBINAS.....	43
4.3.2.	SINALIZAÇÃO.....	46
4.3.3.	MODULADORES EPIGENÉTICOS	48
5.	DISCUSSÃO	57
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6.1.	CONCLUSÃO	69
6.2.	TRABALHO FUTURO	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8.	ANEXOS	95
	ANEXO I – PROTOCOLO DE CULTURA CELULAR (<i>H&TRC</i>)	95
	ANEXO II – ENSAIO CELLTITER-BLUE® (<i>PROMEGA COOPERATION</i>)	100
	ANEXO III – ENSAIO CYTOToX 96® (<i>PROMEGA COOPERATION</i>)	101
	ANEXO IV – EXTRAÇÃO DE RNA (<i>QIAGEN</i>)	102
	ANEXO V – REAÇÃO DE SÍNTESE DE CDNA (<i>NZYTECH</i>)	104
9.	APÊNDICES.....	107
	APÊNDICE I – QUANTIFICAÇÃO DE RNA E cDNA	107
	APÊNDICE II – FUNDAMENTO TEÓRICO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL E PROCEDIMENTO APLICADO	108

Índice de Figuras

FIGURA 1.1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS AGRUPAMENTOS GENÉTICOS DA A-GLOBINA E DA B-GLOBINA. ADAPTADO DE [18].	2
FIGURA 1.2 – ABORDAGENS TERAPÊUTICAS ATUAIS E FUTURAS PARA HEMOGLOBINOPATIAS.	6
FIGURA 1.3 – TIPOS DE REGULAÇÃO EPIGENÉTICA ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.	13
FIGURA 1.4 – REPRESSÃO DE HEMOGLOBINA FETAL POR REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL. ADAPTADO DE [130].	15
FIGURA 1.5 – ATIVAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL POR REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL. ADAPTADO DE [130].	16
FIGURA 3.1 – FOLHAS DE <i>CARICA PAPAYA</i> . (A) APÓS COLHEITA; (B) TRITURADAS NA BIMBY®; (C) ACONDICIONADAS EM TUBOS FALCON®.	24
FIGURA 3.2 – PREPARAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE Cp. (A) AGITAÇÃO MAGNÉTICA; (B) FILTRAÇÃO COM PAPEL DE FILTRO.	25
FIGURA 3.3.3 – CÂMARA DE FLUXO LAMINAR. (A) DURANTE PASSAGEM CELULAR; (B) IRRADIADA COM LUZ UV.	25
FIGURA 3.4 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO DAS PLACAS. (A) DUAS P6 PARA ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E EXTRAÇÃO DE RNA; (B) UMA P96 PARA ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (APRESENTAÇÃO PARCIAL); (C) UMA P96 PARA ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE (APRESENTAÇÃO PARCIAL).	28
FIGURA 3.5 – VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS, VIÁVEIS E INVIÁVEIS, NUMA CÂMARA DE <i>NEWBAUER</i> , COM RECURSO A MICROSCÓPIO INVERTIDO COM CONTRASTE DE FASE E AMPLIAÇÃO DE 20X.	29
FIGURA 4.1 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS K562.	39
FIGURA 4.2 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS K562.	39
FIGURA 4.3 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O ENSAIO CELLTITER-BLUE.	40
FIGURA 4.4 - AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O ENSAIO CYTOTox 96.	41
FIGURA 4.5 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HBA</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	43
FIGURA 4.6 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HBB</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	44
FIGURA 4.7 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HBG1</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	45
FIGURA 4.8 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HBG2</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	46
FIGURA 4.9 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>BCL11A</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	47
FIGURA 4.10 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>BGLT3</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	48
FIGURA 4.11 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HDAC1</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	49
FIGURA 4.12 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HDAC2</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i> .	50

FIGURA 4.13 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HDAC3</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i>	51
FIGURA 4.14 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>HDAC8</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i>	52
FIGURA 4.15 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>DNMT1</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i>	53
FIGURA 4.16 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>DNMT3A</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i>	54
FIGURA 4.17 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE EAFCP E HU NA EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>DNMT3B</i> EM CÉLULAS K562, DE ACORDO COM O GENE DE REFERÊNCIA <i>GAPDH</i>	55

Índice de Tabelas

TABELA 3.1 – SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE <i>MELTING</i> (T_m) DE CADA PRIMER UTILIZADO NA RT-QPCR.	33
TABELA 4.1 – EFICIÊNCIA DOS ENSAIOS RT-QPCR PARA CADA GENE EM ESTUDO.	42
TABELA 5.1 – VARIÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE CADA GENE, EM RELAÇÃO AO CONTROLO.	66
TABELA 8.1 – QUANTIDADE DE REAGENTES A UTILIZAR NO PASSO 1. NA REAÇÃO DE SÍNTESE DE cDNA.....	104
TABELA 8.2 – QUANTIDADE DE REAGENTES A UTILIZAR NO PASSO 4. NA REAÇÃO DE SÍNTESE DE cDNA.....	104
TABELA 9.1 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE RNA, EXTRAÍDO DE AMOSTRAS CELULARES.....	107
TABELA 9.2 – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DE cDNA EM AMOSTRA <i>POOL</i> , GERADO A PARTIR DE RNA.	107
TABELA 9.3 – QUANTIDADE DE REAGENTES A UTILIZAR NA REAÇÃO RT-QPCR, PARA CADA TRIPLICADO.	109
TABELA 9.4 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE RT-QPCR.	110

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AVC	Acidente vascular cerebral
BCL11A	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>
BGLT3	<i>Beta Globin Locus Transcript 3</i>
cDNA	DNA complementar
CO	Monóxido de carbono
Cp	<i>Carica papaya</i>
DCF	Doença das células falciformes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EAFCP	Extrato aquoso de folhas de Cp
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe ²⁺	Ferro no estado ferroso
H&TRC	<i>Health & Technology Research Center</i>
HATs	Acetiltransferases de histonas
Hb	Hemoglobina
HbA1	Hemoglobina A1
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HDACs	Desacetilases de histonas
HDMs	Desmetilases de histonas
HIC2	<i>HIC ZBTB transcriptional repressor 2</i>
HMTs	Metiltransferases de histonas
HU	Hidroxiureia
ISEL	Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
KLF1	<i>Krüppel-like factor 1</i>
LCR	Região de Controlo do Locus
LDH	Lactato desidrogenase
lncRNA	RNA longo não codificante
MCS	Sequências conservadas em múltiplas espécies
miRNA	Micro-RNA
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificante
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>

NO	Óxido nítrico
NTC	<i>No template control</i>
NuRD	Desacetilase e remodelação de nucleossomas
O ₂	Dioxigénio
P6	Placa de 6 poços
P96	Placa de 96 poços
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativo (em tempo real)
RNA	Ácido ribonucleico
RNases	Ribonucleases
RT	Transcriptase reversa
RT-qPCR	PCR quantitativo com transcriptase reversa
TCEH	Transplante de células estaminais hematopoiéticas
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma metaloproteína essencial presente nos eritrócitos e é responsável pelo transporte de gases respiratórios, como o dióxigênio (O_2), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), desde os pulmões até aos diversos tecidos do organismo humano [1], [2], [3]. Representa a proteína mais abundante nos glóbulos vermelhos [4] e desempenha um papel fulcral na homeostasia respiratória.

Esta proteína apresenta uma estrutura quaternária, composta por quatro subunidades polipeptídicas – duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β) – formando um tetrâmero simétrico com aproximadamente 64,450 Dalton [1], [5], [6]. Cada subunidade está ligada a um grupo prostético heme, contendo no seu centro um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}), essencial para a ligação reversível ao oxigénio [1], [3], [7]. Este grupo heme confere à Hb a sua capacidade funcional de transporte de gases, enquanto as cadeias de globina garantem a solubilidade da molécula, a sua integridade estrutural e o controlo da afinidade ao oxigénio, nomeadamente através das transições conformacionais entre os estados tenso (desoxihemoglobina) e relaxado (oxihemoglobina) [3], [7].

Durante o desenvolvimento ontogenético humano, a síntese da hemoglobina é altamente regulada e ocorre em locais específicos, mudando ao longo das fases embrionária, fetal e adulta. A produção de Hb inicia-se no saco vitelino (na fase embrionária), transita para o fígado (na fase fetal) e, finalmente, estabelece-se na medula óssea (em fase adulta) [2], [8]. A expressão das diferentes formas de Hb é coordenada por dois agrupamentos génicos: o cluster da α -globina, localizado no braço curto do cromossoma 16 (16p13.3), e o cluster da β -globina, situado no braço curto do cromossoma 11 (11p15.5) [9], [10].

O agrupamento genético da α -globina (**Figura 1.1**) inclui os genes embrionário ζ (HBZ), os genes $\alpha 1$ (HBA1) e $\alpha 2$ (HBA2), bem como três pseudogenes ($\psi\zeta 1$, $\psi\alpha 1$ e $\psi\alpha 2$) e um gene θ . A expressão adequada destes genes é regulada por quatro regiões conservadas não codificantes, situadas a montante do locus ζ , denominadas HS-10, HS-33, HS-40 e HS-48 – também referidas como MCS-R1 a -R4 (sequências conservadas em múltiplas espécies), sendo que a sequência HS-40 se destaca por ser a mais relevante na ativação transcricional dos genes α [11], [12], [13], [14].

Por sua vez, o agrupamento da β -globina (**Figura 1.1**) compreende cinco genes: o embrionário ϵ (HBE), os fetais $G\gamma$ (HBG2) e $A\gamma$ (HBG1), o gene δ (HBD) e o gene β (HBB), além de um pseudogene ($\psi\beta$) [9], [10]. Estes genes são ativados e silenciados

sequencialmente ao longo do desenvolvimento, com base numa disposição linear que respeita a ordem de expressão ontogénica (5'–ε–Gγ–Aγ–ψβ–δ–β–3') [8], [15]. O controlo transcricional deste locus é exercido pela Região de Controlo do Locus (LCR), composta por cinco regiões hipersensíveis à DNase I (HS1–HS5), que mantêm a estrutura da cromatina aberta e acessível, facilitando a ligação de fatores de transcrição aos promotores dos genes e funcionando por isso como ativador da transcrição genética [16], [17].

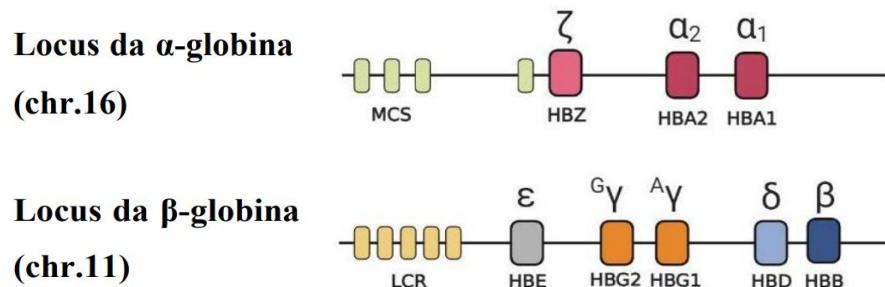


Figura 1.1 – Representação esquemática dos agrupamentos genéticos da α-globina e da β-globina. Adaptado de [18].

Este processo é dinâmico e implica interações específicas entre a LCR e os genes da globina, permitindo a expressão sequencial das isoformas de hemoglobina consoante a necessidade fisiológica de oxigenação. Por exemplo, durante a fase embrionária, a hemoglobina dominante é a Hb embrionária (ζε₂), formada pelas cadeias ζ e ε. Posteriormente, com a transição para a hematopoiese hepática, prevalece a Hb fetal (α₂γ₂). Finalmente, após o nascimento, na hematopoiese medular, dá-se a ativação dos genes HBA e HBB, formando-se a hemoglobina A1 (α₂β₂), predominante na vida adulta, juntamente com a hemoglobina A2 (α₂δ₂) e vestígios residuais de hemoglobina fetal HbF (cerca de 1%) [2], [8], [19].

A regulação da expressão dos genes da globina ao longo do desenvolvimento é mediada por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA (ácido desoxirribonucleico) e modificações de histonas, e por complexas redes de regulação transcricional que incluem fatores ativadores e repressores, os quais interagem competitivamente com a LCR [17], [20]. Este sistema coordenado assegura que a composição da hemoglobina seja adaptada às diferentes necessidades metabólicas ao longo da vida.

As alterações genéticas que afetam os genes da globina estão na origem das hemoglobinopatias, sendo estas doenças monogénicas hereditárias com elevada prevalência global, sobretudo em regiões com maior taxa de consanguinidade ou em países com elevada incidência de malária, onde se estima que até 90% dos recém-nascidos possam ser afetados [21], [22], [23].

1.1.1. Hemoglobina Fetal

A HbF constitui a forma predominante de hemoglobina durante a vida intrauterina, como referido anteriormente, sendo composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama, formando o tetrâmero $\alpha_2\gamma_2$ [24]. Esta configuração molecular confere à HbF uma maior afinidade pelo oxigênio em comparação com a hemoglobina adulta (Hb adulta, HbA, HbA1) o que é essencial para a transferência eficiente de oxigênio da circulação materna para o feto através da placenta [25].

A síntese da HbF inicia-se por volta da quinta semana de gestação e atinge o seu pico durante o segundo e terceiro trimestres. Após o nascimento, a produção de HbF decresce gradualmente, sendo substituída progressivamente pela HbA, de conformação $\alpha_2\beta_2$. Este processo de transição, conhecido como *switch* hemoglobínico, encontra-se normalmente completo nos primeiros seis meses de vida, sendo que em indivíduos adultos saudáveis, os níveis de HbF são geralmente inferiores a 1% [26]. Destaca-se que a persistência hereditária de HbF é uma condição benigna em que níveis elevados de HbF se mantêm na vida adulta. Esta alteração resulta de mutações nos elementos reguladores da expressão dos genes das cadeias gama, não estando associada a sintomas clínicos adversos [27].

A expressão da HbF após o nascimento é regulada por diversos fatores genéticos, sendo a modulação dos seus níveis fortemente associada a polimorfismos em loci como BCL11A, HBS1L-MYB e no promotor do gene HBG2 [28]. Em populações europeias, incluindo a portuguesa, variantes genéticas nestes loci têm sido estudadas no contexto de hemoglobinopatias, permitindo perspetivar abordagens terapêuticas personalizadas [29].

1.2. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas resultantes de alterações na estrutura ou na síntese das cadeias de globina da Hb, classificando-se, assim, em qualitativas e quantitativas. As primeiras derivam de mutações que originam variantes estruturais da Hb, modificando-as para hemoglobina S (caso da anemia falciforme) ou hemoglobina C, por exemplo; enquanto as quantitativas, resultam da produção insuficiente ou ausente de uma ou mais cadeias de globina, como ocorre na β -talassémia ou α -talassémia [3], [19], [30].

As manifestações clínicas destas patologias variam amplamente, podendo ir desde formas assintomáticas até quadros severos de anemia crónica. Globalmente, estima-se que cerca de 7% da população seja portadora de uma hemoglobinopatia em heterozigotia, sendo mais prevalentes em regiões como África Subsariana, Sudeste

Asiático, Médio Oriente e região Mediterrânica, sendo estas regiões com maior taxa de consanguinidade e/ou com elevada incidência de malária [19], [23], [31].

Entre as hemoglobinopatias clinicamente mais relevantes encontram-se a doença falciforme, também conhecida como anemia falciforme, e a β -talassémia. Em ambos os casos, os níveis aumentados de hemoglobina fetal (HbF) associam-se a manifestações menos graves da doença, uma vez poderem modular positivamente o curso clínico da mesma [8], [32]. Por exemplo, no caso da anemia falciforme, a presença de HbF inibe a polimerização da hemoglobina S (HbS), mecanismo patológico subjacente às crises vaso-oclusivas na anemia falciforme, reduzindo assim a frequência e severidade das complicações [31].

1.2.1. Anemia Falciforme

A anemia falciforme, também conhecida como doença das células falciformes (DCF), é uma hemoglobinopatia qualitativa provocada por uma mutação pontual no gene da β -globina (HBB), que resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia polipeptídica da HbA1, originando a hemoglobina S (HbS) [16], [21], [22]. Esta alteração promove a polimerização da HbS em estados de desoxigenação, levando à distorção dos eritrócitos, que em vez de terem o formato arredondado habitual, passam a ter forma de foice. Estas células falciformes são mais rígidas, têm menor deformabilidade e tempo de vida, são mais frágeis e altamente aderentes ao endotélio vascular, o que aumenta a propensão de ocorrer obstrução da microcirculação, resultando em crises vaso-oclusivas caracterizadas por isquemia, dor intensa, hemólise intravascular, inflamação crónica, lesão orgânica e maior stress oxidativo [2], [33], [34]. Assim, é frequente registarem-se outras complicações clínicas severas, tais como anemia hemolítica crónica, crises dolorosas recorrentes, fadiga, fraqueza, inchaço das extremidades, icterícia e maior suscetibilidade a infeções devido à disfunção esplénica [35], [36]. Outros eventos clínicos graves incluem atraso no crescimento, acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão pulmonar, síndrome torácica aguda e danos multiorgânicos [16], [37], [38], [39], [40].

A doença manifesta-se de forma mais grave em indivíduos homozigóticos (HbSS), enquanto os heterozigóticos (HbAS) são portadores geralmente assintomáticos, tendo o chamado de traço falciforme. Embora associada a uma qualidade de vida comprometida e redução da esperança média de vida, a variabilidade fenotípica é significativa e nem todos os mecanismos subjacentes estão completamente compreendidos [41]. No entanto, sabe-se que níveis mais elevados de HbF estão associados a formas menos graves da doença, uma vez que a HbF reduz a tendência de polimerização da HbS, e conseqüentemente os sintomas [20], [32].

1.2.2. Epidemiologia

As hemoglobinopatias representam um importante problema de saúde pública em várias regiões do mundo. Estima-se que, anualmente, nascem entre 300.000 a 500.000 crianças com hemoglobinopatias clinicamente significativas, sendo a maioria (cerca de 70%) com anemia falciforme [19].

A distribuição geográfica destas patologias está fortemente correlacionada com a prevalência histórica da malária, dado que o traço falciforme (HbAS) confere proteção parcial contra a infeção por *Plasmodium falciparum*, parasita responsável pela malária [20]. Assim, por evolução populacional, a anemia falciforme é mais comum em regiões onde a malária é endémica, como África Subsariana, Sudeste Asiático, Índia, Médio Oriente, região Mediterrânica e Brasil [23].

Em Portugal, a prevalência das hemoglobinopatias é relativamente baixa, sendo mais frequente nas zonas do Centro e Sul do país, em parte devido a fenómenos migratórios e à ancestral ligação com países lusófonos africanos [30], [42].

Tendo em conta o impacto destas doenças, diversos países com elevada prevalência têm implementado programas de rastreio neonatal, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal, visando a deteção precoce e prevenção de formas graves da doença [43].

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da DCF é fundamental para a implementação precoce de intervenções terapêuticas que contribuam para a redução da morbilidade e melhoria da qualidade de vida dos doentes. Este processo diagnóstico integra a análise do historial clínico e familiar, a realização de exame físico e a aplicação de técnicas laboratoriais hematológicas e moleculares.

Clinicamente, os profissionais de saúde procuram sinais típicos da patologia, como icterícia, anemia ou inchaço das extremidades, e avaliam a existência de antecedentes familiares de hemoglobinopatias, dada a natureza hereditária da DCF [36]. A triagem neonatal, obrigatória em vários países, é amplamente recomendada pela sua eficácia na deteção precoce da doença, possibilitando o início imediato de cuidados médicos adequados [36].

Laboratorialmente, destacam-se métodos tradicionais como o hemograma, utilizado para avaliar os componentes celulares do sangue, e a eletroforese de hemoglobinas, que permite identificar variantes anómalas, neste caso da HbS. Outras técnicas complementares incluem a cromatografia líquida de alta eficiência e os testes de solubilidade da HbS [44], [45].

Com o avanço da biotecnologia, métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-PCR) e a sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) têm vindo a ser incorporados na prática clínica, permitindo estas técnicas a identificação precisa das mutações nos genes da globina, oferecendo um diagnóstico definitivo da DCF e das suas variantes genéticas [46].

Em casos mais complexos, exames imagiológicos adicionais, como radiografias ou ecografias, podem ser utilizados para avaliar o impacto da doença nos órgãos afetados.

1.4. Terapêuticas

O tratamento destas patologias tem evoluído significativamente, recorrendo a abordagens (ilustradas na **Figura 1.2**) como transfusões sanguíneas e administração de hidroxiureia (HU), sendo esta última considerada a principal terapêutica farmacológica para a indução da HbF, uma vez ter demonstrado eficácia no aumento dos níveis de HbF e na redução das manifestações clínicas da doença [47].

Em casos mais graves, o transplante de células estaminais hematopoiéticas pode ser considerado, sendo atualmente a única cura definitiva [34]. Paralelamente, têm sido investigadas novas terapêuticas, nomeadamente a modulação farmacológica e genética da expressão de HbF. Entre estas, destaca-se a utilização de tecnologias de edição genética, como o CRISPR/Cas9, direcionadas à regulação de fatores transcricionais como o BCL11A, um potente repressor da expressão dos genes da γ -globina, cuja inibição promove a reativação da produção de HbF [48], [49], [50]. Estas estratégias emergentes oferecem novas perspetivas terapêuticas que poderão, no futuro, complementar ou substituir os tratamentos atualmente disponíveis.

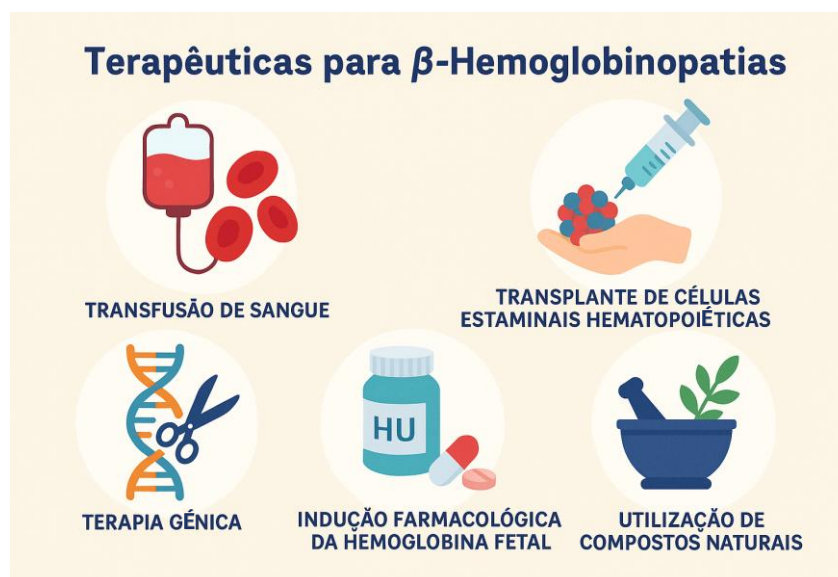


Figura 1.2 – Abordagens terapêuticas atuais e futuras para hemoglobinopatias.

1.4.1. Transfusão de sangue

As transfusões de concentrado eritrocitário constituem uma das principais abordagens terapêuticas no tratamento da DCF, sendo particularmente eficazes na gestão de complicações agudas e crônicas, como síndrome torácica aguda, AVC e episódios de anemia severa [51], [52]. Este procedimento permite melhorar a oxigenação tecidual e a perfusão na microcirculação, através da redução da percentagem de hemoglobina S (HbS) e do nível de hematócrito, contribuindo para a prevenção de eventos vasculares oclusivos [16], [31], [52].

Apesar da sua eficácia comprovada na atenuação dos sintomas e complicações da DCF, a terapêutica transfusional apresenta limitações significativas quando utilizada de forma crônica, uma vez que a utilização repetitiva desta abordagem terapêutica pode conduzir à acumulação excessiva de ferro no organismo, resultado da degradação progressiva das hemácias transfundidas, podendo evoluir para hemocromatose. Nestes casos, torna-se necessária a administração de agentes quelantes para controlar a sobrecarga férrica [20], [39], [53]. Para além disso, os doentes estão sujeitos a riscos adicionais, como infeções transmitidas por agentes virais ou bacterianos, e aloimunização, isto é, resposta imunitária contra antígenos eritrocitários não próprios (do dador) [54], [55], [56].

1.4.2. Transplante de células estaminais hematopoiéticas

O transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) alogénico (de outro indivíduo da mesma espécie) constitui atualmente a única opção terapêutica com potencial curativo definitivo para indivíduos com β -hemoglobinopatias, incluindo a DCF e a β -talassémia [49], [57], [58]. Esta abordagem baseia-se na substituição das células hematopoiéticas do paciente por células saudáveis de um dador compatível, permitindo a normalização da eritropoiese e a produção de eritrócitos funcionais, sem a mutação que origina a hemoglobina anómala [59], [60].

A eficácia do TCEH está bem estabelecida, sobretudo em doentes pediátricos com dadores HLA-idênticos, tendo-se observado nestes casos melhorias significativas na função orgânica e na redução da mortalidade associada à DCF [57], [61].

No entanto, a sua aplicação generalizada continua limitada por diversos fatores, incluindo a escassa disponibilidade de dadores compatíveis, os custos elevados, e os riscos associados, como a rejeição do enxerto, doença do enxerto contra o hospedeiro, e a toxicidade do regime de condicionamento [62], [63], [64].

Destaca-se a importância da seleção criteriosa dos candidatos ao transplante, baseada na gravidade da doença, idade e comorbilidades, sendo esta essencial para maximizar os benefícios e minimizar os riscos do procedimento terapêutico [60].

1.4.3. Terapia génica

A terapia génica tem emergido como uma abordagem terapêutica altamente promissora no tratamento das hemoglobinopatias, incluindo a DCF e a β -talassémia. Ao contrário do transplante alogénico, esta estratégia utiliza células estaminais hematopoiéticas autólogas (do próprio doente) geneticamente modificadas, eliminando a necessidade de um dador compatível e reduzindo significativamente o risco de rejeição imunológica [65], [66], [67].

Atualmente, distinguem-se duas abordagens principais nesta área: a adição de genes e a edição genómica. A adição consiste na inserção de uma cópia funcional do gene da β -globina no genoma do doente, utilizando vetores virais (frequentemente de origem lentiviral) e num processo realizado *ex vivo*, minimizando a genotoxicidade em tecidos não-alvo [64], [65], [66]. Já a edição genómica permite a modificação permanente de sequências específicas de DNA, por exemplo através da inibição de reguladores como o BCL11A, que reprime a expressão da HbF. Esta técnica tem sido aplicada com recurso a sistemas como o CRISPR/Cas9 e meganucleases (enzimas de restrição), demonstrando resultados promissores em ensaios clínicos e modelos experimentais, com aumento dos níveis de HbF e reversão do fenótipo falciforme [20], [49], [59], [66], [68], [69], [70]. Na sequência destes ensaios clínicos, existem terapias génicas *ex vivo*, para DCF e β -talassémia, já aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*), sendo estas: LYFGENIA (lovo-cel), que funciona por adição genética e é direcionada para DCF; ZYNTEGLO, igualmente por adição genética, mas direcionada para β -talassémia; e CASGEVY (exa-cel), que funciona por edição genómica do BCL11A por CRISPR/Cas9, sendo direcionada tanto para DCF como para β -talassémia [70], [71].

1.4.4. Indução farmacológica de HbF

A indução farmacológica da hemoglobina fetal constitui uma estratégia terapêutica central, validada e promissora para o tratamento de hemoglobinopatias, nomeadamente a DCF e a β -talassémia [60], [61], [72]. A HbF, que predomina no período neonatal, possui elevada afinidade pelo oxigénio e, ao contrário da HbS, não sofre polimerização em condições de hipoxia, mitigando a deformação dos eritrócitos e subsequentes hemólise e fenómenos vaso-oclusivos [40], [73].

A observação clínica de que os recém-nascidos com DCF raramente manifestam sintomas durante o primeiro ano de vida, feita por Janet Watson em 1948, levou à hipótese, mais tarde confirmada, de que níveis elevados de HbF conferem proteção contra as manifestações clínicas da doença [74], [75]. A presença de HbF atrasa a polimerização da HbS, reduz a hemólise, atenua a inflamação crónica e melhora a

biodisponibilidade de óxido nítrico, contribuindo para menor vasoconstrição e adesão celular ao endotélio [73], [74], [76].

A relevância da HbF também se evidencia em indivíduos com persistência hereditária da HbF, uma condição genética rara em que a expressão de HbF se mantém durante a vida adulta, frequentemente resultando em quadros assintomáticos ou com sintomas atenuados, mesmo na presença de mutações associadas à DCF ou à β -talassémia [77], [78], [79]. Este fenótipo pode resultar de deleções no cluster do gene da β -globina, mutações nas regiões promotoras dos genes HBG1 e HBG2, ou da herança de loci de características quantitativas que modulam a expressão de HbF, como o BCL11A (2p16) [49], [80].

O conhecimento acumulado sobre os mecanismos moleculares que regulam a expressão da HbF tem sido crucial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos indutores da sua produção. Entre os compostos mais estudados estão a HU, amplamente utilizada e clinicamente validada, os derivados de butirato, a decitabina (com propriedades hipometilantes), a L-glutamina e inibidores da histona desacetilase, como o vorinostat [40], [81]. Estas terapias visam reativar a expressão dos genes HBG1 e HBG2, inibindo a polimerização da HbS e restaurando o equilíbrio entre as cadeias de globina, o que é particularmente relevante tanto na DCF como na β -talassémia [8], [20], [33], [62], [74], [82].

Por outro lado, baixos níveis de HbF estão correlacionados com um aumento do risco de eventos vaso-oclusivos, danos orgânicos e maior mortalidade. Por conseguinte, a indução de HbF representa uma intervenção terapêutica com forte potencial para reduzir a morbidade e melhorar o prognóstico dos indivíduos com β -hemoglobinopatias, pelas razões anteriormente enunciadas [78], [82], [83].

1.4.4.1. Hidroxiureia

A hidroxiureia, também conhecida como hidroxycarbamida, é o fármaco mais amplamente estudado e utilizado na terapêutica da DCF, estando a sua eficácia clínica bem documentada, e tendo sido aprovada pela FDA para utilização em adultos e em crianças a partir dos dois anos de idade [84]. A HU tem demonstrado capacidade para aumentar significativamente os níveis de HbF, reduzir a frequência de crises vaso-oclusivas e a necessidade de transfusões sanguíneas, bem como melhorar a sobrevivência dos doentes [85], [86], [87], [88].

Este composto atua inibindo a enzima ribonucleotídeo redutase, levando à depleção de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) e à paragem do ciclo celular na fase S, o que resulta em efeitos mielossupressores transitórios e reversíveis, como neutropenia e, em casos pediátricos, reticulocitopenia [88], [89]. Embora os mecanismos moleculares

exatos responsáveis pela indução da HbF permaneçam parcialmente desconhecidos, a ação da HU sobre a expressão da gama-globina tem sido consistentemente observada [90].

Os efeitos adversos da HU são geralmente ligeiros e bem tolerados, sobretudo em contexto pediátrico, incluindo cefaleias e sintomas gastrointestinais como náuseas e desconforto abdominal [88]. No entanto, a utilização prolongada deste fármaco levanta preocupações quanto à toxicidade reprodutiva, uma vez que em mulheres grávidas, a HU pode atravessar a placenta e interferir com a síntese de DNA fetal, aumentando o risco de malformações congénitas, alterações hematológicas fetais e aborto espontâneo [91], [92], [93]. Da mesma forma, em homens adultos, a HU pode comprometer a fertilidade, afetando a espermatogénese e levando a uma redução da contagem espermática, enquanto em mulheres adultas, pode interferir no ciclo ovulatório, causando irregularidades menstruais ou amenorreia [94].

Apesar da sua eficácia terapêutica, a aplicação da HU encontra-se limitada em regiões com escassos recursos, onde a incidência da DCF é mais elevada e o acesso a cuidados médicos especializados é restrito [89]. Além disso, a variabilidade interindividual na resposta à HU e os seus potenciais efeitos a longo prazo continuam a ser objeto preocupação e investigação [95].

1.4.5. Compostos naturais indutores de HbF

A utilização de compostos naturais enquanto indutores da HbF tem emergido como uma abordagem complementar promissora à terapêutica farmacológica convencional, especialmente no tratamento de β -talassémias e DCF, destacando-se pela sua acessibilidade, menor toxicidade e potencial pleiotrópico [43], [96], [97]. Embora não sejam considerados substitutos das terapias principais, estes agentes naturais podem atuar como adjuvantes, sobretudo em contextos com recursos limitados, onde a medicina tradicional continua a ser a principal forma de cuidados de saúde para grande parte da população mundial [43].

Diversos compostos de origem natural têm sido identificados como potenciais indutores de HbF, nomeadamente Angelicina, Rapamicina, Resveratrol, Quercetina, Bergamota, *Fructus trichosanthis*, Romidepsina, *Triticum aestivum*, *Curcuma comosa*, *Astragalus*, *Apicidina*, Curcuminoides e Piceatanol [43].

Estes agentes têm demonstrado capacidade de induzir a expressão de HbF em modelos experimentais, contribuindo para a melhoria do fenótipo clínico em doentes com hemoglobinopatias. Contudo, apesar do potencial terapêutico evidenciado, permanecem lacunas significativas relativamente à biodisponibilidade, farmacocinética

e perfil de segurança destes compostos em humanos, sendo necessária investigação adicional para a sua validação clínica [43].

1.4.5.1. *Carica papaya*

A planta *Carica papaya* (Cp), pertencente à família *Caricaceae* e cultivada em regiões tropicais e subtropicais, tem despertado crescente interesse no contexto das hemoglobinopatias, em particular na doença das células falciformes, devido ao seu perfil fitoquímico e potencial terapêutico [43], [97], [98], [99]. Esta planta é rica em vitaminas (A, B e C), minerais como ferro e cálcio, e compostos bioativos como flavonoides (incluindo a quercetina) e alcaloides, com reconhecidas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, antifúngicas e anti-falciformação [43], [98], [100], [101].

Estudos *in vitro* e *ex vivo* demonstraram que os extratos das folhas e frutos da Cp exercem efeitos anti-falciformação, promovem a estabilidade da membrana eritrocitária e reduzem a hemólise sob stress osmótico, prevenindo a deformação dos glóbulos vermelhos [85], [102], [103], [104], [105], [106]. Adicionalmente, estes extratos mostraram capacidade para induzir a produção de hemoglobina fetal em modelos celulares, o que poderá traduzir-se numa atenuação dos efeitos clínicos da DCF [106]. A sua atividade antioxidante e imunomoduladora contribui ainda para a mitigação do stress oxidativo crónico, frequentemente observado nos doentes com DCF [107], [108]. Ensaio clínicos preliminares apontam para benefícios hematológicos e anti-inflamatórios com a administração oral de extratos da planta, embora sejam necessários mais estudos clínicos controlados para validar a sua eficácia e segurança em contexto clínico [109].

A folha da Cp é ainda considerada um suplemento nutricional valioso, contendo hidratos de carbono, lípidos, proteínas e uma variedade de micronutrientes essenciais à eritropoiese, como ferro e folato [43], [109], [110]. O consumo do fruto e das folhas, além de favorecer a absorção de ferro, estimula a produção de glóbulos vermelhos, aliviando sintomas de anemia e promovendo melhorias no estado energético dos doentes [85], [111].

Neste contexto, a *Carica papaya* destaca-se como um potencial agente terapêutico complementar para a gestão das hemoglobinopatias, justificando investigação adicional sobre os seus mecanismos moleculares, nomeadamente no que diz respeito à regulação da expressão de genes envolvidos na eritropoiese e na síntese de HbF [43], [106], [109].

1.5. Regulação molecular da expressão de hemoglobina

Como visto anteriormente, a expressão dos genes da hemoglobina é altamente regulada ao longo do desenvolvimento ontogênico humano, acompanhando as transições dos locais de hematopoiese, desde o saco vitelino, ao fígado, até à medula óssea [2], [8]. Esta regulação envolve a ativação sequencial de genes específicos dos clusters da α -globina [9], [10], que inclui os genes HBZ e HBA [11], [12], [13], [14], da β -globina, que inclui os genes HBG1, HBG2, e HBB [9], [10]. A arquitetura genômica permite a expressão dinâmica das diferentes isoformas de hemoglobina, conforme a necessidade fisiológica e de acordo com as fases de desenvolvimento [2], [8], [19], sendo a troca de expressão de genes da globina mediada por mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA e modificação de histonas, e por mecanismos transcricionais que envolvem fatores ativadores e/ou repressores [17], [20].

1.5.1. Regulação epigenética

A epigenética é o campo da biologia que estuda as alterações hereditárias na expressão gênica e que ocorrem sem modificar a sequência do DNA [112], [113], [114]. O conceito foi introduzido por Conrad Waddington, em 1942, que propôs a existência de um sistema regulador adicional ao código genético, o "código epigenético", responsável pela diversidade fenotípica observada em organismos com o mesmo genoma [112].

Este código epigenético é influenciado por diversos fatores ambientais e comportamentais, como a nutrição, o exercício físico, o stress e a exposição a drogas ou agentes tóxicos [1], [113], [115], [116]. A sua ação é particularmente relevante durante o desenvolvimento embrionário e nos primeiros anos de vida, períodos críticos para a definição de trajetórias celulares e fenótipos [1], [113], [114].

Entre os principais mecanismos epigenéticos destacam-se (tal como ilustrado na **Figura 1.3**): a metilação do DNA, geralmente associada à repressão da transcrição; as modificações pós-traducionais das histonas, como acetilação, metilação e fosforilação, que influenciam a compactação da cromatina e a acessibilidade dos genes aos fatores de transcrição; e a regulação por ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificantes (ncRNAs), envolvidos no controlo transcricional e pós-transcricional da expressão gênica [112], [113].

Estes mecanismos têm um papel central na remodelação da cromatina, permitindo que células com o mesmo genoma apresentem perfis funcionais e morfológicos distintos, essencial para a diferenciação celular e a homeostase dos tecidos [1], [113]. No contexto da regulação da expressão dos genes da hemoglobina, a modulação epigenética é particularmente relevante, uma vez que processos como a metilação do DNA e a

modificação de histonas contribuem diretamente para o silenciamento ou ativação de loci específicos, permitindo a transição precisa entre diferentes isoformas de hemoglobina ao longo do desenvolvimento ontogénico [113].

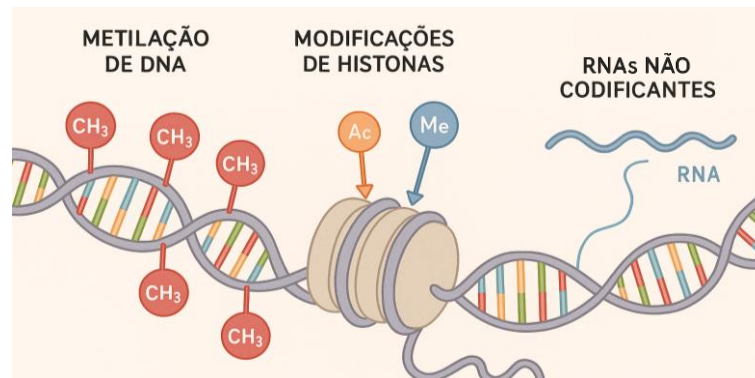


Figura 1.3 – Tipos de regulação epigenética envolvidos na regulação da expressão génica.

1.5.1.1. Modificação de histonas

As histonas são proteínas nucleares com carga positiva que se associam ao DNA, de carga negativa, permitindo a compactação do material genético sob a forma de cromatina. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossoma, constituído por cerca de 147 pares de bases de DNA enrolados em torno de um octâmero de histonas, composto por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Já a histona H1, estabiliza a estrutura ao interagir com o DNA de ligação entre nucleossomas [112], [117], [118].

As caudas N-terminais das histonas, que se estendem a partir do nucleossoma, são alvo de diversas modificações pós-traducionais, como a acetilação, metilação, fosforilação, entre outras, que modulam a estrutura da cromatina. Esta é alternada entre conformações mais relaxadas (eucromatina), que favorecem a transcrição, e conformações mais condensadas (heterocromatina), associadas a silenciamento génico [117], [118], [119], [120].

A acetilação de histonas é catalisada por enzimas denominadas acetiltransferases de histonas (HATs), que transferem grupos acetilo para resíduos de lisina nas caudas das histonas, neutralizando a carga positiva e promovendo a descondensação da cromatina, facilitando assim o acesso da maquinaria transcricional [118]. Em contraste, as enzimas desacetilases de histonas (HDACs) removem esses grupos, promovendo a compactação da cromatina e o consequente silenciamento da expressão génica [118], [119].

As HDACs estão organizadas em quatro classes: a classe I inclui as HDACs 1, 2, 3 e 8, localizadas predominantemente no núcleo; a classe II subdivide-se em IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10), com localização tanto nuclear como citoplasmática; a classe

III é constituída pelas sirtuínas; e a classe IV é representada unicamente pela HDAC11 [118], [120], [121], [122], [123].

A atividade das HDACs de classe I, particularmente HDAC1 e HDAC2, tem sido associada ao silenciamento dos genes da γ -globina (HBG1 e HBG2), e à ativação da β -globina, estando integradas em complexos repressores como o NuRD (desacetilase e remodelação de nucleossomas) [1], [17], [72], [124]. Adicionalmente, HDAC3 e HDAC8 desempenham papéis relevantes no desenvolvimento embrionário e na regulação do ciclo celular, nomeadamente na montagem do fuso e alinhamento cromossómico durante a meiose [124].

Importa destacar que inibidores de HDACs têm demonstrado potencial terapêutico ao induzirem a expressão de hemoglobina fetal (HbF), representando uma estratégia promissora no tratamento de hemoglobinopatias. A inibição das HDAC1 e HDAC2, em particular, revelou-se eficaz no aumento dos níveis de HbF em modelos pré-clínicos, com impacto na redução da sintomatologia e na melhoria da função eritrocitária [106], [125].

Além da acetilação, a metilação das histonas constitui outro mecanismo epigenético relevante, mediado por enzimas metiltransferases (HMTs) e desmetilases de histonas (HDMs). Este processo, que ocorre em resíduos de lisina e arginina, pode estar associado tanto à ativação como à repressão génica, dependendo do contexto e da localização dos resíduos modificados [17], [118], [119].

1.5.1.2. Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético essencial na regulação da expressão génica e é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), nomeadamente DNMT1, DNMT3a e DNMT3b [113], [117], [119]. Este processo consiste na transferência de um grupo metilo, proveniente da S-adenosilmetionina, para o carbono 5 da citosina, originando 5-metilcitosina (5mC), e está envolvido em fenómenos como o *imprinting* genómico, a inativação do cromossoma X e o silenciamento transcricional [117], [119].

A DNMT1, frequentemente designada como metiltransferase de manutenção, assegura a replicação fiel dos padrões de metilação durante a divisão celular ao reconhecer substratos hemimetilados (metilados só numa das cadeias do DNA) [126]. Por outro lado, as DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação de novo, estabelecendo novos padrões epigenéticos durante o desenvolvimento embrionário [113], [126]. Estas DNMTs participam ativamente no silenciamento dos genes da γ -globina (HBG1 e HBG2) na fase pós-natal, impedindo a expressão de HbF na eritropoiese adulta [17], [68], [113].

Tendo em conta que o silenciamento epigenético da γ -globina envolve a adição de grupos metilo às regiões promotoras destes genes, frequentemente mediada pela DNMT1 em cooperação com fatores transcricionais inibitórios, como BCL11A [1], [126], [127], [128], a hipometilação destas regiões promotoras tem sido associada à reativação da expressão da HbF, o que representa uma abordagem terapêutica eficaz para a DCF [126].

Neste contexto, têm sido exploradas estratégias farmacológicas que visam a inibição das DNMTs, destacando-se a decitabina e a 5-azacitidina. Estas drogas atuam promovendo a degradação da DNMT1 e, conseqüentemente, a reativação da expressão da γ -globina em células eritroides adultas, com potencial terapêutico em indivíduos com hemoglobinopatias [66], [126], [128]. Ressalva-se que a metilação do DNA é um processo dinâmico, sujeito à desmetilação ativa ou à perda passiva de metilação em resultado da redução da atividade enzimática ou da taxa de proliferação celular, nomeadamente durante o envelhecimento [112], [126], [128], [129].

1.5.2. Regulação transcricional / de sinalização

Além dos mecanismos epigenéticos, a expressão dos genes da hemoglobina é também regulada por fatores de transcrição, tal como ilustrado nas **Figuras 1.4 e 1.5**.

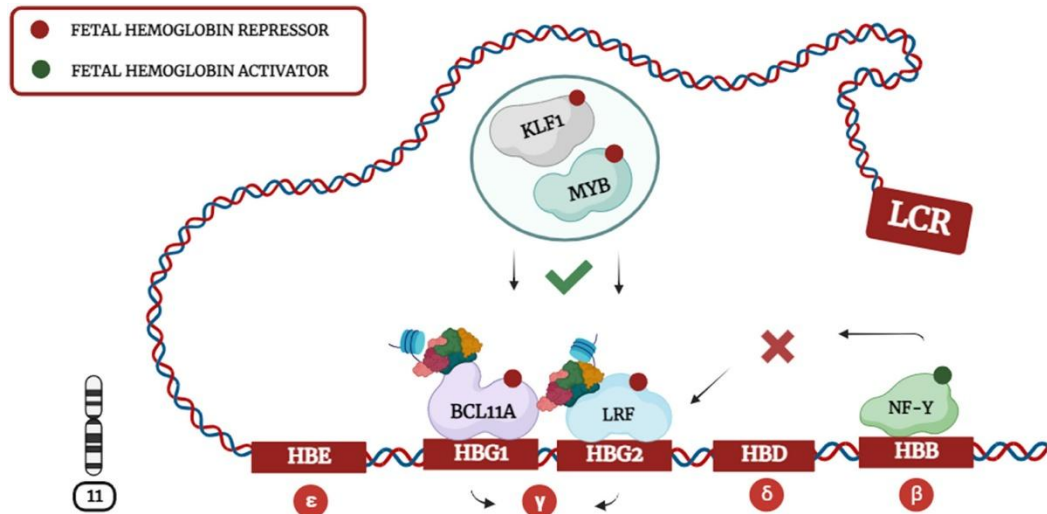


Figura 1.4 – Repressão de hemoglobina fetal por regulação transcricional. Adaptado de [130].

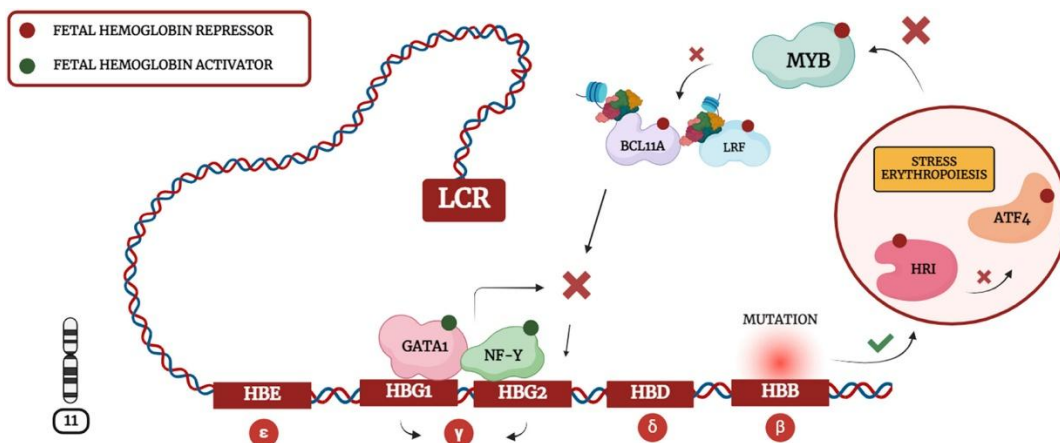


Figura 1.5 – Ativação de hemoglobina fetal por regulação transcricional.

Adaptado de [130].

1.5.2.1. BCL11A

O gene *BCL11A* (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*), localizado em 2p16.1, codifica uma proteína que desempenha um papel crucial na regulação ontogenética da expressão da hemoglobina, particularmente na transição da HbF para a HbA [131], [132]. Esta proteína atua como repressor transcricional dos genes *HBG1* e *HBG2* (**Figura 1.4**), responsáveis pela codificação das cadeias gama da HbF, estando a sua expressão aumentada em células eritroides adultas, onde os níveis de HbF são baixos, e reduzida em células fetais, nas quais a HbF é altamente expressa [70], [131], [132].

O mecanismo de repressão de *BCL11A* envolve a sua ligação direta ao locus da β -globina, onde forma complexos regulatórios com diversos fatores de transcrição hematopoiéticos e com complexos epigenéticos, como o NuRD [131], [133], [134]. O NuRD, por sua vez, é composto por enzimas como HDAC1 e HDAC2, essenciais para o silenciamento da γ -globina. É sugerido pela evidência científica que a proteína *BCL11A* facilita esse processo, uma vez direcionar o NuRD para a região promotora dos genes da γ -globina, onde este pode exercer a sua função repressora [70], [131], [133], [135]. Além disso, *BCL11A* também interage com outros co-repressores epigenéticos, embora o seu papel exato neste contexto ainda não esteja completamente elucidado [136].

A expressão de *BCL11A* é finamente regulada ao nível transcricional, por fatores como o *KLF1*, o qual ativa simultaneamente o gene *HBB* e induz a repressão da HbF, promovendo a expressão de *BCL11A* [137], [138], bem como ao nível pós-transcricional, por mecanismos envolvendo microRNAs [138].

Vários estudos funcionais demonstraram que a deleção ou inibição de *BCL11A* leva a um aumento significativo da expressão de HbF, tanto em linhagens celulares como K562, como em eritroblastos humanos primários, de indivíduos saudáveis ou com β -

talassémia [57], [69], [138]. Estes dados corroboram o papel do BCL11A como regulador central do silenciamento da γ -globina e tornam-no um alvo promissor em terapias direcionadas à reativação da HbF, com particular relevância para doenças como a DFC e as talassémias [134].

1.5.2.2. KLF1

O gene KLF1 (*Krüppel-like factor 1*), localizado em 19p13.13, codifica um fator de transcrição eritroide essencial para a eritropoiese e para a regulação da expressão das globinas [139]. Este fator participa na transição de HbF para a hemoglobina adulta, pode ativar diretamente a β -globina e, indiretamente, reprimir a γ -globina através da indução de repressores como BCL11A e LRF, como ilustrado pela **Figura 1.4** [130], [137], [140], [141].

A redução da expressão de KLF1 em células progenitoras eritroides adultas mostrou diminuir os níveis de BCL11A, resultando na reativação da HbF (**Figura 1.5**), o que pode ser benéfico em hemoglobinopatias como a β -talassemia e a DCF [141]. Além disso, em populações de risco para hemoglobinopatias, têm sido identificadas mutações do gene KLF1, associando-se a níveis persistentemente elevados de HbF e à atenuação dos sintomas clínicos [133].

Contudo, a função de KLF1 é complexa e multifacetada, podendo, em determinados contextos, ser descrita como contraditória, apesar de promover diretamente a expressão de HbF. Esta dualidade torna-o um alvo terapêutico promissor, embora desafiante, devido aos seus múltiplos efeitos na regulação genética eritroide [130].

1.5.2.3. MYB

O gene MYB, localizado no braço longo do cromossoma 6 (6q23), codifica um fator de transcrição essencial para a hematopoiese e diferenciação eritroide [134], [142]. Esta região, onde se encontra a zona intergênica HMIP (entre os genes HBS1L e MYB), está associada à regulação da expressão da hemoglobina fetal (HbF) [134], [143], [144], [145].

MYB atua principalmente como um regulador indireto e negativo da HbF, ao promover a expressão dos repressores BCL11A e LRF, e interagir com ATF4, que juntos silenciam a γ -globina [130]. Em modelos celulares eritroides, observou-se que o aumento da expressão de MYB promove a ativação de KLF1, o qual, por sua vez, induz BCL11A, reforçando o silenciamento da HbF (**Figura 1.4**) [17], [130], [146]. Por outro lado, a inibição de MYB resulta numa diminuição da expressão de BCL11A, favorecendo a reativação da HbF (**Figura 1.5**) [1], [130].

Apesar do interesse terapêutico, MYB é fundamental para a função hematopoiética normal, e a sua alteração pode causar disfunções hematológicas, limitando o seu potencial como alvo clínico seguro [130].

1.5.2.4. HIC2

O gene HIC2 (*HIC ZBTB transcriptional repressor 2*) é um regulador importante na eritropoiese fetal, atuando como repressor da transcrição de BCL11A [69], [147]. Ao suprimir a expressão de BCL11A, HIC2 promove a ativação indireta dos genes da hemoglobina fetal, aumentando os níveis de HbF tanto ao nível do RNA como da proteína em células eritroides [69], [148].

O mecanismo de HIC2 passa pela sua ligação a potenciadores eritroides de BCL11A, reduzindo a acessibilidade da cromatina e inibindo a ligação do fator de transcrição GATA1, mencionado na **Figura 1.5**, levando à redução da transcrição de BCL11A [69]. A ausência de HIC2 em eritroblastos fetais resulta em maior acessibilidade cromatínica, aumento da ligação de GATA1 e, conseqüentemente, elevação da expressão de BCL11A [69]. Este mecanismo destaca HIC2 como um regulador evolutivamente conservado da transição de hemoglobinas fetal para adulta, mediado pela regulação do desenvolvimento da expressão de BCL11A [69].

1.5.2.5. BGLT3

O BGLT3 (*Beta Globin Locus Transcript 3*) é um RNA longo não codificante (lncRNA) localizado numa região intergênica do cromossoma 11, entre os genes HBG1 e HBBP1, no cluster da β -globina [138], [149]. A expressão deste lncRNA ocorre em paralelo com os genes da γ -globina, tanto *in vitro* como *in vivo*, e está associada a níveis aumentados de HbF, sugerindo um papel modulador positivo na sua regulação [106], [149], [150], [151].

Embora os mecanismos moleculares exatos de ação do BGLT3 ainda não estejam completamente elucidados, a sua localização, entre HBG1 e o pseudogene HBBP1, bem como a sua expressão concomitante com os genes da γ -globina, apontam para uma função reguladora relevante [149], [151]. Mutações nesta região intergênica têm sido associadas à persistência hereditária da HbF, uma condição benigna caracterizada pela expressão sustentada de HbF, reforçando a hipótese de que esta área contém elementos inibitórios da γ -globina [149], [152].

Adicionalmente, estudos demonstraram que a deleção do locus BGLT3, utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, resulta numa redução da expressão da γ -globina em células K562, sugerindo que o BGLT3 desempenha um papel funcional na manutenção da expressão de HbF [149].

Apesar do seu potencial regulador, o BGLT3 continua a ser um elemento pouco caracterizado, com escassos estudos a aprofundar a sua matriz de interações moleculares ou os possíveis mecanismos epigenéticos pelos quais atua. Dada a sua natureza como lncRNA, é plausível que influencie a transcrição ou a estrutura da cromatina através de interações com modificadores epigenéticos, como já descrito para outros lncRNAs [151], [153].

1.6. Modelos celulares *in vitro*

A cultura de células constitui uma técnica essencial na investigação biomédica, permitindo o isolamento, manutenção e proliferação de células, nomeadamente eucarióticas, em ambiente artificial controlado. Esta abordagem tem sido amplamente utilizada para o estudo de diversos processos biológicos, tais como a fisiologia celular, os mecanismos de resposta a estímulos externos, o metabolismo, a toxicologia e a expressão génica sob condições experimentais rigorosamente definidas [154], [155], [156].

As células cultivadas podem ter origem em tecidos primários, necessitando de ser isoladas por dissociação enzimática (utilizando tripsina, por exemplo) ou mecânica, ou ser derivadas de linhas celulares estabelecidas e imortalizadas, sendo estas amplamente utilizadas devido à sua estabilidade fenotípica e facilidade de manutenção [154], [157].

As condições de cultura são adaptadas consoante o tipo celular, mas geralmente envolvem o uso de um meio de cultura estéril e enriquecido com nutrientes essenciais, aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, fatores de crescimento, soluções tampão e, frequentemente, soro fetal bovino (FBS). Estes meios, normalmente associados a incubação em estufa controlada, ajudam a garantir a manutenção do pH, temperatura (usualmente 37 °C para células humanas ou de mamíferos), pressão osmótica e humidade, criando um microambiente propício à viabilidade celular [154], [155], [156].

De acordo com as suas características morfológicas e funcionais, as células podem crescer de forma aderente, requerendo uma superfície sólida ou semissólida para se fixarem, como é o caso dos frascos com tratamento para cultura celular, ou em suspensão, flutuando livremente no meio. De acordo com estas características, o procedimento de manutenção e passagens celulares pode ser modificado [154], [155].

A cultura de células oferece uma plataforma versátil para a realização de investigação científica *in vitro*, com vantagens notáveis, como a possibilidade de manipulação genética, exposição a agentes químicos ou físicos, e obtenção de resultados reprodutíveis com controlo rigoroso de variáveis [156], [157], [158]. No entanto, esta técnica requer cuidados específicos para prevenir contaminações (como por

micoplasmas ou fungos) e para manter a integridade celular ao longo do tempo, sendo recomendadas práticas rigorosas de assepsia e monitorização periódica das culturas [154], [155], [158], [159].

Mais especificamente, no presente trabalho foi utilizada a linha celular humana K562 como modelo experimental. Esta linhagem foi originalmente estabelecida por Lozzio e Lozzio em 1975 a partir de células de leucemia obtidas do sangue periférico de uma doente com leucemia mieloide crónica (LMC) em fase de crise blástica [160], [161], sendo atualmente uma das linhas celulares mais utilizadas no estudo da hematopoiese, da leucemia e da regulação da expressão da hemoglobina.

2. Objetivos

2.1. Questão de Investigação

“Poderá o extrato aquoso de folhas de *Carica papaya* atuar como um indutor eficaz da hemoglobina fetal, com impacto nas principais moléculas reguladoras da sua expressão?”

2.2. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos de extratos aquosos de folhas de *Carica papaya* na viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade, bem como a sua influência na expressão diferencial de moléculas reguladoras, e consequente reativação de HbF, em células de linhagem K562, e em comparação com a hidroxiureia, com o objetivo principal de desenvolver novas terapias para a anemia falciforme.

2.3. Objetivos específicos

- 1) Avaliar viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade da linhagem celular K562, após exposição a diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas de *Carica papaya* e hidroxiureia.
- 2) Caracterizar os efeitos das diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas de *Carica papaya*, comparativamente com a hidroxiureia, na expressão génica das globinas (HBA, HBB, HBG1 e HBG2), de genes reguladores de HbF (BCL11A e BGLT3) e de genes de modulação epigenética (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) na linha celular K562, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativo em tempo real.

3. Material e métodos

3.1. Folhas de *Carica papaya*

Obtiveram-se folhas de *Carica papaya* (Cp) num terreno doméstico, localizado em Faro, Portugal (Figura 3.1). Após colheita, as folhas foram transportadas para a ESTeSL, onde foram dispostas num tabuleiro tapado com papel de alumínio e secas à temperatura ambiente, durante 1 mês. Posteriormente, 82g das folhas já secas e sem vestígios de humidade, foram trituradas, com auxílio de um robot de cozinha Bimby®, programado a velocidade 10 e por 30 segundos, e acondicionadas em tubos Falcon® (**Figura 3.1**). Todo este processo foi realizado com o cuidado de manter as folhas ao abrigo da luz, recorrendo a papel de alumínio para as envolver.

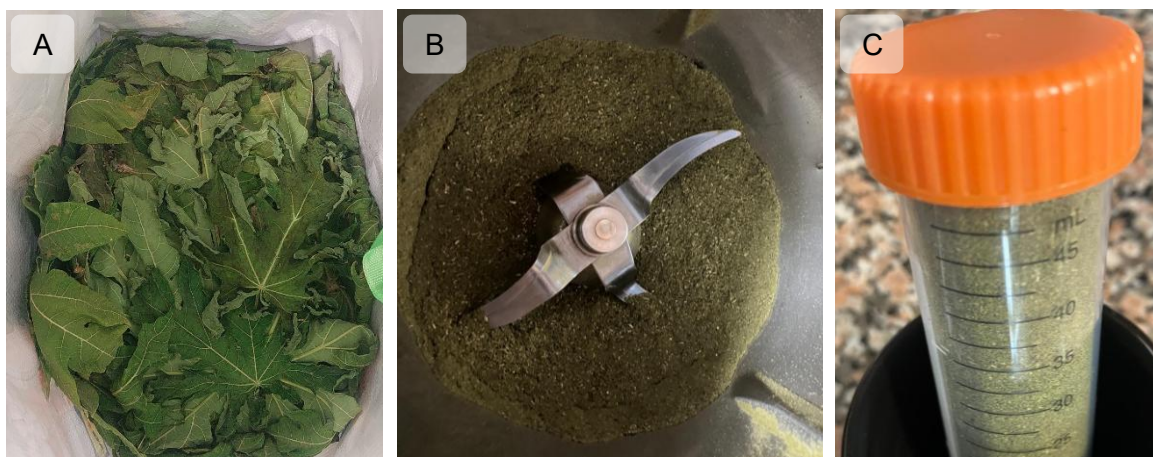


Figura 3.1 – Folhas de *Carica papaya*. (A) Após colheita; (B) Trituradas na Bimby®; (C) Acondicionadas em tubos Falcon®.

3.2. Extrato aquoso de folhas de *Carica papaya*

Num gobelé foram pesados 2,5g de folhas de Cp trituradas, com o auxílio de uma balança e uma espátula. Noutro gobelé foram aquecidos mais de 25mL de água destilada até atingir o ponto de ebulição (100°C), com recurso a uma placa térmica. Utilizando uma pipeta com pompete, juntou-se 25mL de água destilada a 100°C ao gobelé com 2,5g de folhas de Cp trituradas. Esta gobelé foi levado à placa de agitação magnética, sem aquecimento, de forma a sofrer agitação por agitador magnético, durante 15 minutos. A mistura foi então filtrada para dentro de um tubo Falcon®, com o auxílio de um funil de vidro e papel de filtro dobrado em funil de pregas/plissado (**Figura 3.2**).

O filtrado foi armazenado em tubo Falcon®, no frigorífico a 4°C, e envolto em papel de alumínio, mantendo-se assim ao abrigo da luz. Posteriormente, este foi sujeito a centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado, recorrendo a seringa e filtro millipore, tendo-se obtido o correspondente ao extrato aquoso de folhas de Cp (EAFCP).

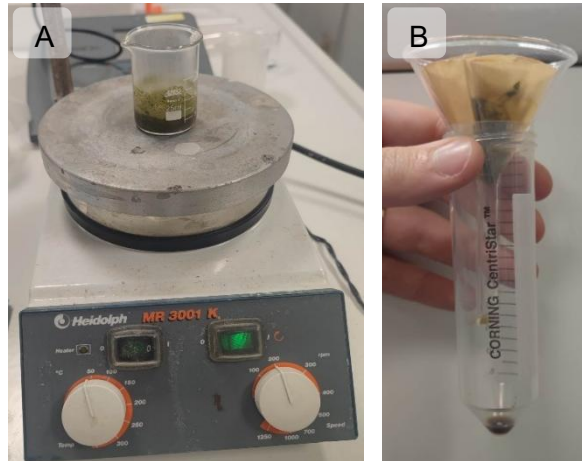


Figura 3.2 – Preparação de extratos aquosos de folhas de Cp. (A) Agitação magnética; (B) Filtração com papel de filtro.

3.3. Cultura de células

Em primeiro lugar realizou-se a preparação de componentes, antecipadamente, para que depois de todos os reagentes necessários reunidos, proceder-se à manipulação das culturas celulares em meio controlado. A manipulação das células, bem como a preparação de reagentes, foi sempre realizada em câmara de fluxo laminar, desinfetada com lixívia e álcool e previamente tratada com luz ultravioleta (UV), de forma a garantir condições de esterilidade (**Figura 3.3**), e de acordo com o Protocolo de Cultura Celular anexado (**Anexo I**).

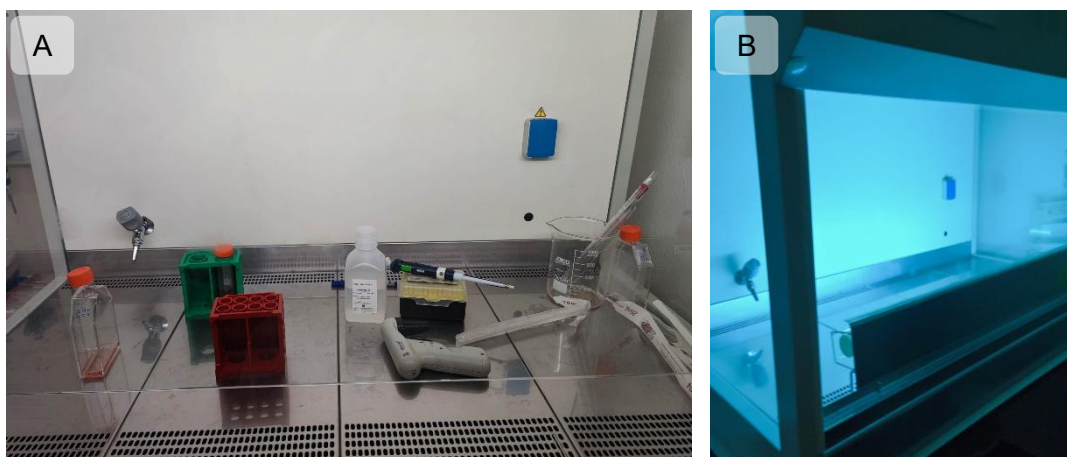


Figura 3.3.3 – Câmara de fluxo laminar. (A) Durante passagem celular; (B) Irradiada com luz UV.

3.3.1. Linhagem K562

As células K562 foram adquiridas à *European Collection of Cell Cultures* e são células imortalizadas e não aderentes, que crescem em suspensão em meio de cultura apropriado. Apresentam morfologia semelhante à de linfoblastos e derivam da medula óssea. São caracterizadas por um núcleo proeminente, volumoso, e citoplasma basofílico, sem grânulos visíveis, sendo estas características típicas de células indiferenciadas da linhagem mieloide. Como tal, as células K562 proliferam de forma rápida e homogênea, com tempo de duplicação estimado entre 18 e 24 horas, o que as torna particularmente adequadas para estudos funcionais e farmacológicos [160].

Segundo o *American Type Culture Collection*, a manutenção desta linhagem celular requer a renovação do meio de cultura a cada 2 a 3 dias, iniciando-se novas culturas com uma densidade celular de aproximadamente 1×10^5 células/mL, e realizando subculturas quando a densidade atinge 1×10^6 células/mL, geralmente em frascos de 75 cm^2 [162]al como referido também no **Anexo I**.

A linhagem K562 apresenta plasticidade celular significativa, exibindo a capacidade de sofrer diferenciação eritroide em resposta a estímulos químicos, tais como hemina, ácido butírico ou ara-C. Esta propriedade é particularmente relevante no estudo de doenças hematológicas como a anemia falciforme e a talassemia, uma vez que permite a indução da expressão de HbF [163], [164].

Por este motivo, as células K562 são amplamente utilizadas na investigação de mecanismos moleculares envolvidos na regulação da transição entre diferentes tipos de hemoglobina ao longo do desenvolvimento humano. A possibilidade de manipular a expressão de HbF nestas células tem implicações terapêuticas importantes, dado que o aumento dos níveis de HbF pode atenuar os sintomas clínicos associados à presença de hemoglobina S na anemia falciforme, como já anteriormente referido [163], [164], [165].

3.3.2. Reagentes

Para a cultura e manipulação de células de linhagem K562, utilizaram-se como reagentes:

- RPMI 1640 contendo L-Glutamina (Catalog Number: L0500-500, Biowest), utilizado como meio de cultura;
- Soro fetal bovino (FBS), utilizado enquanto suplemento do meio de cultura, em proporção 10% (v/v);
- Antibiótico, composto por 200mM de L-Glutamina, 10000 U de penicilina e 10mg/mL de streptomina (Product Number: G6784, Sigma-Aldrich), utilizado enquanto suplemento ao meio de cultura, em proporção 1% (v/v);

- Tampão fosfato salino (PBS) estéril (Catalog Number: E504-500ML, VWR), utilizado na lavagem de células;
- Solução de azul de tripano (Catalog Number: T8154-100ML, Sigma), utilizado para identificar células não viáveis em contagem celular;
- Recovery™ – Cell Culture Freezing Medium, contendo DMSO (Catalog Number: 12648-010, Gibco), utilizado enquanto meio criopreservante.

Alguns destes reagentes foram preparados com antecedência, de forma a serem reconstituídos e a obter as concentrações pretendidas de cada um deles, utilizando água destilada esterilizada ou DMSO, de acordo com as indicações protocoladas pelo fabricante e as especificidades de cada cultura e linhagem celular em causa.

3.3.3. Manutenção e manipulação

A linhagem de células K562 encontrava-se inicialmente criopreservada, sendo por isso submetida ao processo de descongelação, que deve ser rápido. De seguida foi realizada a passagem de células em suspensão para um frasco-T, com lavagem das mesmas com PBS, e ressuspensão em meio de cultura novo. Para este efeito, foram utilizados os reagentes anteriormente descritos e a metodologia descrita no protocolo fornecido em anexo (**Anexo I**). Entre cada passagem de células, espaçadas de 2 a 3 dias entre si, as subculturas de células foram incubadas em atmosfera humidificada, 37°C e com 5% (v/v) de CO₂, até a sua densidade estabilizar em 1 x 10⁵ células/mL. Para esse efeito, antes e após cada subcultura, foi observada a confluência, morfologia, proliferação e viabilidade celular, com recurso a microscópio ótico invertido com contraste.

3.4. Exposição celular

Utilizando tubos Falcon® de 15mL, foram preparados 4 meios de exposição celular: Controlo (C), HU, 1:10 e 1:50. No Controlo adicionaram-se somente 12 mL de meio de cultura para as células em estudo. No HU utilizaram-se 10,8 mL de meio de cultura para as células em estudo e 1,2 mL de solução de HU de concentração 5 mg/mL (resultando na concentração final de 0,5mg/mL de HU), obtida pela diluição de uma cápsula de 500 mg de HU em 100 mL de água ultrapura, anteriormente aliqüotada e armazenada a -20 °C. No 1:10 utilizaram-se 10,8 mL de meio de cultura para as células em estudo e 1,2 mL de EAFCP. No 1:50 utilizaram-se 11,76 mL de meio de cultura para as células em estudo e 0,24 mL de EAFCP.

De forma a inferir a concentração de células viáveis presentes em suspensão, realizou-se a contagem de células com azul de tripano, de acordo com o protocolo em anexo

(Anexo I), onde foram contabilizadas as células viáveis recorrendo à câmara de *Newbauer*, também designada por hemacitómetro, após adição de solução de azul de tripano à suspensão celular.

A partir desta contagem, foram realizados os cálculos de forma a ditar a quantidade de suspensão celular a adicionar a cada meio de exposição, tendo em conta que neste caso era pretendida uma concentração de aproximadamente $3,6 \times 10^6$ células para um total 13 mL de solução de meio de exposição celular contendo células. Tendo-se obtido uma concentração de $3,7 \times 10^6$ células por mL, foi adicionado 1 mL de suspensão celular a cada tubo Falcon® já contendo os meios de exposição.

De seguida, as soluções de meios de exposição contendo células foram distribuídas em: placas de 6 poços (P6), para análise de viabilidade celular e extração de RNA, num volume de 3 mL por poço; e em placas de 96 poços (P96), para análise de proliferação celular e citotoxicidade, num volume de 100 μ L.

Foram realizados triplicados biológicos por condição, sendo que no caso específico de análise da citotoxicidade foi ainda acrescentado um triplicado biológico contendo somente meio de cultura celular, sem células, constituindo o Branco (B).

As placas foram organizadas de acordo com o esquema da **Figura 3.4**, e incubadas num ambiente húmido a 37°C com 5% (v/v) de CO₂ durante 24h, sendo posteriormente retiradas para a análise de proliferação, viabilidade celular e citotoxicidade.

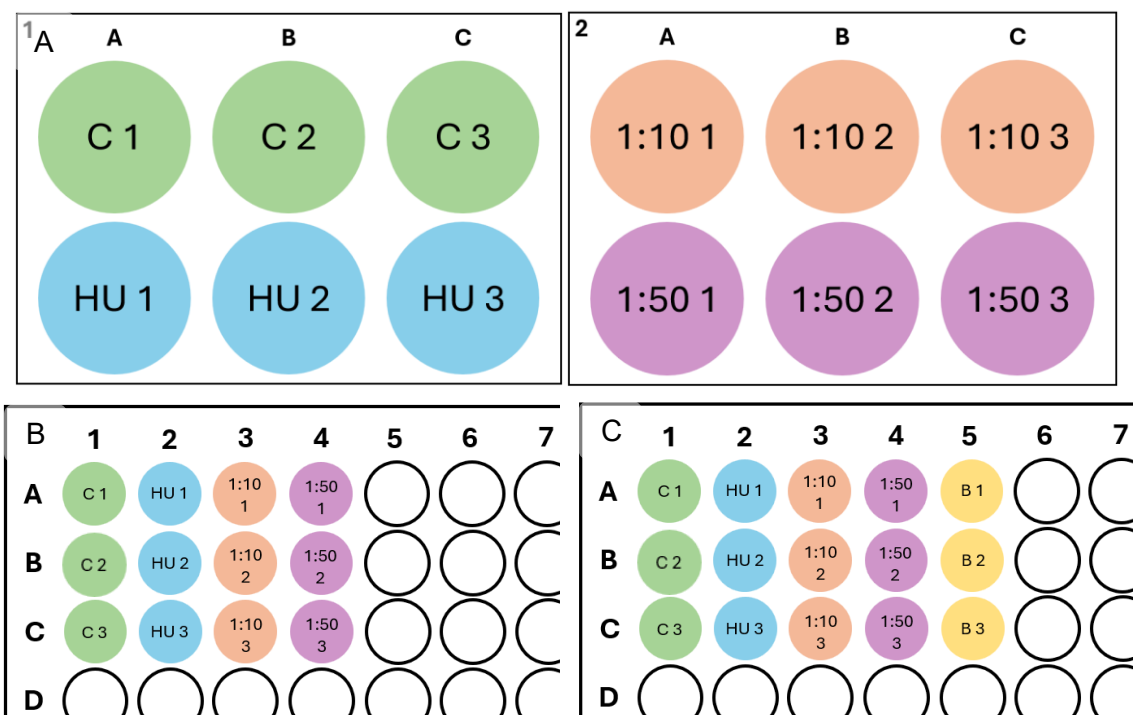


Figura 3.4 – Esquema representativo da organização das placas. (A) Duas P6 para análise da viabilidade celular e extração de RNA; (B) Uma P96 para análise de proliferação celular (apresentação parcial); (C) Uma P96 para análise de citotoxicidade (apresentação parcial).

3.5. Análise da viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade

3.5.1. Viabilidade e proliferação celulares com azul de tripano

De forma a avaliar a viabilidade celular, após exposição de 24 horas aos vários compostos, foi realizado um ensaio de exclusão utilizando azul de tripano, que se assemelha à contagem de células viáveis enunciada anteriormente, e conforme descrito no **Anexo I**. Esta técnica permite estimar o número de células viáveis, através da contagem de células em suspensão na câmara de *Newbauer*.

O procedimento consistiu na adição da solução de azul de tripano anteriormente referida à suspensão celular, sendo a mistura posteriormente distribuída na câmara de *Newbauer* por capilaridade. As células viáveis, cuja membrana celular se mantenha íntegra e impermeável ao corante, permanecem translúcidas e bem definidas, enquanto que as células inviáveis apresentam citoplasma azul, devido à absorção do corante em função da perda da integridade da membrana [166], [167]. Essa distinção visual possibilitou a diferenciação das células durante a observação ao microscópio e respetiva contagem (**Figura 3.5**).

A quantificação celular foi realizada utilizando um microscópio invertido com contraste de fase e ampliação de 20x, permitindo a contagem das células vivas e mortas. Com base nesses dados, foram determinadas a taxa de proliferação celular e a percentagem de viabilidade celular, seguindo os cálculos apresentados no **Anexo I**. Este método possibilitou uma avaliação e caracterização detalhada dos impactos dos compostos testados, aos quais as células foram expostas, na manutenção da viabilidade e proliferação celulares.

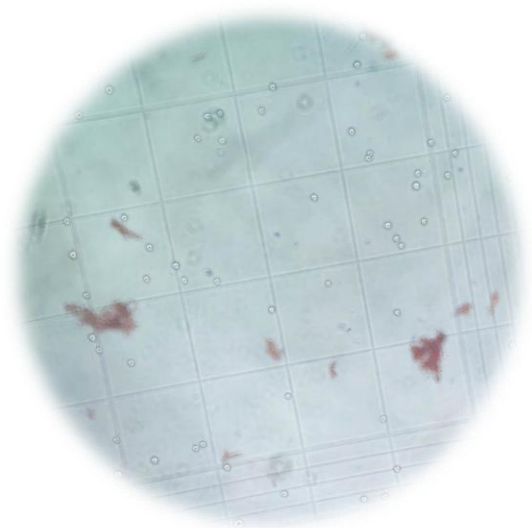


Figura 3.5 – Visualização de células, viáveis e inviáveis, numa câmara de *Newbauer*, com recurso a microscópio invertido com contraste de fase e ampliação de 20x.

3.5.2. Viabilidade e proliferação celulares com CellTiter-Blue

O ensaio de viabilidade e proliferação celulares utilizando CellTiter-Blue, descrito detalhadamente no **Anexo II**, constitui uma metodologia amplamente utilizada em estudos de biologia celular, bem como no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Trata-se de uma técnica sensível, simples e pouco invasiva, que permite avaliar a viabilidade e proliferação celulares com base na atividade metabólica das células, sendo uma boa opção na seleção de candidatos terapêuticos.

Este método assenta na redução da resazurina, um corante azul não fluorescente, devido à sua conversão em resorufina, um composto cor-de-rosa fluorescente, processo que ocorre exclusivamente em células metabolicamente ativas. Assim, a intensidade da cor ou da fluorescência gerada é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis presentes na amostra [168].

Na prática experimental, as células foram expostas aos compostos de interesse, anteriormente mencionados, sendo posteriormente incubadas durante 24 horas a 37 °C, com 5% (v/v) de CO₂, em P96, com um volume final de 100 µL por poço. Após este período de incubação, adicionaram-se 20 µL de reagente CellTiter-Blue, contendo resazurina, em cada poceto, seguindo-se nova incubação das células, sob as mesmas condições.

Seguidamente, a fluorescência resultante da conversão metabólica da resazurina foi medida a 560/590 nm, utilizando um espectrofotómetro de fluorescência. Este ensaio proporciona resultados em tempo real e adapta-se a diferentes tipos celulares, sendo particularmente útil na monitorização de alterações na proliferação e viabilidade celular. Apesar das suas vantagens, o CellTiter-Blue apresenta limitações, nomeadamente por não permitir a identificação de mecanismos moleculares subjacentes à citotoxicidade nem fornecer informação sobre alterações morfológicas ou vias de morte celular. Além disso, a sua aplicabilidade pode ser limitada em culturas de longa duração. Ainda assim, a informação obtida através deste ensaio contribuiu de forma significativa para a compreensão dos efeitos dos compostos testados, fornecendo dados quantitativos essenciais para a avaliação da sua segurança e eficácia.

3.5.3. Citotoxicidade com CytoTox 96

O ensaio CytoTox 96, descrito detalhadamente no **Anexo III**, é uma ferramenta valiosa na avaliação da citotoxicidade celular, sendo amplamente utilizado em estudos de biologia celular e toxicologia. Trata-se de um método não-radioativo que permite quantificar a extensão dos danos celulares através da deteção da libertação de lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citoplasmática ubíqua na maioria dos tipos celulares.

A presença de LDH no meio extracelular indica perda de integridade da membrana citoplasmática, fenómeno frequentemente associado à morte celular. Assim, a medição da atividade da LDH libertada permite estimar com precisão o grau de citotoxicidade induzido por determinados compostos ou condições experimentais [169], [170].

Na prática experimental, as células foram expostas aos compostos de interesse, anteriormente mencionados, sendo posteriormente incubadas durante 24 horas a 37 °C, com 5% (v/v) de CO₂, em P96, com um volume final de 100 µL por poço. De seguida, parte do conteúdo de cada poço é transferido para uma nova placa, onde se adiciona o reagente CytoTox 96. Após uma incubação de 30 minutos ao abrigo da luz, é adicionada uma solução de paragem e a leitura da absorvância é realizada a 490 ou 492 nm, através de um leitor de fluorescência de microplacas.

Este método, ao dispensar o uso de materiais radioativos, representa uma alternativa segura e ambientalmente responsável. Apresenta também elevada sensibilidade e aplicabilidade a diversos tipos e condições celulares, enquanto fornece dados quantitativos fiáveis. Contudo, as suas limitações prendem-se com o facto de fornecer uma medição num único ponto temporal, não permitindo o acompanhamento dinâmico da citotoxicidade, bem como o facto de não fornecer informação sobre os mecanismos moleculares subjacentes aos danos celulares eventualmente identificados.

Apesar destas restrições, o ensaio CytoTox 96 revelou-se uma ferramenta crucial na avaliação do impacto citotóxico dos compostos testados, complementando eficazmente os dados obtidos por outros métodos de análise de viabilidade e proliferação celular.

3.6. Extração de RNA e síntese de cDNA (RT)

Após exposição a EAFCP e a execução das contagens com azul de tripano, para avaliação da viabilidade e proliferação celulares, as células K562 sobranes nas P6, foram passadas para tubos Falcon® de 15mL, de acordo com o tipo de exposição a que foram sujeitas. Cada uma destas amostras foi centrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos, seguindo-se o descarte do sobrenadante e a ressuspensão do precipitado em 3 mL de PBS. Após nova centrifugação e descarte e aspiração de todo o sobrenadante, obteve-se o *pellet* de células seco, que foi armazenado a -80°C.

A partir deste *pellet* de células, procedeu-se à extração de RNA total, com recurso ao kit “*miRNeasy Mini Kit*”, da casa comercial *Quiagen*, cujo protocolo de encontra discriminado no **Anexo IV**. Este protocolo visa a extração de RNA intacto, respeitando por isso quatro etapas essenciais: lise das células e/ou do tecido; inativação da atividade de ribonucleases (RNases) endógenas; desnaturação dos complexos proteicos do núcleo; e remoção do DNA e de proteínas contaminantes da amostra. Releva-se ainda

que, após extração de RNA, e sendo este estruturalmente instável, as amostras deverão estar sempre envoltas em gelo, mesmo durante a sua manipulação.

Adicionalmente, foi criada uma *pool* de RNA total, obtida pela junção de partes iguais de cada uma das amostras individuais, e que visa representar o grupo de amostras de forma global, refletindo uma concentração média e atenuando variações individuais. A sua aplicação principal prende-se com o cálculo da eficiência do qPCR através da realização de curvas de calibração, permitindo desta forma analisar se é possível comparar diretamente os padrões de expressão dos diferentes genes analisados.

Para a quantificação do RNA extraído e a avaliação da sua pureza, recorreu-se à medição da absorvância a 260 nm (A260), utilizando o equipamento *NanoDrop™ One*, da casa comercial *Thermo Scientific*, utilizando um volume de amostra de 1 µL. Esta metodologia baseia-se na capacidade que os ácidos nucleicos têm para absorverem radiação ultravioleta a 260 nm, permitindo a estimativa da concentração de RNA, de forma rápida e fiável [171].

A pureza do RNA foi avaliada através dos rácios de absorvância 260/280 e 260/230, calculados automaticamente pelo equipamento mencionado, uma vez serem parâmetros fundamentais para a verificação da qualidade dos ácidos nucleicos extraídos [172], [173]. No **Apêndice I** encontram-se descritos os resultados da quantificação de RNA, onde constam as concentrações de RNA de cada amostra, em ng/µL, e os rácios mencionados.

O rácio 260/280 resulta da relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm, sendo um indicador da presença de contaminantes proteicos. Um valor ideal, próximo de 2,0, é geralmente interpretado como evidência de elevada pureza do RNA, com contaminação proteica mínima. Pelo contrário, valores inferiores a 1,8 podem indicar contaminação por proteínas ou compostos fenólicos, podendo comprometer etapas de aplicações subsequentes, como a transcrição reversa ou a análise da expressão génica [172], [174].

Por outro lado, o rácio 260/230 avalia a presença de contaminantes que absorvem a 230 nm, como compostos orgânicos fenólicos, hidratos de carbono ou sais (por exemplo isotiocianato de guanidina). Um valor ideal deste rácio ronda igualmente os 2,0, sendo que desvios significativos deste valor podem refletir a presença de impurezas que afetam negativamente a integridade do RNA e a eficiência de aplicações moleculares posteriores [173], [175].

Depois de quantificado o RNA extraído, cada amostra foi diluída em água sem RNases (*RNase-free water*), de forma a obter amostras com 1,5 µg de RNA, num volume final 14 µL (concentração final de aproximadamente 107 ng/µL). Já a *pool* foi diluída,

igualmente em *RNase-free water*, de forma a obter uma nova *pool* contendo 2 µg de RNA, num volume final de 14 µL (concentração final de aproximadamente 143 ng/µL). A partir do RNA total extraído e diluído, realizou-se síntese de DNA complementar (cDNA) por intermédio da enzima transcriptase reversa (RT), com utilização do kit “*Supreme NZY Reverse Transcriptase 1 kU/µL*”, da casa comercial *NZYtech*, cuja metodologia aplicada se encontra discriminada no **Anexo V**. Tendo obtido um volume final de 20 µL de cDNA, para cada uma das 12 amostras, e sabendo que tínhamos uma concentração alta do mesmo, optou-se por realizar uma diluição de proporção 1:4. Desta forma obtiveram-se amostras de cDNA menos concentradas, com volume final de 80 µL, permitindo a sua melhor rentabilização.

O cDNA gerado para a *pool* de amostras, foi também quantificado (**Apêndice I**), com recurso ao equipamento *NanoDrop™ One*, da casa comercial *Thermo Scientific*, utilizando o leitor de DNA de cadeia dupla, que quantifica as moléculas de cDNA ainda ligadas ao RNA de origem.

3.7. Amplificação por qPCR

Posteriormente procedeu-se à amplificação por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real, realizada com recurso ao equipamento de deteção de PCR em tempo real *CFX Connect*, da casa comercial *Bio-Rad*, e à mistura de reação “*NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x)*” pronta a usar, da casa comercial *NZYtech*.

De forma a provar replicabilidade e obter resultados robustos, foram executados ensaios em triplicado para cada réplica biológica. Os primers relativos a cada gene, que permitiram o estudo da expressão genética, foram elaborados pela equipa do H&TRC, estando descritos na **Tabela 3.1**.

Quanto ao fundamento teórico e procedimento da técnica RT-qPCR (PCR quantitativo com transcriptase reversa) aplicada, estão contemplados no **Apêndice II**.

Tabela 3.1 – Sequência e temperatura de *melting* (T_m) de cada primer utilizado na RT-qPCR.

Função	Gene	Sequência do primer (5' → 3')		T _m (°C)
Referência	GAPDH	<i>Forward</i>	TTCCTCTGACTTCAACAGCGAC	58,05
		<i>Reverse</i>	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATT	56,95
	ActinB	<i>Forward</i>	AGGCCAACCGCGAGAAG	56,0
		<i>Reverse</i>	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	49,7
Globinas	HBA	<i>Forward</i>	TCCCCACCACCAAGACCTAC	60,84
		<i>Reverse</i>	CCTTAACCTGGGCAGAGCC	60,08
	HBB	<i>Forward</i>	GCACGTGGATCCTGAGAACT	59,75

		<i>Reverse</i>	GCCACCACTTTCTGATAGGC	58,62
	HBG1	<i>Forward</i>	TGGATGATCTCAAGGGCAC	58,0
		<i>Reverse</i>	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTTGA	47,2
	HBG2	<i>Forward</i>	GATGCCATAAAGCACCTGGATG	49,7
		<i>Reverse</i>	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTTGA	47,2
Sinalização	BCL11A	<i>Forward</i>	ATGCACAAATCGTCCCCCAT	57,30
		<i>Reverse</i>	GTCCTCCTCTTCCTCCTCGT	57,84
	BGLT3	<i>Forward</i>	ACAAACCAGCATCCTGAACC	55,6
		<i>Reverse</i>	GTCTCATGTGCTGCACGTCT	57,7
Moduladores epigenéticos	HDAC1	<i>Forward</i>	GGAAATCTATCGCCCTCACA	54,3
		<i>Reverse</i>	AACAGGCCATCGAATACTGG	54,8
	HDAC2	<i>Forward</i>	CTGTTAATTGGGCTGGAGGA	54,6
		<i>Reverse</i>	AATTCAAGGATGGCAAGCAC	53,9
	HDAC3	<i>Forward</i>	GGACCAGATCCTCCAGACAA	56,1
		<i>Reverse</i>	CAGCCTCATCAGTCCTGTCA	56,5
	HDAC8	<i>Forward</i>	TTCCAGAGCTGAGGAGTGGT	57,9
		<i>Reverse</i>	ACTTGATGCCCTTGGAAT	54,7
	DNMT1	<i>Forward</i>	CCTCCAAAACCCAGCCAAC	56,9
		<i>Reverse</i>	TCCAGGACCCTGGGGATTTC	59,0
	DNMT3a	<i>Forward</i>	CCAACATCGAATCCATGAAA	50,7
		<i>Reverse</i>	CTTGCGCTTGCTGATGTAGT	55,7
	DNMT3b	<i>Forward</i>	CGAATTTTACCACCTGCTGAATT	53,9
		<i>Reverse</i>	AGAACGGCCGGTCATCAC	57,8

No que concerne à técnica de RT-qPCR, a eficiência de PCR tem grande impacto na fiabilidade, reprodutibilidade e precisão dos resultados, medindo a eficácia com que a amostra é amplificada em cada ciclo de PCR. Idealmente, esta eficiência encontra-se próxima de 100%, sendo aceitáveis valores entre 90 e 110%. Variações da eficiência superiores a 10% podem indicar problemas nas condições de reação e/ou nos reagentes [176], [177], [178].

Assim sendo, numa fase inicial realizaram-se os testes de eficiência da técnica, recorrendo a diluições seriadas do cDNA gerado pela *pool* de amostras, para todos os genes em estudo, de forma a validar e otimizar o protocolo, assegurando a especificidade das ligações entre o cDNA e os primers utilizados para cada gene [176], [177], [178].

Para o cálculo da eficiência de cada ensaio RT-qPCR, é utilizado o declive da curva padrão, obtida após definir corretamente a linha de base e o limiar, aplicado na seguinte equação [176], [177], [178]:

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

Neste estudo, procedeu-se à comparação dos níveis de expressão génica entre as diferentes amostras, recorrendo à técnica de quantificação relativa por RT-qPCR. Os dados experimentais foram obtidos através do *software CFX Manager*, que forneceu os valores de quantificação (Cq ou Ct) para cada amostra. A análise seguiu o método $\Delta\Delta Ct$, permitindo calcular com precisão as diferenças relativas entre a expressão do gene de interesse e a do respetivo controlo interno (genes de referência), de forma a normalizar assim possíveis variações entre as reações de PCR.

Para a normalização dos valores Ct referentes à expressão de cada gene em estudo, foram selecionados os genes de referência *GAPDH* e *ActinB*, amplamente reconhecidos como tal pela sua expressão estável, garantindo uma padronização robusta dos resultados. As fórmulas abaixo traduzem a implementação prática desta normalização:

$$\Delta Ct_{(amostra)} = \Delta Ct_{(gene\ interesse)} - \Delta Ct_{(gene\ referência)}$$

$$Referência = \Delta Ct_{(controlo)} = \Delta Ct_{(controlo\ gene\ interesse)} - \Delta Ct_{(controlo\ gene\ referência)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra)} - \Delta Ct_{(controlo)}$$

$$Quantificação\ relativa = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Por fim, os valores de quantificação relativa foram ainda transformados em escala logarítmica de base 2, de forma que os aumentos da expressão génica fossem identificados com valores positivos, enquanto as diminuições desta fossem identificadas com valores negativos.

Destaca-se que, no caso particular da comparação dos grupos de exposição HU, 1/10 e 1/50 com o Controlo, foram utilizados os valores de ΔCt (amostra) para calcular a quantificação relativa, em vez de $\Delta\Delta Ct$.

Como referido anteriormente, e de forma a aumentar a robustez e o poder estatístico dos dados, cada reação foi realizada em triplicado, permitindo reduzir o impacto de eventuais variações experimentais. Os valores obtidos para cada réplica biológica foram, posteriormente, analisados em termos da média e do desvio padrão dos três replicados, garantindo uma representação estatística rigorosa e consistente dos níveis de expressão em todas as condições experimentais avaliadas.

3.8. Análise estatística de resultados

A análise estatística dos dados relativos à viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade, expressão génica na linha celular K562, e análise de eficiências, foi conduzida com o apoio dos *softwares Microsoft Excel 365* e *Jamovi*, assegurando um tratamento rigoroso e cientificamente adequado dos resultados obtidos. Para caracterizar os dados, foram determinados parâmetros estatísticos descritivos, nomeadamente a média, o desvio padrão e o erro padrão da média.

A avaliação da significância estatística das diferenças observadas entre os grupos de exposição HU, 1/10 e 1/50, foi realizada através de teste paramétrico ANOVA a um fator, seguido por um teste de comparações múltiplas de Tukey, com o objetivo de comparar as médias de grupos independentes (grupo de controlo e cada um dos grupos de exposição). Antes da sua aplicação, os resultados foram testados quanto à sua Normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e quanto à Homogeneidade da Variância, pelo teste de Levene. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas para valores de p inferiores a 0,05.

Por outro lado, a avaliação da significância estatística das diferenças observadas entre os grupos de exposição e o Controlo, foi realizada através de testes paramétricos ou não paramétricos, de acordo com a normalidade e variância dos dados. Assim, os resultados foram primeiramente testados quanto à sua Normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e quanto à Homogeneidade da Variância, pelo teste de Levene. De acordo com estes resultados: para dados aproximadamente normais e variâncias idênticas, utilizou-se o teste t de Student (paramétrico); para dados aproximadamente normais, mas com variâncias diferentes, utilizou-se o teste t de Welch (paramétrico); e para dados que não seguem normalidade, utilizou-se teste U de Mann-Whitney (não paramétrico). Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas para valores de p inferiores a 0,05.

4. Resultados

Neste projeto foram avaliados os efeitos de EAFCP na viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade, bem como a sua influência na expressão génica diferencial das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), de genes reguladores de HbF (*BCL11A* e *BGLT3*) e de genes de modulação epigenética (*HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*). Para esse efeito, recorreu-se a cultura celular de linhagem K562 e utilizou-se como comparação a hidroxiureia, sendo este um fármaco já estabelecido para o tratamento de DCF, promovendo o aumento de HbF.

4.1. Viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade

A viabilidade celular, utilizada para avaliar a influência dos compostos em estudo na viabilidade celular, foi determinada através da divisão do número de células viáveis pelo número de células totais (viáveis e não viáveis), e multiplicação por 100 para obtenção de percentagem. Assim, estes resultados indicam a percentagem de células que continuam viáveis depois das 24 horas de exposição.

Já a taxa de proliferação celular, utilizada para quantificar a multiplicação/divisão celular, foi calculada através da subtração entre as células viáveis após exposição aos compostos em estudo e as células viáveis anteriores à exposição. Neste caso, anteriormente à exposição, foram contabilizadas aproximadamente 3×10^5 células viáveis por mL, em cada poço. Assim, estes resultados indicam a quantidade de novas células, conseguidas por divisão celular, após as 24 horas de exposição.

A viabilidade celular e a taxa de proliferação celular foram determinadas após 24 horas de exposição das células K562 aos meios de exposição C, HU, 1/10 e 1/50, correspondendo estes respetivamente aos meios: controlo, contendo hidroxiureia, contendo EAFCP com diluição 1:10 e contendo EAFCP com diluição 1:50. Estes resultados, para cada exposição, observam-se graficamente nas **Figuras 4.1 e 4.2**.

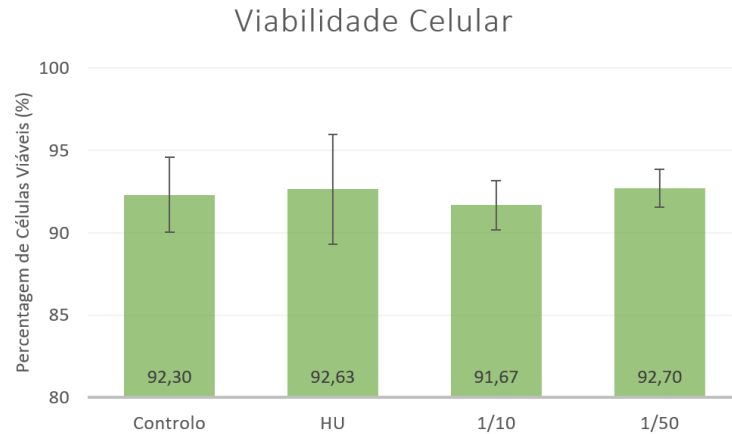


Figura 4.1 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na viabilidade das células K562.

Viabilidade das células K562 após 24 horas de exposição ao meio de cultura RPMI (Controlo), aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. As variações estatisticamente significativas em relação ao Controlo foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01.

Os triplicados HU demonstraram uma viabilidade celular percentual média, com azul de tripano, de 92,63%, enquanto os triplicados EAFCP com diluições 1/10 e 1/50 apresentaram 91,67% e 92,70%, respetivamente. Em comparação, nos triplicados Controlo observou-se uma média de 92,30% de viabilidade celular.

Assim, podemos afirmar que a viabilidade celular parece ser máxima no grupo de tratamento 1/50, e mínima para 1/10, embora não tenham sido identificadas diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos.

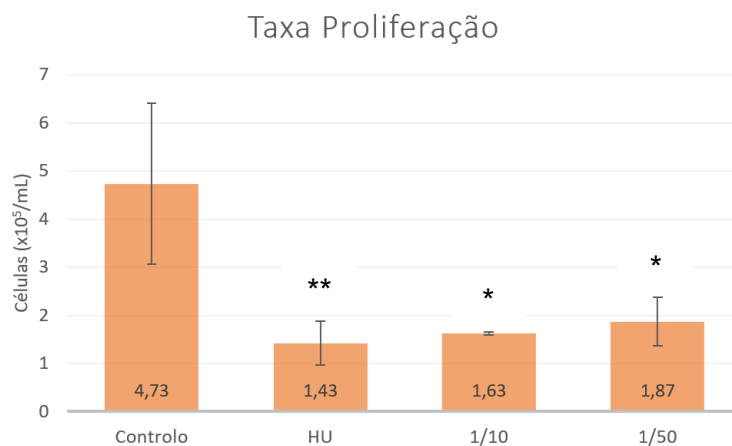


Figura 4.2 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na proliferação das células K562.

Proliferação das células K562 após 24 horas de exposição ao meio de cultura RPMI (Controlo), aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. As variações estatisticamente significativas em relação ao Controlo foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **<0,01.

Relativamente à taxa de proliferação com azul de tripano, os triplicados HU demonstraram uma média de 1,43x10⁵ células por mL, enquanto os triplicados EAFCP

com diluições 1/10 e 1/50 apresentaram $1,63 \times 10^5$ e $1,87 \times 10^5$ células por mL, respetivamente. Em comparação, nos triplicados Controlo observou-se uma média de $4,73 \times 10^5$ células por mL.

Assim, podemos afirmar que o grupo Controlo apresenta proliferação celular substancialmente superior aos outros, enquanto que o grupo HU apresenta a menor taxa de proliferação identificada. Neste caso, é evidente uma variação estatisticamente significativa na redução dos grupos HU, 1/10 e 1/50, quando comparados com o grupo Controlo.

Por sua vez, os resultados dos ensaios CellTiter-Blue e CytoTox 96 estão graficamente representados nas **Figuras 4.3 e 4.4**. Os resultados dos ensaios com CellTiter-Blue e com CytoTox 96 indicam viabilidade celular relativa e efeitos citotóxicos relativos, respetivamente, após as 24 horas de exposição.

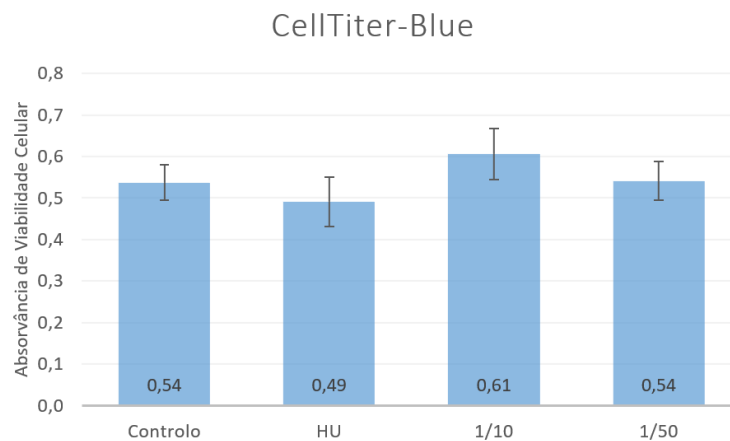


Figura 4.3 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na viabilidade das células K562, de acordo com o ensaio CellTiter-Blue.

Viabilidade das células K562 após 24 horas de exposição ao meio de cultura RPMI (Controlo), aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. As variações estatisticamente significativas em relação ao Controlo foram avaliadas através do teste ANOVA, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Através do ensaio CellTiter-Blue, os triplicados HU demonstraram uma viabilidade celular com absorvância média de 0,49, enquanto os triplicados EAFCP com diluições 1/10 e 1/50 apresentaram 0,61 e 0,54, respetivamente. Em comparação, nos triplicados Controlo observou-se uma média de 0,54 de viabilidade celular.

Assim, podemos afirmar que a viabilidade celular, neste caso, parece ser máxima no grupo de tratamento 1/10, e mínima para HU. No entanto, não foram identificadas

diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos, sendo até evidentes as semelhanças entre o grupo Controlo e 1/50.

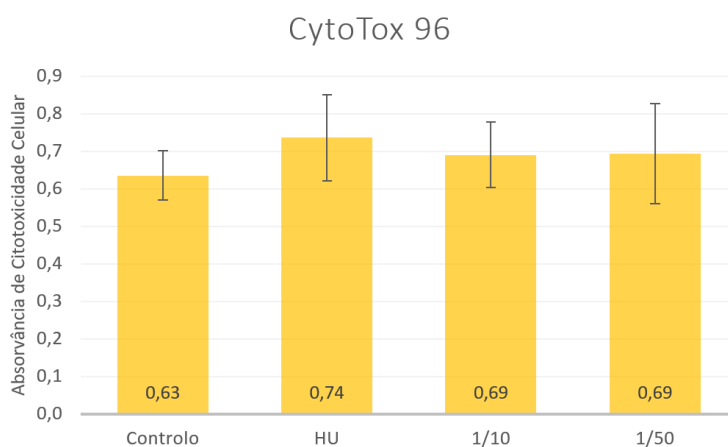


Figura 4.4 - Avaliação do impacto de EAFCP e HU na citotoxicidade das células K562, de acordo com o ensaio CytoTox 96.

Citotoxicidade das células K562 após 24 horas de exposição ao meio de cultura RPMI (Controlo), aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. As variações estatisticamente significativas em relação ao Controlo foram avaliadas através do teste ANOVA, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Através do ensaio CytoTox 96, os triplicados HU demonstraram uma citotoxicidade com absorvância média de 0,74, enquanto os triplicados EAFCP com diluições 1/10 e 1/50 apresentaram ambos 0,69. Em comparação, nos triplicados Controlo observou-se uma média de 0,63 de toxicidade celular.

Assim, podemos afirmar que a citotoxicidade, neste caso, parece ser máxima no grupo de tratamento HU, e mínima para o grupo Controlo, como esperado. No entanto, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos, tendo até sido evidentes as semelhanças entre os dois grupos EAFCP, 1/10 e 1/50.

4.2. Eficiência de amplificação por RT-qPCR

Tendo em conta a importância dos ensaios RT-qPCR, realizados neste projeto para quantificação relativa da expressão genética, foi crucial o cálculo e conhecimento das eficiências da técnica de PCR. Desta forma, possibilitou-se a sua otimização, através da correção de variações da amplificação e um exame exaustivo da metodologia, diluições e técnicas de pipetagem. Foram considerados valores de eficiência aceitáveis quando no intervalo 90% a 110%, com eventuais desvios ligeiros.

Os resultados de eficiências de RT-qPCR obtidos para cada gene encontram-se dispostos na **Tabela 4.1**, sendo estes cruciais para a quantificação exata da expressão genética, assegurando a minimização de erros e a comparabilidade entre amostras.

Tabela 4.1 – Eficiência dos ensaios RT-qPCR para cada gene em estudo.

Função	Gene	Eficiência (%)
Referência	<i>GAPDH</i>	96
	<i>ActinB</i>	92
Globinas	<i>HBA</i>	88
	<i>HBB</i>	118
	<i>HBG1</i>	92
	<i>HBG2</i>	89
Sinalização	<i>BCL11A</i>	-----
	<i>BGLT3</i>	114
Moduladores epigenéticos	<i>HDAC1</i>	104
	<i>HDAC2</i>	97
	<i>HDAC3</i>	98
	<i>HDAC8</i>	89
	<i>DNMT1</i>	99
	<i>DNMT3a</i>	130
	<i>DNMT3b</i>	97

Destaca-se aqui que os genes *HBB*, *BGLT3* e *DNMT3a* demonstraram eficiência fora do intervalo de valores individuais (90 a 110%), tendo sido no entanto aceites para progressão do estudo e análise seguintes. Já para o gene *BCL11A*, não foi conseguida validação da sua eficiência, pelo que não se pode afirmar que os resultados relativos a esse gene sejam fidedignos e reproduzíveis.

4.3. Expressão génica

Todos os dados que se seguem são representativos da expressão genética nas células de linhagem K562, após 24 horas de exposição aos meios em estudo, tendo sido obtidas pela técnica de quantificação por RT-qPCR e da metodologia $\Delta\Delta C_t$, anteriormente apresentada, que já tem em conta o grupo Controlo. Os valores de C_t foram normalizados de acordo com os genes de referência, *GAPDH* e *ActinB*, como anteriormente enunciado.

No entanto, o gene de referência *ActinB* demonstrou grande variabilidade entre condições e réplicas, chegando a ter uma variação de até 5 ciclos RT-qPCR entre amostras, ao contrário do gene de referência *GAPDH*, que revelou variações menos drásticas e maior estabilidade. Por esse motivo, e de forma que os resultados e seguinte discussão não sejam influenciados por esta disparidade entre genes de referência, neste projeto apresentam-se somente os resultados normalizados de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

4.3.1. Globinas

Quanto à expressão do gene *HBA*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.5**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um aumento da expressão após exposição a EAFCP com maior diluição (1/50), em oposição a um decréscimo após exposição com EAFCP com menor diluição (1/10), enquanto não parece haver alterações após exposição com HU. Neste caso demonstrou-se haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1/10 e 1/50, com valor de p de 0,008 no teste de Comparações Múltiplas de Tukey, que precedeu a ANOVA. Quando comparados com HU, nenhum dos grupos EAFCP demonstraram diferenças estatisticamente significativas. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

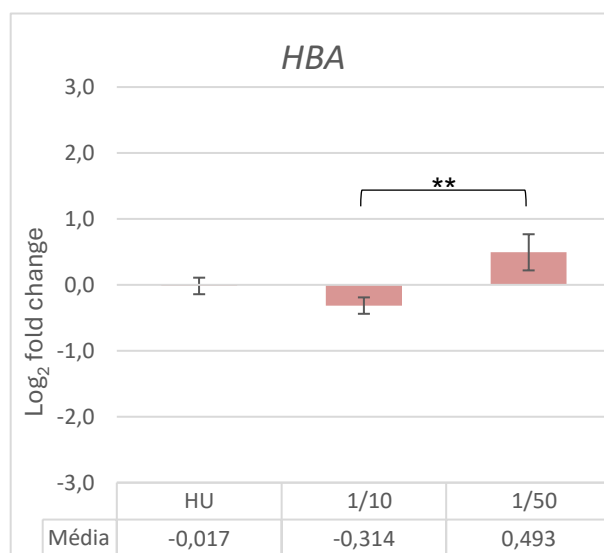


Figura 4.5 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HBA* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HBA* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct}$ \pm desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste t de Welch, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *HBB*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.6**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um aumento da expressão após exposição a EAFCP com maior diluição (1/50) e com HU, em oposição a um decréscimo após exposição com EAFCP com menor diluição (1/10). No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si para nenhum dos grupos de estudo, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao

Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

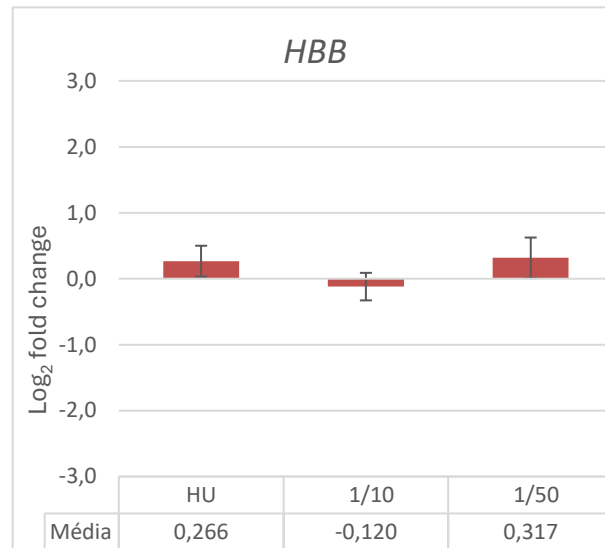


Figura 4.6 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HBB* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HBB* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct}$ \pm desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Mann-Whitney, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *HBB1*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.7**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um aumento da expressão para todos os grupos de exposição, embora acentuado no caso dos EAFCP. Este aumento da expressão nos grupos 1/10 e 1/50, demonstra ser estatisticamente diferente quando comparados com o grupo HU, embora não o sejam entre si. Comparativamente ao Controlo, o grupo de exposição EAFCP 1/50 demonstrou diferenças estatisticamente significativas, com valor de p igual a 0,007, enquanto o grupo de exposição EAFCP 1/10 revele uma diferença tendencial, com valor de p igual a 0,063.

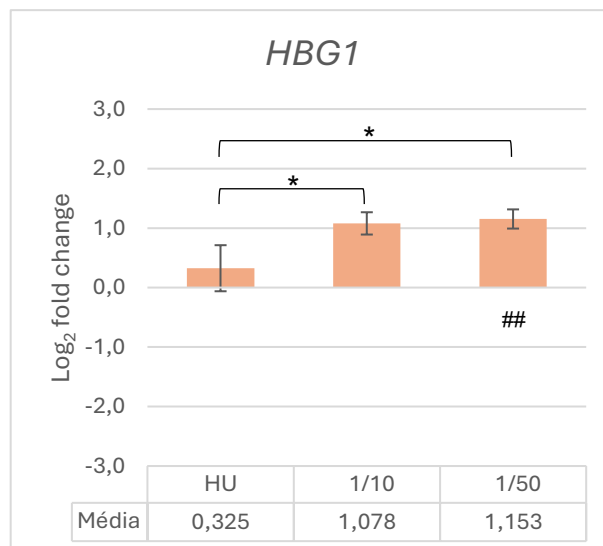


Figura 4.7 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HBG1* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HBG1* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste t de Student, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *HBG2*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.8**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um aumento da expressão após exposição a todos os grupos, sendo este acentuado para exposição a EAFCP de diluição 1/50. Estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, apesar de se perceber uma tendência, tendo o teste ANOVA evidenciado um valor de p de 0,071 (inferior a 0,1). Comparativamente ao Controlo, o grupo de exposição EAFCP 1/50 demonstrou diferenças estatisticamente significativas, com valor de p igual a 0,007.

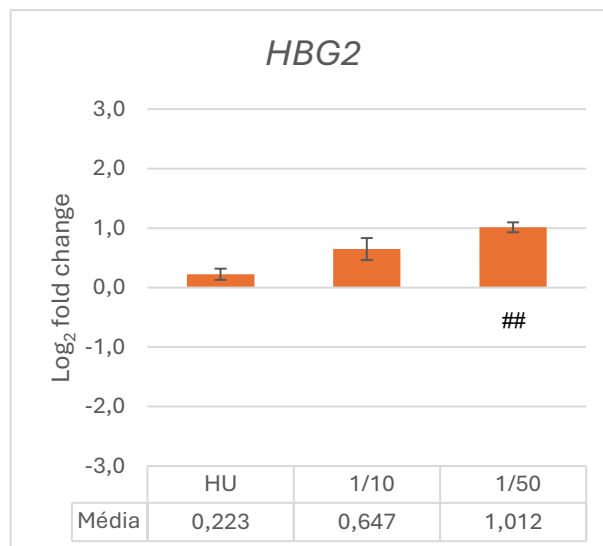


Figura 4.8 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HBG2* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HBG2* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste t de Student, #p<0,05 e ##p<0,01.

4.3.2. Sinalização

Quanto à expressão do gene *BCL11A*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.9**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um decréscimo da expressão após exposição a todos os grupos em estudo, sendo esta mais acentuada para EAFCP de diluição 1/50. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças, dispensando análise estatística por testes de hipóteses.

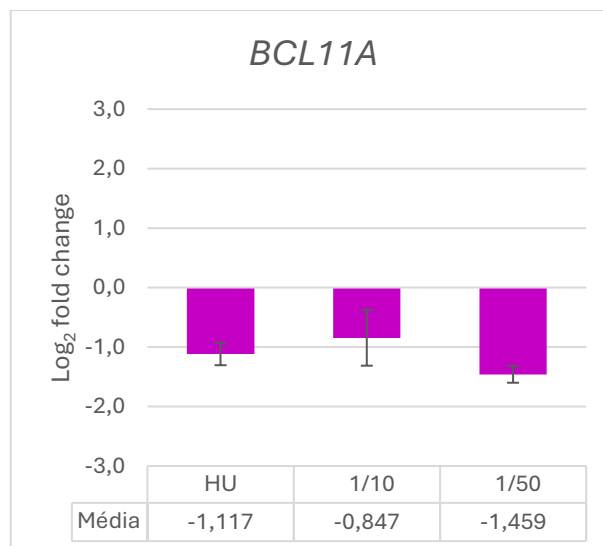


Figura 4.9 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *BCL11A* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *BCL11A* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, não foram avaliadas por testes de hipóteses.

Quanto à expressão do gene *BGLT3*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.10**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um decréscimo da expressão após exposição das células K562 a todos os grupos em estudo, especialmente com EAFCP de diluição 1/10. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

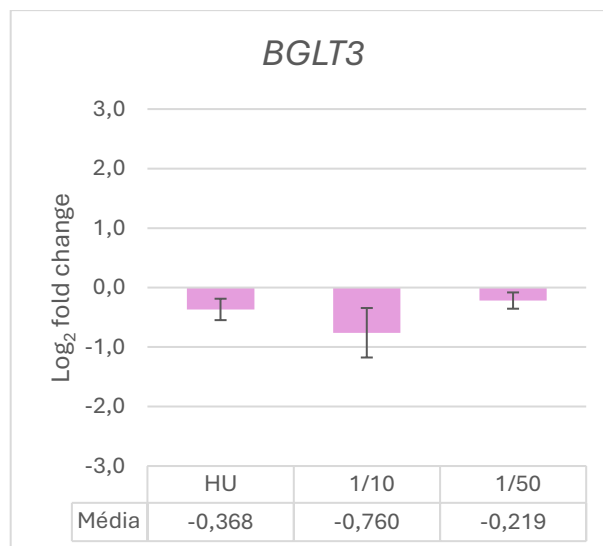


Figura 4.10 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *BGLT3* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *BGLT3* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Mann-Whitney, #p<0,05 e ##p<0,01.

4.3.3. Moduladores epigenéticos

Quanto à expressão do gene *HDAC1*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.11**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se uma diminuição da expressão após exposição a todos os grupos em estudo. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

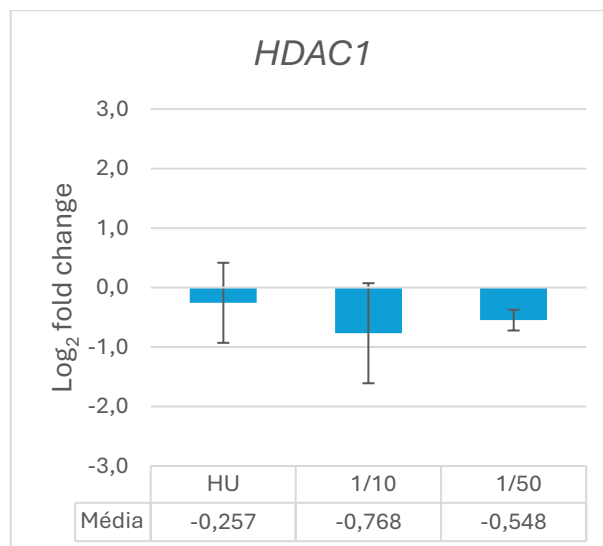


Figura 4.11 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HDAC1* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HDAC1* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct}$ \pm desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste t de Student, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *HDAC2*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.12**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se uma diminuição da expressão em todos os grupos, sendo esta mais acentuada para a exposição com HU e menos acentuada no grupo 1/50. Demonstrou-se, estatisticamente, haver diferença significativa entre os grupos HU e 1/50, com valor de p igual a 0,009. Os restantes grupos não evidenciam tal diferença, embora se tenha notado uma tendência entre os grupos 1/10 e 1/50, tendo esta comparação assumindo valor de p inferior a 0,1. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

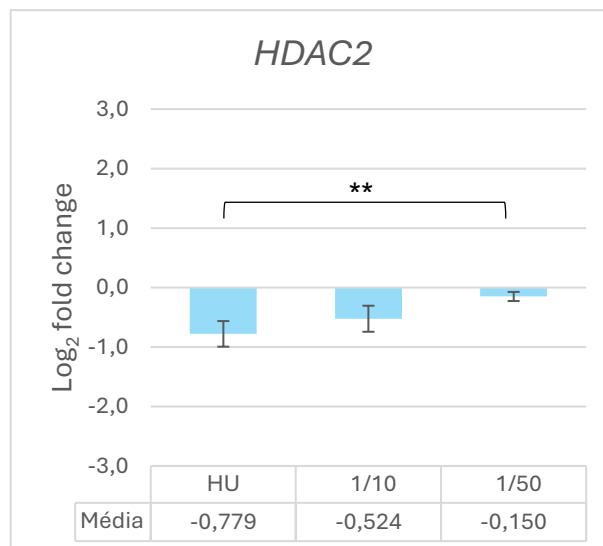


Figura 4.12 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HDAC2* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HDAC2* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Mann-Whitney, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *HDAC3*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.13**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um aumento da expressão após exposição a EAFCP, para ambas as diluições em estudo, enquanto se registou uma diminuição desta para o grupo HU. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

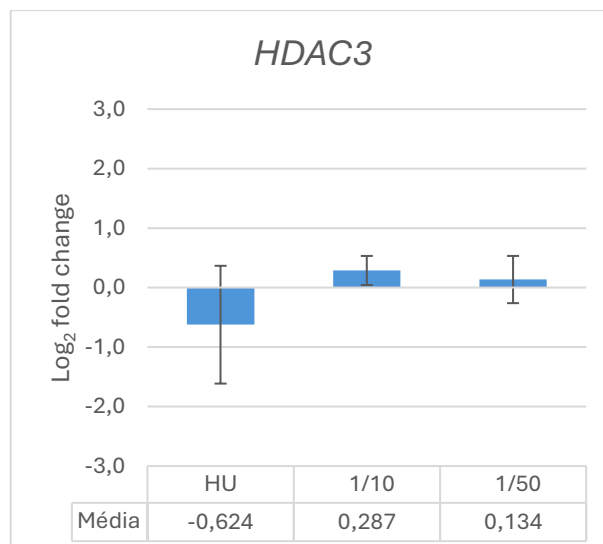


Figura 4.13 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HDAC3* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HDAC3* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Mann-Whitney, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *HDAC8*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.14**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um aumento da expressão após exposição a EAFCP com menor diluição (1/10), em oposição a um decréscimo após exposição com EAFCP com menor diluição (1/10) e HU. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

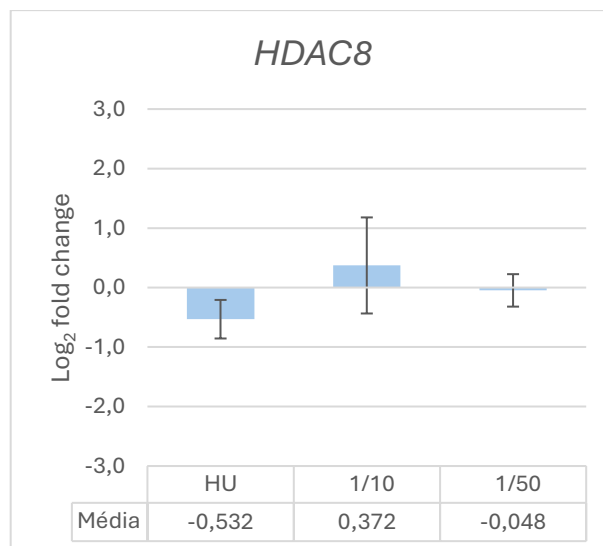


Figura 4.14 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *HDAC8* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *HDAC8* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Mann-Whitney, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *DNMT1*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.15**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um decréscimo da expressão para todos os grupos, mais notório em 1/10. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas, embora se observe uma diferença tendencial para os grupos HU e EAFCP de diluição 1/10, com valores de p iguais a 0,066.

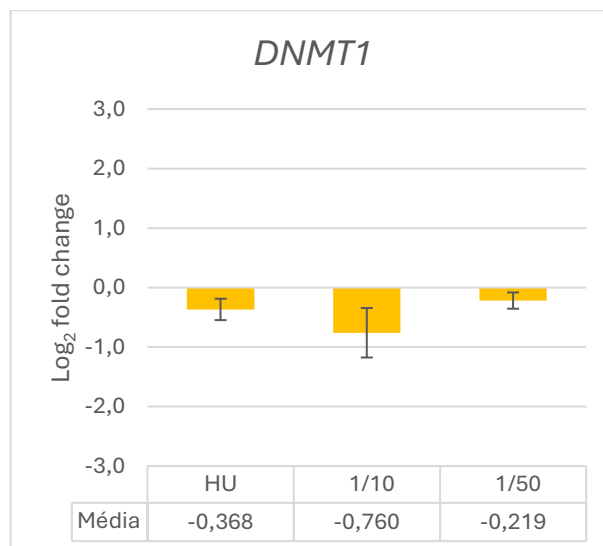


Figura 4.15 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *DNMT1* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *DNMT1* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Student, #p<0,05 e ##p<0,01.

Quanto à expressão do gene *DNMT3a*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.16**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se um grande aumento da expressão após exposição a todos os grupos, sendo este acentuado para exposição a EAFCP de diluição 1/100. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças, dispensando análise estatística por testes de hipóteses.

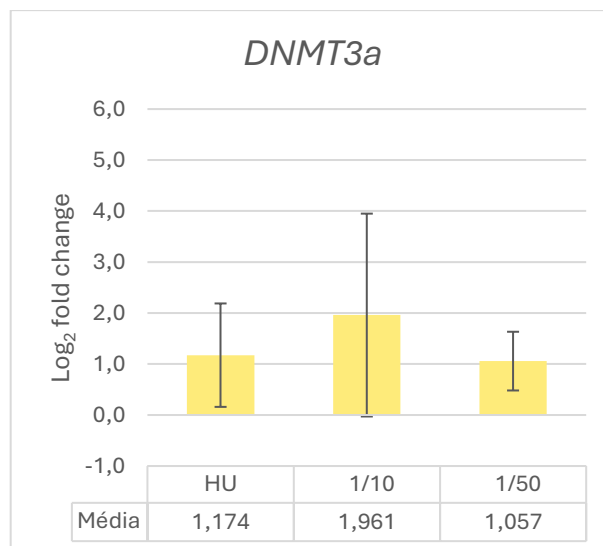


Figura 4.16 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *DNMT3a* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *DNMT3a* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, não foram avaliadas por testes de hipóteses.

Quanto à expressão do gene *DNMT3b*, cujos resultados se apresentam na **Figura 4.17**, quando normalizado com o gene *GAPDH* denota-se uma diminuição da expressão após exposição a todos os grupos, sendo este mais evidente para os grupos de exposição com EAFCP. No entanto, estas variações não demonstraram ser significativamente diferentes entre si, tendo neste caso valores de p superiores a 0,05. Comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos de exposição demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

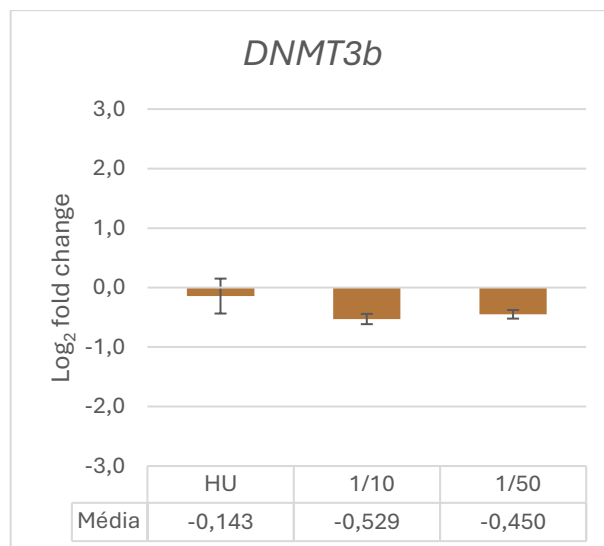


Figura 4.17 – Avaliação do impacto de EAFCP e HU na expressão relativa do gene *DNMT3b* em células K562, de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

Representação gráfica da análise por RT-qPCR do gene *DNMT3b* após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições de 1/10 e 1/50 e à HU com concentração 0,5mg/mL. Log₂ da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) \pm desvio padrão da expressão genética. As diferenças estatisticamente significativas da média de Log₂ da quantificação relativa, foram avaliadas através do teste ANOVA, *p<0,05 e **p<0,01. As diferenças estatisticamente significativas da média de $2^{-\Delta Ct} \pm$ desvio padrão da quantificação relativa em relação ao Controlo, foram avaliadas através do teste U de Mann-Whitney, #p<0,05 e ##p<0,01.

5. Discussão

Devido à elevada morbidade e mortalidade associadas às hemoglobinopatias, como DCF e β -talassémia, torna-se essencial o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que promovam a reativação da HbF, com menor toxicidade e maior acessibilidade, sobretudo em regiões com menos recursos [179]. A HU, apesar de ser o único fármaco indutor de HbF aprovado pela FDA para o tratamento da DCF, apresenta limitações consideráveis, como a variabilidade na resposta dos doentes, efeitos secundários indesejáveis e um mecanismo de ação ainda não completamente elucidado [1], [8]. Este cenário tem impulsionado a investigação de novos compostos com capacidade de indução de HbF, nomeadamente derivados de fontes naturais [131]. Neste contexto, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial terapêutico do EAFCP na regulação da expressão dos genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), de genes reguladores da HbF (*BCL11A* e *BGLT3*), e de genes associados à modulação epigenética (*HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*), utilizando como modelo células de linhagem celular K562. A HU foi aqui utilizada como controlo positivo, dada a sua eficácia estabelecida na indução de HbF.

A escolha do EAFCP fundamentou-se no seu uso tradicional em diversas regiões do mundo, como Índia e África, onde as folhas de papaia são utilizadas para o tratamento de doenças como a malária, dengue e, mais recentemente, a própria DCF [33], [100], [109], [180], [181]. Para além disso, a água foi escolhida enquanto solvente, por ser um reagente seguro, ecologicamente sustentável, facilmente disponível e economicamente viável, especialmente em países carenciados. No entanto, os extratos aquosos são mais suscetíveis à degradação devido ao seu elevado teor em água, o que os torna naturalmente menos estáveis e dependentes da aplicação de métodos adequados de conservação e armazenamento. Estes extratos podem ainda conter maior proporção de compostos com elevada biodisponibilidade celular, o que pode originar respostas biológicas distintas em comparação com outros tipos de extratos [182].

Este projeto insere-se numa linha de investigação que procura explorar compostos bioativos de origem natural como potenciais indutores da HbF, com mecanismos de ação ainda por esclarecer. Acredita-se que estes compostos possam atuar por via de modificações epigenéticas, como a regulação da metilação do DNA e acetilação de histonas, afetando assim a arquitetura da cromatina e a acessibilidade dos genes da γ -globina à maquinaria transcricional. Foi por esse motivo que se optou por estudar o EAFCP não só quanto ao seu efeito na expressão direta das globinas, mas também

quanto à sua influência em genes epigenéticos reguladores, como as HDACs e as DNMTs.

Por outro lado, as células K562 foram escolhidas como modelo experimental nesta investigação por serem biologicamente relevantes para o estudo da regulação da expressão génica em contexto hematopoiético, tendo ainda rápida proliferação, crescimento em suspensão e resposta a estímulos químicos ou naturais, que facilitam a análise funcional pretendida. Não obstante, e embora logisticamente não tenha sido possível a sua inserção neste projeto, teria sido vantajoso utilizar um modelo celular mais fisiológico, nomeadamente recorrendo à linhagem celular humana BEL-A (ou BEL-A2), a qual representa um modelo avançado para o estudo da eritropoiese e das hemoglobinopatias. Desenvolvida por Trakarnsanga et al., a linhagem BEL-A consiste numa linha eritroide adulta imortalizada, obtida a partir de células CD34+ da medula óssea através da introdução de oncogenes HPV16-E6/E7, capazes de proliferar continuamente mais de 190 dias e de se diferenciar eficientemente em reticulócitos maduros e funcionais [183], [184]. Esta linha celular, podendo ser adquirida à *NHS Blood and Transplant*, distingue-se pela capacidade de fornecer uma fonte sustentável e homogénea de células eritroides, revelando-se particularmente valiosa para a investigação de doenças dos glóbulos vermelhos, como a talassemia e a anemia falciforme [183], [185]. Assim, já se tendo demonstrado a sua expressão de marcadores de superfície semelhantes aos das células eritroides adultas, com síntese de β -globina com 99,3% de hemoglobina A, a linhagem celular BEL-A apresentou grande potencial e viabilidade, lançando bases para futuras investigações relacionadas com eritropoiese [184]. Para além disso, a facilidade com que estas células podem ser geneticamente manipuladas, nomeadamente através de tecnologias como o CRISPR/Cas9, tem possibilitado a criação de modelos celulares da anemia falciforme, por introdução da mutação responsável pela hemoglobina S [186], [187].

De forma a validar a segurança e viabilidade em contexto experimental, numa primeira fase avaliou-se a viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade das células K562 quando expostas, durante 24 horas, aos vários meios de exposição (C, HU, 1/10 e 1/50). Os resultados demonstraram que a viabilidade celular, tanto pelo ensaio com azul de tripano (**Figura 4.1**) como pelo ensaio com CellTiter-Blue (**Figura 4.3**), se manteve constante entre grupos de exposição, sem diferenças estatisticamente significativas ou tendências identificadas. A mesma uniformidade estatística entre grupos de estudo foi identificada na avaliação da citotoxicidade pelo ensaio CytoTox 96 (**Figura 4.4**), embora se note maior toxicidade celular no grupo HU.

Assim, é possível afirmar que as concentrações testadas de HU e EAFCP não induziram efeitos tóxicos e/ou redução da viabilidade nas células K562, permitindo a continuação dos ensaios de expressão genética. Este perfil de segurança é corroborado por estudos prévios que reportam a ausência de efeitos adversos com a administração oral de extratos de folhas de Cp em modelos animais, mesmo em doses elevadas [188].

Quanto à proliferação das células K562, avaliada pelo ensaio com azul de tripano (**Figura 4.2**), foi identificada redução acentuada da taxa de proliferação nos grupos de estudo com EAFCP e, especialmente, HU, quando comparados com o grupo Controlo. Estes resultados indicam que a HU e os EAFCP atuam como agentes citostáticos, onde a proliferação celular é inibida sem necessariamente causar morte celular, notando-se manutenção da viabilidade celular e citotoxicidade reduzida.

Os efeitos citostáticos da HU já são conhecidos e bem documentados, podendo ser considerados como um mecanismo indireto de indução de HbF [189]. Um efeito semelhante, embora menos acentuado, com EAFCP sugere potencial antiproliferativo e anticancerígeno, consistente com estudos que demonstram que compostos bioativos de origem vegetal podem modular o ciclo celular e vias epigenéticas reguladoras da expressão génica [99], afetando tanto a proliferação como a diferenciação celular, sem causar toxicidade significativa nem comprometer a viabilidade celular, como demonstrado por *Singh et al.*, *Nisa et al.* e *Otsuki et al.* [85], [190], [191].

No âmbito deste estudo experimental, a técnica de RT-qPCR constituiu uma ferramenta analítica crucial, cuja execução rigorosa da sua metodologia requer um entendimento aprofundado da eficiência da reação, bem como do seu método de cálculo, de forma a garantir uma quantificação precisa dos níveis de expressão génica. Por esse motivo, todos os genes em estudo foram sujeitos a testes de eficiência, salientando-se, no entanto, que os genes *HBB*, *BGLT3* e *DNAMT3a* demonstraram eficiências fora do intervalo de valores aceitáveis, sendo estas respetivamente 118%, 114% e 130% (**Tabela 4.1**). Por outro lado, o gene *BCL11A* não conseguiu ser validado por esta técnica, apresentando valores discrepantes e demasiado variáveis dentro de cada ensaio para permitir que fosse traçada a sua eficiência, não conseguindo assim manter consistência nem providenciar resultados fidedignos e reproduzíveis.

Para avaliação da expressão génica, utilizou-se o método $\Delta\Delta C_t$ com normalização de acordo com os genes de referência *GAPDH* e *ActinB*. No entanto, ao comparar os resultados obtidos com cada gene de referência, percebeu-se haver incongruências e disparidades, por interferência destes mesmos genes de referência. Tal como descrito nos resultados, o gene de referência *ActinB* demonstrou maior variabilidade entre

condições e réplicas do que o gene de referência *GAPDH*, pelo que se procedeu à avaliação dos resultados baseados no gene de referência *GAPDH*.

Esta decisão foi também apoiada pela literatura, onde *Albershardt et al.* refere que o gene *GAPDH* é um bom gene de normalização de resultados de qPCR para dados referentes a linfócitos de ratos (origem hematopoiética), enquanto a *ActinB* demonstra ser demasiado variável, para um gene de referência, neste tipo de células [192]. Embora autores como *Ju et al.* classifiquem a *ActinB* como melhor gene de referência do que o *GADPH* para dados referentes a células endoteliais (origem não hematopoiética), demonstram também que estes genes podem apresentar elevada discrepância entre si aquando de lesão celular, apesar de serem utilizados juntos frequentemente [193]. Perante a contradição de opiniões, entre qual destes dois genes de referência o mais adequado, o estudo de *Li net al.* clarificou que estes genes não se encontram expressos de igual forma em todos os tecidos, pelo que o facto de serem adequados enquanto genes de referência se prende essencialmente com o tipo de células/tecido em estudo [194]. Outros estudos corroboram esta divergência de resultados quando comparados os genes de referência, especialmente de acordo com o tipo de célula/tecido [195], [196], [197]. Assim, valorizou-se a evidência descrita por *Albershardt et al.*, referindo-se esta a células de origem hematopoiética (linfócitos de rato), e por isso com maior semelhança às células K562, conduzindo à escolha do *GAPDH* como gene normalizador.

A avaliação dos resultados referentes à expressão génica começou pelos genes das globinas. Quanto ao gene *HBA* (**Figura 4.5**), observou-se que a diluição mais elevada de EAFCP (1/50) induz uma expressão significativamente maior, quando comparada com a diluição 1/10, sugerindo um efeito dependente da dose e no sentido inverso, onde concentrações mais baixas de extrato promovem maior expressão. A ausência de alteração da expressão de *HBA* com a HU reforça a especificidade do efeito do EAFCP sobre a globina alfa, dado que a HU é tradicionalmente associada à indução da γ -globina, mas não da α -globina [86]. Esta particularidade do EAFCP demonstra potencial terapêutico, não só para DCF, mas também para outros tipos de anemia e medicina hematopoiética no geral, tal como também sugerido nos estudos de *Gheith et al.* e *Adewuyi et al.* [198], [199].

Relativamente ao gene *HBB* (**Figura 4.6**), o aumento observado da expressão deste gene para os grupos HU e 1/50, embora sem diferença estatisticamente significativa, pode indicar um possível efeito de compensação, sugerindo que, à semelhança da HU, os EAFCP podem ativar elementos reguladores comuns às globinas β e γ , como o LCR [16], [17]. Já o decréscimo da expressão com EAFCP de menor diluição (maior

concentração) realça novamente a importância do efeito de dose, potencialmente relacionado com a presença de compostos com efeitos bifásicos e/ou de natureza citostática mais, pronunciada em maiores concentrações [189], [200].

Os resultados obtidos para *HBG1* (**Figura 4.7**) revelaram um aumento significativo da expressão nos grupos expostos a EAFCP, comparativamente ao grupo exposto com HU. Por outro lado, comparativamente ao Controlo, o grupo EAFCP 1/50 revelou ser estatisticamente diferente, enquanto que o grupo EAFCP 1/10 revelou tender para essa diferença. Estes dados são particularmente relevantes, uma vez que a indução da expressão dos genes γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) está diretamente associada ao aumento da produção de HbF, sendo esta uma estratégia amplamente validada para tratamento de DFC [16], [72], [131]. A maior indução por EAFCP, relativamente a HU, pode refletir a atuação sobre vias epigenéticas alternativas ou complementares às já conhecidas, nomeadamente inibição de HDACs ou DNMTs, como já demonstrado em estudos prévios com compostos bioativos de origem vegetal, como o de *Iftikhar et al.*, que utilizou a planta *Adhatoda vasica* na integra e *Ribeiro et al.*, que utilizou genisteína (derivada da soja) e epigallocatequina galato (derivada do chá verde) [50], [179].

Para *HBG2* (**Figura 4.8**), a expressão aumentada em todos os grupos, especialmente no grupo EAFCP com menor concentração (1/50), sugere uma tendência positiva que poderá ter relevância biológica, embora que sem alcançar diferença estatisticamente significativa comparativamente a HU. O valor de p observado, estando próximo do limiar de significância estatística, poderá ser interpretado como indicativo de um efeito real que requer confirmação com amostras maiores e/ou maior sensibilidade analítica. Não obstante, comparativamente ao Controlo, comprovou-se diferença estatisticamente significativa para o grupo de exposição EAFCP 1/50. É importante notar também que *HBG1* e *HBG2*, embora codifiquem cadeias gama (γ) altamente semelhantes, podem ser diferencialmente regulados, dependendo de estímulos celulares específicos e competição pelo LCR, tal como referido por *Métais et al.* [201].

Estes resultados, no seu conjunto, apoiam a hipótese de que os EAFCP podem atuar como moduladores da expressão génica das globinas, promovendo particularmente a expressão de genes associados à HbF e tornando-se promissor como indutor natural de HbF. A evidência de significância estatística identificada, especialmente no grupo EAFCP 1/50, reforça o potencial biológico deste extrato em concentrações mais diluídas. Por outro lado, a sua ação diferencial dependente da concentração, reforça a importância de caracterizar detalhadamente os compostos bioativos presentes nos EAFCP, uma vez que diferentes metabólitos secundários podem interagir de forma distinta com os mecanismos epigenéticos e transcricionais celulares [98], [100].

Quanto aos genes de sinalização e regulação transcricional, os resultados da expressão dos genes *BCL11A* e *BGLT3* apontam para uma tendência de diminuição da sua expressão após a exposição das células K562 a HU e, sobretudo, a EAFCP, embora sem que se atinjam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de exposição. Não obstante, as tendências observadas são dispares e têm relevância biológica, particularmente quando se considera o papel central destes genes na regulação de HbF.

Como descrito anteriormente, o gene *BCL11A* é um dos principais repressores transcricionais da expressão da γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) em células eritroides adultas, atuando ao nível do LCR do cluster da β -globina, de forma a bloquear a sua interação com os promotores da γ -globina e impedir assim a produção de HbF. A sua inibição ou redução da expressão tem sido associada à reativação da HbF, sendo atualmente considerado um alvo terapêutico central para doenças como DFC e β -talassémia, como defendido, entre outros autores, por *Zakaria et al.* e *Orkin* [70], [134].

No presente estudo, observou-se uma diminuição da expressão de *BCL11A* (**Figura 4.9**) após exposição a todos os grupos, sendo esta mais marcada com EAFCP de diluição 1/50. Este padrão é compatível com um efeito inibitório do extrato sobre esta via repressora da HbF, especialmente quando comparado com HU, que apresentou expressão mais elevada. Por outro lado, a exposição a EAFCP de diluição 1/10 resultou num ligeiro aumento da expressão de *BCL11A*, sugerindo um efeito dependente da dose, mas em sentido inverso, como anteriormente referido. Estes dados estão alinhados com os resultados de expressão de *HBG1* e *HBG2*, que atingiram valores máximos com EAFCP 1/50, reforçando a hipótese de que a redução de *BCL11A* contribui para o aumento da HbF. Este perfil de expressão é explicado pela literatura, que apoia a possibilidade de que compostos naturais, incluindo flavonoides e polifenóis presentes em extratos vegetais, tenham uma ação multifatorial que possa modular a expressão de *BCL11A* através de mecanismos epigenéticos indiretos, como a modulação de microRNAs ou a acetilação de histonas [111], [115], [202].

Contudo, volta-se a destacar que, por limitação técnica, o gene *BCL11A* não cumpriu os critérios ótimos de eficiência de RT-qPCR, apresentando inconsistência e variabilidade na amplificação. Este fator pode ter afetado a precisão dos resultados quantitativos, devendo ser tido em conta na sua interpretação.

Paralelamente, como anteriormente indicado, o gene *BGLT3* é um lncRNA regulador positivo da γ -globina, cuja expressão tem sido associada à ativação transcricional de *HBG1* e *HBG2*. Este gene atua de forma a facilitar reestruturações da cromatina, favorecendo o acesso dos promotores da γ -globina ao LCR, sendo até considerado indispensável na indução desta globina, por *Takase et al.* [203].

No presente projeto, verificou-se um aumento da expressão de *BGLT3* (**Figura 4.10**) no grupo de exposição com EAFCP de diluição 1/50, contrastando com uma diminuição desta expressão no grupo 1/10. Embora sem comprovada significância estatística, este padrão corrobora os níveis de expressão aumentados de *HBG1* e *HBG2* no grupo 1/50, sugerindo mais uma vez que EAFCP em menor concentração promove de forma mais eficaz a indução de HbF, correspondendo a um efeito dependente de dose no sentido inverso.

Por outro lado, a observação de que EAFCP 1/50 leva simultaneamente ao aumento de *BGLT3* e à redução de *BCL11A* está em linha com o modelo de relação funcional proposto na literatura, que aponta para que o aumento da expressão de *HBG1/2* derive da diminuição da expressão de *BCL11A* e/ou do aumento da expressão de *BGLT3*, como reportado por *Delgadinho et al.* [204].

Assim, podemos afirmar que, apesar de as variações de expressão de *BCL11A* e *BGLT3* não serem estatisticamente significativas, quando se comparam os grupos de exposição entre si e com o controlo, os resultados observados sugerem que os EAFCP, particularmente com diluição 1/50, pode atuar como modulador epigenético da expressão de HbF, atuando através da inibição de *BCL11A* e possível ativação de *BGLT3*, promovendo um aumento coordenado da expressão de *HBG1* e *HBG2*. Estes efeitos são consistentes com mecanismos biológicos conhecidos e descritos pela literatura, apontando para um mecanismo regulador multifatorial, com implicações promissoras no desenvolvimento de terapias baseadas em compostos naturais.

Como anteriormente explanado, as HDACs são enzimas fundamentais na remodelação da cromatina, atuando por remoção de grupos acetil das histonas e resultando na condensação da cromatina e repressão transcricional. A inibição de HDACs tem sido amplamente investigada como estratégia terapêutica para reativar a expressão dos genes *HBG1* e *HBG2*, principalmente no contexto de DCF e β -talassémia, como descrito por *Mabaera et al.* [165].

Os resultados mostram uma diminuição geral da expressão de *HDAC1* (**Figura 4.11**) e *HDAC2* (**Figura 4.12**) em todos os grupos de tratamento. Embora as diferenças de expressão de *HDAC1* entre grupos de exposição não tenham sido estatisticamente significativas, a redução da expressão de *HDAC2* no grupo exposto a HU foi significativamente maior em comparação com o grupo exposto com EAFCP 1/50. Esta observação está de acordo com os dados prévios, que indicam que a HU pode exercer parte do seu efeito indutor de HbF através da inibição da via HDAC, nomeadamente pela modulação de *HDAC2*, resultando numa cromatina mais permissiva à transcrição de γ -globina, como indicado por *Esrick et al.* [205].

A menor redução de *HDAC2* nos grupos de EAFCP, nomeadamente de diluição 1/50, pode indicar, em parte, a diferenciação de mecanismos observados em tratamentos com HU e com EAFCP. Curiosamente, a tendência decrescente de *HDAC2* entre os grupos 1/10 e 1/50 pode sugerir um efeito dependente da dose, de forma diretamente proporcional à concentração do extrato. Ou seja, neste caso, quanto maior a concentração de EAFCP, maior é a inibição da expressão de *HDAC2*, o que poderá refletir uma ação mais eficaz do extrato sobre este regulador epigenético em doses mais concentradas. Este padrão contrasta com os efeitos observados nos genes anteriormente abordados, onde se tinha observado uma relação inversa entre dose e concentração, reforçando assim a possibilidade de os EAFCP representarem mecanismos regulatórios distintos e/ou multifatoriais entre vias epigenéticas e transcricionais.

Em contraste, os resultados para *HDAC3* (**Figura 4.13**) revelaram um aumento da expressão nos grupos tratados com EAFCP, enquanto o grupo HU demonstrou uma redução. Embora estas variações de expressão não tenham atingido significância estatística, o perfil sugere que o EAFCP pode não atuar diretamente sobre a via *HDAC3*, podendo os EAFCP modular seletivamente diferentes HDACs. Outra hipótese é que a *HDAC3* não esteja diretamente envolvida na repressão de γ -globina em células K562, tendo em conta que a atividade repressora das HDACs sobre genes eritroides pode ser dependente do contexto, variando consoante o estado de diferenciação celular ou os complexos de correpressão envolvidos, como relatado por *Vong et al.*, *Rietveld et al.* e *Varricchio et al.* [206], [207], [208].

Já a expressão de *HDAC8* (**Figura 4.14**) apresentou um aumento no grupo EAFCP 1/10, em contraste com uma diminuição da expressão nos grupos EAFCP 1/50 e, especialmente, HU. Este resultado, embora não consista numa diferença estatisticamente significativa, poderá estar relacionado com a atividade específica desta HDAC em estágios mais imaturos da eritropoiese, como indicado acerca da expressão de *HDAC3*. É possível que, em concentrações mais altas, o EAFCP possa influenciar vias que não favorecem diretamente a reativação da γ -globina, sendo este mais um exemplo de efeito não linear do extrato.

Em suma, os resultados sugerem que a EAFCP interfere com a expressão de vários HDAC, havendo especial destaque para a redução de *HDAC2*, significativamente menor da que ocorre em exposição com HU, sugerindo que EAFCP poderá exercer parte do seu efeito indutor de HbF, através da modulação epigenética da cromatina, por um mecanismo distinto daquele promovido pela HU. Este fenómeno poderá estar relacionado com outros moduladores da expressão dos genes da globina, como os

anteriormente abordados KLF1, GATA1 e MYB, também explorados por *Santos et al.* [130].

Os resultados obtidos para os moduladores epigenéticos DNMTs sugerem que o EAFCP exerce efeitos regulatórios divergentes sobre diferentes membros desta família enzimática, tal como observado com a família das HDACs, o que poderá refletir um efeito multifatorial e seletivo sobre os mecanismos epigenéticos que regulam a expressão das globinas.

O gene *DNMT1* (**Figura 4.15**), responsável pela manutenção da metilação do DNA durante a replicação celular, apresentou redução da expressão em todos os grupos de exposição, sendo, no entanto, mais acentuada no grupo EAFCP 1/10. Importa referir que, comparativamente ao Controlo, nenhum dos grupos demonstrou diferenças estatisticamente significativas, tendo-se, no entanto, observado uma diferença tendencial tanto para o grupo HU como para o grupo EAFCP 1/10, que, estando próximo do limiar de significância, poderá indicar um possível efeito biológico, digno de investigação adicional com amostras maiores. Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significativas entre grupos de exposição, esta redução pode reforçar a hipótese de um envolvimento dos EAFCP na desmetilação progressiva do locus β -globina, diretamente proporcional à dose aplicada, condição esta já associada à reativação da γ -globina em diversos modelos celulares, nomeadamente por *Gong et al.* [128].

Por outro lado, o gene *DNMT3a* (**Figura 4.16**), associado a metilação de novo, apresentou um aumento acentuado da expressão em todos os grupos tratados, particularmente em EAFCP 1/10. Este achado é curioso e aparentemente contraintuitivo, já que se espera uma inibição das DNMTs como forma de facilitar a expressão de *HBG1/2*. Não obstante, estudos recentes, como o de *Wei et al.* e *Weinberg et al.*, indicam que a atividade de *DNMT3a*, pode ser redirecionada para outras regiões genómicas fora do locus da β -globina, funcionando como parte do rearranjo compensatório na arquitetura epigenética celular [209], [210]. Assim, o aumento de *DNMT3a* poderá não ser necessariamente incompatível com a indução de HbF, devendo ser interpretado à luz do contexto genómico global.

Já no caso do gene *DNMT3b* (**Figura 4.17**), observou-se uma tendência clara para a redução da expressão em todos os grupos, principalmente após exposição com EAFCP. Salienta-se que esta DNMT tem sido descrita como relevante para o silenciamento de promotores de genes de desenvolvimento, e a sua inibição tem sido associada a maior acessibilidade da cromatina nos promotores das globinas fetais, nomeadamente por *Ginder* [68]. Assim, a diminuição da sua expressão pode ser interpretada como um

contributo adicional para a expressão de *HBG1* e *HBG2*, em consonância com os dados previamente observados na expressão destes dois genes.

Em conjunto, estes resultados apontam para uma modulação seletiva e complexa do sistema de metilação do DNA pelo EAFCP, que poderá contribuir para o seu efeito indutor de HbF através de vias epigenéticas múltiplas, não necessariamente lineares. A presença de efeitos tendenciais, como os observados em *DNMT1*, reforça a possibilidade de ação moduladora subtil, mas biologicamente relevante, que pode escapar à significância estatística em amostras limitadas, como é o caso. A literatura tem vindo a demonstrar que extratos vegetais ricos em compostos fenólicos e flavonoides podem interferir com DNMTs por via direta, inibindo a sua atividade catalítica, ou indireta, pela regulação transcricional por via de microRNAs ou stress oxidativo controlado [115], [116]. Neste contexto, torna-se também pertinente proceder à caracterização dos EAFCP quanto ao seu conteúdo em compostos solúveis, de forma a tentar determinar quais destes são responsáveis pela indução de HbF identificada.

Na **Tabela 5.1**, apresenta-se um resumo esquematizado da expressão relativa de cada gene, em células K562, após 24 horas de exposição aos EAFCP com diluições 1/10 e 1/50, em relação ao Controlo, onde as diferenças estatisticamente significativas identificadas são representadas por “##”, para valores de p inferiores a 0,01.

Tabela 5.1 – Variação da expressão relativa de cada gene, em relação ao Controlo (##p<0,01).

Função	Gene	EAFCP	
		1/10	1/50
Globinas	<i>HBA</i>	↓	↑
	<i>HBB</i>	=	↑
	<i>HBG1</i>	↑↑	↑↑ ##
	<i>HBG2</i>	↑	↑↑ ##
Sinalização	<i>BCL11A</i>	↓↓↓	↓↓↓
	<i>BGLT3</i>	↓↓	↓
Moduladores epigenéticos	<i>HDAC1</i>	↓↓	↓
	<i>HDAC2</i>	↓	=
	<i>HDAC3</i>	↑	=
	<i>HDAC8</i>	↑	=
	<i>DNMT1</i>	↓↓	↓
	<i>DNMT3a</i>	↑↑↑↑	↑↑
	<i>DNMT3b</i>	↓	↓

Assim, fica explícito que o presente estudo demonstrou que o EAFCP possui um potencial epigenético relevante na reativação da expressão de HbF, atuando sobre múltiplas vias moleculares implicadas na regulação das globinas. Em particular, a diluição 1/50 de EAFCP, revelou efeitos mais expressivos, promovendo um aumento significativo na expressão dos genes fetais HBG1 e HBG2, bem como uma modulação positiva de HBA e HBB, sem comprometer a viabilidade celular. Paralelamente, observou-se uma redução da expressão de BCL11A, sugerindo a reativação de HbF por mecanismos transcricionais e epigenéticos. Os EAFCP alteraram ainda o perfil de expressão de genes codificantes de enzimas epigenéticas, nomeadamente através da diminuição de HDAC1, HDAC2, DNMT1 e DNMT3b, e um aumento de HDAC3, HDAC8 e DNMT3A, sugerindo uma atuação multifatorial sobre a arquitetura epigenética. Estes resultados revelam que o EAFCP é um candidato promissor para abordagens terapêuticas inovadoras em hemoglobinopatias, pela sua capacidade de modular de forma coordenada a expressão de genes das globinas e dos seus principais reguladores epigenéticos, distinguindo-se de terapias convencionais, como a hidroxiureia.

6. Considerações finais

6.1. Conclusão

A regulação da expressão de hemoglobina ao longo do desenvolvimento humano é um processo altamente complexo, mediado por uma rede de mecanismos moleculares que controlam a ativação ou silenciamento de genes específicos em diferentes fases da vida [1], [11]. Os fatores de transcrição desempenham um papel determinante neste processo, funcionando como interruptores genéticos que modulam a transição entre os diferentes tipos de hemoglobina, nomeadamente da hemoglobina fetal, predominante durante o desenvolvimento intrauterino, para a hemoglobina adulta, que substituiu progressivamente a HbF após o nascimento [17]. Contudo, em indivíduos com hemoglobinopatias, como a DCF ou a β -talassemia, a reativação da expressão de HbF tem demonstrado efeitos benéficos, uma vez que esta forma de hemoglobina apresenta maior afinidade para o oxigénio e reduz a polimerização da hemoglobina S [62], [77], [79], [83].

A repressão pós-natal da HbF está associada a alterações na expressão de genes reguladores, entre os quais se destacam o *BCL11A* e o *BGLT3*, que codificam fatores de transcrição envolvidos na supressão da expressão dos genes fetais *HBG1* e *HBG2*. Paralelamente, atuam mecanismos epigenéticos que contribuem para a modulação da expressão génica, incluindo as DNMTs (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*) e as HDAC (*HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*), que influenciam diretamente os loci das globinas ou regulam indiretamente os seus repressores [113].

Assim, no presente estudo foi avaliado o impacto do composto natural EAFCP, comparativamente com HU e um grupo Controlo, sobre o padrão de expressão génica das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), bem como dos principais genes reguladores (*BCL11A*, *BGLT3*) e moduladores epigenéticos envolvidos na repressão da HbF (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*). Esta análise visa contribuir para a elucidação do potencial mecanismo de ação deste composto na indução de HbF e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas dirigidas à reativação da expressão fetal em doentes com hemoglobinopatias, e em particular DCF.

Resumidamente, obtiveram-se os seguintes resultados:

- O EAFCP não demonstrou toxicidade significativa, nem comprometeu a viabilidade celular da linhagem K562, mesmo em diferentes concentrações;
- Tal como a HU, o EAFCP apresentou efeitos citostáticos, reduzindo a proliferação sem induzir morte celular;

- O EAFCP, especialmente na diluição 1/50, promoveu aumento da expressão de *HBG1* e *HBG2*, tendo-se observado também aumento da *HBA*, sugerindo um efeito mais amplo na regulação das globinas e distinto de HU;
- Houve diminuição da expressão de *BCL11A* (repressor de HbF) e aumento de *BGLT3* (ativador de HbF), em comparação com HU, sobretudo em EAFCP 1/50, sugerindo atuação coordenada de EAFCP na promoção e reativação de HbF por vias epigenéticas.
- O EAFCP demonstrou modular seletivamente as HDACs, com destaque para a redução de *HDAC2*, sugerindo, no entanto, uma ação complexa e multifatorial;
- O EAFCP causou redução de *DNMT1* e *DNMT3b*, associados à repressão de γ -globina, e aumento de *DNMT3a*, possivelmente com função compensatória, indicando impacto relevante na arquitetura epigenética envolvida na expressão das globinas;
- Os efeitos biológicos do EAFCP foram mais evidentes com a diluição 1/50, revelando uma relação não linear entre dose e resposta e apontando para a presença de compostos bioativos com ação bifásica.

Em suma, este estudo oferece uma nova perspectiva sobre o uso de compostos naturais enquanto potenciais agentes epigenéticos na terapêutica de hemoglobinopatias. O EAFCP revelou uma atuação complexa, mas promissora, ao modular simultaneamente a expressão de genes das globinas e reguladores-chave da HbF. Sem comprometer a viabilidade celular, demonstrou potencial para reativar a HbF por vias distintas das terapias convencionais, como a HU, apontando para uma estratégia acessível e inovadora com valor terapêutico a explorar.

6.2. Trabalho futuro

A investigação futura deverá centrar-se no aprofundamento dos mecanismos moleculares subjacentes à ação do EAFCP, nomeadamente através de genes reguladores e ao nível da expressão de microRNAs, que têm vindo a ser apontados como reguladores-chave da HbF, por interferirem com repressores epigenéticos como o gene *BCL11A* [16], [17]. A título de exemplo, destacam-se, os genes reguladores *KLF1*, *MYB* e *HIC2*, referidos anteriormente neste trabalho, bem como os microRNAs miR-148b-3p, miR-32-5p, miR-340-5p e miR-29c-3p, que regulam o gene *BCL11A*, e miR-105-5p, que regula o gene *MYB* [211]. Será ainda importante analisar não apenas a expressão génica, mas também a expressão proteica dos genes modulados, para ter uma visão mais completa e funcional dos seus efeitos.

Adicionalmente, a caracterização química detalhada do EAFCP será essencial para identificar os compostos bioativos responsáveis pelos efeitos observados. Técnicas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas ou Ressonância Magnética Nuclear, poderão ser úteis para o isolamento e identificação desses componentes, permitindo testar individualmente o seu potencial indutor de HbF [212].

No que respeita à continuidade dos ensaios moleculares em células K562, recomenda-se, para uma maior robustez dos dados de expressão génica, a utilização de genes de referência alternativos mais estáveis, como *UBC*, *TBP*, *YWHAZ* ou *HPRT1*, ajustados ao tipo de estímulo e condição experimental [192], [193], [194]. Além disso, no caso específico do gene *BCL11A*, cuja deteção pode apresentar variabilidade, será importante otimizar futuros ensaios, quer através da utilização de *primers* alternativos, quer da aplicação de métodos complementares de validação e deteção proteica, como *Western Blot*.

Por fim, a utilização de diferentes concentrações, tempos de exposição prolongados e, idealmente, modelos celulares mais fisiologicamente representativos, como células progenitoras eritroides humanas ou linhas celulares imortalizadas de eritrócitos normais, como a linhagem celular BEL-A, poderá proporcionar dados mais translacionais e robustos, com vista a futuros ensaios clínicos e aplicações terapêuticas [183].

7. Referências Bibliográficas

- [1] C. Mussolino and J. Strouboulis, “Recent Approaches for Manipulating Globin Gene Expression in Treating Hemoglobinopathies,” *Front Genome Ed*, 2021, doi: 10.3389/fgeed.2021.618111.
- [2] M. Nicolau, “A hemoglobina fetal como fator de modificador da gravidade clínica da anemia das células falciformes: o exemplo dos acidentes vasculares cerebrais,” Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2017.
- [3] M. Gameiro, “Caraterização molecular e funcional de variantes alfa de hemoglobina identificadas no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2012.
- [4] 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.
- [5] B. Nova, “Diagnóstico e tratamento da drepanocitose: novas metodologias,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, 2022.
- [6] R. Preto, “Mutações causadoras de β -talassemia em Ribeirão Preto-SP: identificação e correlação com o fenótipo da doença,” Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2015.
- [7] A. Marengo-Rowe, “Structure-Function Relations of Human Hemoglobins,” *Baylor University Medical Center Proceedings*, vol. 19, no. 3, pp. 239–245, Jul. 2006, doi: 10.1080/08998280.2006.11928171,.
- [8] A. Paikari and V. A. Sheehan, “Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease,” *Br J Haematol*, vol. 180, no. 2, pp. 189–200, Jan. 2018, doi: 10.1111/BJH.15021,.
- [9] S. L. Thein, “Genetic insights into the clinical diversity of β thalassaemia,” *Br J Haematol*, vol. 124, no. 3, pp. 264–274, Feb. 2004, doi: 10.1046/J.1365-2141.2003.04769.X,.
- [10] A. Cao and R. Galanello, “Beta-thalassemia,” *Genetics in Medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 61–76, Feb. 2010, doi: 10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed.
- [11] D. R. Higgs, “The molecular basis of α -thalassemia,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A011718,.
- [12] H. P. J. Voon and J. Vadolas, “Controlling α -globin: A review of α -globin expression and its impact on β -thalassemia,” *Haematologica*, vol. 93, no. 12, pp. 1868–1876, Dec. 2008, doi: 10.3324/HAEMATOL.13490.
- [13] R. Galanello and A. Cao, “Alpha-thalassemia,” *Genetics in Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 83–88, Feb. 2011, doi: 10.1097/GIM.0b013e3181fcb468.

- [14] E. H. Margulies *et al.*, “Identification and Characterization of Multi-Species Conserved Sequences,” *Genome Res*, vol. 13, no. 12, pp. 2507–2518, Dec. 2003, doi: 10.1101/GR.1602203.
- [15] G. Barbarani, A. Labeledz, S. Stucchi, A. Abbiati, and A. E. Ronchi, “Physiological and Aberrant γ -Globin Transcription During Development,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 640060, Apr. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.640060/XML/NLM.
- [16] V. G. Sankaran and S. H. Orkin, “The switch from fetal to adult hemoglobin,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A011643,.
- [17] A. Starlard-Davenport, A. Fitzgerald, and B. S. Pace, “Exploring epigenetic and microRNA approaches for γ -globin gene regulation,” *Exp Biol Med*, vol. 246, no. 22, p. 2347, Nov. 2021, doi: 10.1177/15353702211028195.
- [18] F. C. Jacques, “Análise da expressão de microRNA moduladores da hemoglobina fetal em células expostas a extratos de Carica papaya,” 2023. Accessed: Jun. 26, 2025. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10400.21/16986>
- [19] S. N. Costa, S. Madeira, M. A. Sobral, and G. Delgadinho, “Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família,” *Rev Port Med Geral Fam*, vol. 32, pp. 416–424, 2016, Accessed: Apr. 26, 2025. [Online]. Available: <https://rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/download/11963/11309>
- [20] N. Yat, 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 Notices*, vol. 2014, no. 1, p. 123257, Jan. 2014, doi: 10.1155/2014/123257.
- [21] H. K. Verma, S. Lakkakula, and B. V. K. S. Lakkakula, “Retrospection of the effect of hydroxyurea treatment in patients with sickle cell disease,” *Acta Haematol Pol*, vol. 49, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.2478/AHP-2018-0001.
- [22] M. F. Sonati and F. F. Costa, “The genetics of blood disorders: Hereditary hemoglobinopathies,” *J Pediatr (Rio J)*, vol. 84, no. 4 SUPPL., pp. 40–51, 2008, doi: 10.2223/JPED.1802,.
- [23] L. Luzzatto, “Sickle cell anaemia and malaria,” *Mediterr J Hematol Infect Dis*, vol. 4, no. 1, 2012, doi: 10.4084/MJHID.2012.065,.
- [24] R. C. Hardison, “Evolution of Hemoglobin and Its Genes,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 12, p. a011627, 2012, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A011627.
- [25] V. G. Sankaran and M. J. Weiss, “Anemia: Progress in molecular mechanisms and therapies,” *Nat Med*, vol. 21, no. 3, pp. 221–230, 2015, doi: 10.1038/NM.3814,.

- [26] T. Somervaille, "Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management," *J R Soc Med*, vol. 94, no. 11, p. 602, 2001, Accessed: Apr. 26, 2025. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1282256/>
- [27] W. G. Wood, J. B. Clegg, and D. J. Weatherall, "Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin (HPFH) and $\delta\beta$ Thalassaemia," *Br J Haematol*, vol. 43, no. 4, pp. 509–520, Dec. 1979, doi: 10.1111/J.1365-2141.1979.TB03784.X;CTYPE:STRING:JOURNAL.
- [28] G. Lettre *et al.*, "DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 33, pp. 11869–11874, Aug. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0804799105,.
- [29] S. Menzel and S. L. Thein, "Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin in Sickle Cell Disease," *Mol Diagn Ther*, vol. 23, no. 2, pp. 235–244, Apr. 2019, doi: 10.1007/S40291-018-0370-8,.
- [30] L. I. Lavouras, "Hemoglobinopatias: diagnóstico laboratorial e sua importância," Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.
- [31] D. C. Rees, T. N. Williams, and M. T. Gladwin, "Sickle-cell disease," *The Lancet*, vol. 376, no. 9757, pp. 2018–2031, 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X.
- [32] S. L. Thein, "The emerging role of fetal hemoglobin induction in non-transfusion-dependent thalassemia," *Blood Rev*, vol. 26, no. SUPPL.1, Apr. 2012, doi: 10.1016/S0268-960X(12)70011-5.
- [33] N. A. Imaga, Y. Al-Tonbary, M. A. Badr, A. El-Beshlawy, and A. Mansour, "Phytomedicines and Nutraceuticals: Alternative Therapeutics for Sickle Cell Anemia," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, no. 1, p. 269659, Jan. 2013, doi: 10.1155/2013/269659.
- [34] Y. C. Tanhehco, "Gene therapy for hemoglobinopathies," *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 60, no. 1, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.TRANSCI.2021.103061,.
- [35] 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, Apr. 2019, doi: 10.1111/EJH.13212,.
- [36] G. J. Kato *et al.*, "Sickle cell disease," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 4, Mar. 2018, doi: 10.1038/NRDP.2018.10,.
- [37] 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, Jul. 2020, doi: 10.1080/09286586.2020.1723114,.

- [38] E. M. Novelli and M. T. Gladwin, "Crises in sickle cell disease," *Chest*, vol. 149, no. 4, pp. 1082–1093, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.chest.2015.12.016.
- [39] R. Helman, R. D. Cançado, and C. Olivatto, "Incidence of alloimmunization in sickle cell disease: experience of a center in São Paulo," *Einstein (São Paulo)*, vol. 9, no. 2, pp. 160–164, Jun. 2011, doi: 10.1590/S1679-45082011AO2003.
- [40] A. Khalyfa *et al.*, "Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes," *Br J Haematol*, vol. 174, no. 5, pp. 786–798, Sep. 2016, doi: 10.1111/BJH.14104,.
- [41] A. Starlard-Davenport, A. Fitzgerald, and B. S. Pace, "Exploring epigenetic and microRNA approaches for γ -globin gene regulation," *Exp Biol Med*, vol. 246, no. 22, pp. 2347–2357, Nov. 2021, doi: 10.1177/15353702211028195/PDF.
- [42] C. Fonseca, F. Marques, A. R. Nunes, A. Belo, D. Brilhante, and J. Cortez, "Prevalence of anaemia and iron deficiency in Portugal: the EMPIRE study," *Intern Med J*, pp. 470–478, 2016, doi: 10.1111/imj.13020.
- [43] 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, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.JOPR.2013.10.002.
- [44] R. Risoluti, R. Colah, and S. Materazzi, "Editorial: Frontiers in hemoglobinopathies: New insights and methods," 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmolb.2021.632916.
- [45] S. Lanka and S. Lanka, "Population Screening for Hemoglobinopathies," *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, vol. 19, pp. 12–13, 2018, doi: 10.1146/annurev-genom-091416.
- [46] A. M. Brandow and R. I. Liem, "Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease," Dec. 01, 2022, *BioMed Central Ltd.* doi: 10.1186/s13045-022-01237-z.
- [47] R. E. Ware, "How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia," *Blood*, vol. 115, no. 26, pp. 5300–5311, Jul. 2010, doi: 10.1182/BLOOD-2009-04-146852.
- [48] H. Frangoul *et al.*, "CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia," *New England Journal of Medicine*, vol. 384, no. 3, pp. 252–260, Jan. 2021, doi: 10.1056/NEJMOA2031054,.
- [49] E. 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.
- [50] F. Iftikhar *et al.*, "In Vitro and In Vivo Studies for the Investigation of γ -Globin Gene Induction by *Adhatoda vasica*: A Pre-Clinical Study of HbF Inducers for β -

- Thalassemia,” *Front Pharmacol*, vol. 13, p. 797853, Mar. 2022, doi: 10.3389/FPHAR.2022.797853/FULL.
- [51] L. Abdel-Hadi, Y. Ventura Carmenate, Y. Marx Castillo-Aleman, S. Sheikh, A. Zakaria, and J. Phillips, “Treatment of sickle cell disease-options and perspective,” *Am J Blood Res*, vol. 13, no. 2, pp. 61–70, 2023, [Online]. Available: www.AJBlood.us/
- [52] G. E. Linder and S. T. Chou, “Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease,” *Haematologica*, vol. 106, no. 7, pp. 1805–1815, Jul. 2021, doi: 10.3324/HAEMATOL.2020.270546,.
- [53] 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,” *New England Journal of Medicine*, vol. 339, no. 1, pp. 5–11, Jul. 1998, doi: 10.1056/NEJM199807023390102,.
- [54] V. Bell, T. Varzakas, T. Psaltopoulou, and T. Fernandes, “Sickle Cell Disease Update: New Treatments and Challenging Nutritional Interventions,” Jan. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/nu16020258.
- [55] J. Howard, “Sickle cell disease: When and how to transfuse,” *Hematology (United States)*, vol. 2016, no. 1, pp. 625–631, 2016, doi: 10.1182/ASHEDUCATION-2016.1.625,.
- [56] 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, Mar. 2011, doi: 10.1111/J.1365-2141.2010.08451.X,.
- [57] C. Elendu *et al.*, “Understanding Sickle cell disease: Causes, symptoms, and treatment options,” *Medicine (United States)*, vol. 102, no. 38, p. E35237, Sep. 2023, doi: 10.1097/MD.00000000000035237.
- [58] M. M. Meremikwu and U. Okomo, “Sickle cell disease,” *BMJ Clin Evid*, vol. 2016, p. 2402, Jan. 2016, Accessed: May 16, 2025. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4725622/>
- [59] R. E. Ware, M. de Montalembert, L. Tshilolo, and M. R. Abboud, “Sickle cell disease,” *The Lancet*, vol. 390, no. 10091, pp. 311–323, Jul. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9.
- [60] 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, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.mayocp.2018.08.001.

- [61] G. Salinas Cisneros and S. L. Thein, “Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease,” *Front Physiol*, vol. 11, p. 513588, May 2020, doi: 10.3389/FPHYS.2020.00435/XML/NLM.
- [62] 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, Jul. 2021, doi: 10.1111/BJH.17312,.
- [63] J. M. Gonzalez Sepulveda *et al.*, “Preferences for potential benefits and risks for gene therapy in the treatment of sickle cell disease,” *Blood Adv*, vol. 7, no. 23, pp. 7371–7381, Dec. 2023, doi: 10.1182/bloodadvances.2023009680.
- [64] 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, Oct. 2019, doi: 10.1093/HMG/DDZ172,.
- [65] M. Cavazzana and F. Mavilio, “Gene Therapy for Hemoglobinopathies,” *Hum Gene Ther*, vol. 29, no. 10, pp. 1106–1113, Oct. 2018, doi: 10.1089/HUM.2018.122,.
- [66] C. Brendel and D. A. Williams, “Current and future gene therapies for hemoglobinopathies,” May 01, 2020, *Lippincott Williams and Wilkins*. doi: 10.1097/MOH.0000000000000581.
- [67] 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, Jun. 2022, doi: 10.3390/CELLS11111843,.
- [68] G. D. Ginder, “Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells,” Jan. 01, 2015, *Mosby Inc*. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.002.
- [69] P. Huang *et al.*, “HIC2 controls developmental hemoglobin switching by repressing BCL11A transcription,” *Nat Genet*, vol. 54, no. 9, pp. 1417–1426, Sep. 2022, doi: 10.1038/s41588-022-01152-6.
- [70] S. H. Orkin, “The Fetal-to-Adult Hemoglobin Switch — Mechanism and Therapy,” *New England Journal of Medicine*, vol. 392, no. 21, pp. 2135–2149, Jun. 2025, doi: 10.1056/NEJMra2405260.
- [71] “Approved Cellular and Gene Therapy Products | FDA.” Accessed: Jun. 16, 2025. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
- [72] H. Fathallah and G. F. Atweh, “Induction of Fetal Hemoglobin in the Treatment of Sickle Cell Disease,” *American Society of Hematology*, 2024, [Online]. Available: http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2006/1/58/1091502/058_062ash.pdf

- [73] T. Kassa, F. Wood, M. Brad Strader, and A. I. Alayash, "Antisickling drugs targeting β Cys93 reduce iron oxidation and oxidative changes in sickle cell hemoglobin," *Front Physiol*, vol. 10, no. JUL, 2019, doi: 10.3389/FPHYS.2019.00931,.
- [74] J. Watson, "The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants," *Am J Med Sci*, vol. 215, no. 4, pp. 419–423, Apr. 1948, doi: 10.1097/00000441-194804000-00008,.
- [75] I. Rahimmanesh *et al.*, "Gene Editing-Based Technologies for Beta-hemoglobinopathies Treatment," *Biology (Basel)*, vol. 11, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/BIOLOGY11060862,.
- [76] A. Matte, F. Zorzi, F. Mazzi, E. Federti, O. Olivieri, and L. De Franceschi, "New therapeutic options for the treatment of sickle cell disease," *Mediterr J Hematol Infect Dis*, vol. 11, no. 1, 2019, doi: 10.4084/MJHID.2019.002,.
- [77] G. C. S. Carrocini, L. S. Ondej, 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," *Genetics and Molecular Research*, vol. 10, no. 4, pp. 3213–3219, Dec. 2011, doi: 10.4238/2011.DECEMBER.21.3,.
- [78] I. Shaukat, A. Paudel, S. Yassin, N. Höti, and S. Mustafa, "Blessing in disguise; a case of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin," *J Community Hosp Intern Med Perspect*, vol. 8, no. 6, pp. 380–381, Nov. 2018, doi: 10.1080/20009666.2018.1536241.
- [79] J. Old, "Hemoglobinopathies and Thalassemias," *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, pp. 1–44, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-383834-6.00075-6.
- [80] 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, Dec. 2010, doi: 10.1038/NG.707,.
- [81] 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,.
- [82] S. Eridani, F. Avemaria, and A. Mosca, "Reactivation of Fetal Hemoglobin in Thalassemia and Sickle Cell Disease," *Thalassemia Reports 2014, Vol. 4, Page 2196*, vol. 4, no. 2, p. 2196, Sep. 2014, doi: 10.4081/THAL.2014.2196.
- [83] 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, Jun. 2015, doi: 10.4314/GMJ.V49I2.7,.

- [84] “FDA approves hydroxyurea for treatment of pediatric patients with sickle cell anemia | FDA.” Accessed: May 16, 2025. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-hydroxyurea-treatment-pediatric-patients-sickle-cell-anemia>
- [85] S. P. Singh *et al.*, “Therapeutic application of *Carica papaya* leaf extract in the management of human diseases,” *J Pharm Sci*, vol. 28, pp. 735–744, 2020, doi: 10.1007/s40199-020-00348-7/Published.
- [86] N. Yasara, A. Premawardhena, and S. Mettananda, “A comprehensive review of hydroxyurea for β -haemoglobinopathies: the role revisited during COVID-19 pandemic,” Dec. 01, 2021, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s13023-021-01757-w.
- [87] S. Jinna and P. B. Khandhar, “Hydroxyurea Toxicity,” *StatPearls*, Aug. 2023, Accessed: May 16, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537209/>
- [88] L. Tshilolo *et al.*, “Hydroxyurea for Children with Sickle Cell Anemia in Sub-Saharan Africa,” *New England Journal of Medicine*, vol. 380, no. 2, pp. 121–131, Jan. 2019, doi: 10.1056/NEJMOA1813598,.
- [89] 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,.
- [90] M. W. Musiałek and D. Rybaczek, “Hydroxyurea—the good, the bad and the ugly,” *Genes (Basel)*, vol. 12, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/GENES12071096,.
- [91] 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, Feb. 2023, doi: 10.1182/BLOOD.2022016620,.
- [92] 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, May 2020, doi: 10.1097/MOH.0000000000000582,.
- [93] 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, May 2022, doi: 10.1002/AJH.26495,.
- [94] 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, Feb. 2021, doi: 10.1182/BLOOD.2020006270,.
- [95] M. T. Lee and U. O. Ogu, “Sickle cell disease in the new era: advances in drug treatment,” *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 61, no. 5, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.transci.2022.103555.

- [96] E. Gonçalves, S. Smaoui, M. Brito, J. M. Oliveira, A. P. Arez, and L. Tavares, "Sickle Cell Disease: Current Drug Treatments and Functional Foods with Therapeutic Potential," Jun. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/cimb46060349.
- [97] 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 β -Thalassemia and Sickle-Cell Anemia," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, no. 2, pp. 141–151, Jan. 2009, doi: 10.1093/ECAM/NEM139.
- [98] N. Gogna, N. Hamid, and K. Dorai, "Metabolomic profiling of the phytomedicinal constituents of *Carica papaya* L. leaves and seeds by ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 115, pp. 74–85, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.06.035.
- [99] 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, Jan. 2013, doi: 10.1002/MNFR.201200388,.
- [100] 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, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.APJTb.2016.12.009.
- [101] 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, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.jep.2014.05.050.
- [102] N. A. Imaga and O. A. Adepoju, "Analyses of antisickling potency of *Carica papaya* dried leaf extract and fractions," *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, vol. 2, no. 7, pp. 97–102, 2010, [Online]. Available: <http://www.academicjournals.org/jpp>
- [103] O. E. Adejumo, M. D. Ayoola, A. L. Kolapo, V. O. Orimoyegun, and P. O. Olatunji, "Antisickling activities of extracts of leaf, seed and seed pod of *Garcinia kola* Heckel," *Afr J Pharm Pharmacol*, vol. 5, no. 1, pp. 48–52, 2011, doi: 10.5897/ajpp10.052.
- [104] M. P. Okoh, L. A. Alli, M. E. E. Tolvanen, and M. M. Nwegbu, "Herbal Drug use in Sickle Cell Disease Management; Trends and Perspectives in Sub-Saharan Africa - A Systematic Review," *Curr Drug Discov Technol*, vol. 16, no. 4, pp. 372–385, Oct. 2018, doi: 10.2174/1570163815666181002101611.

- [105] A. Naiho, B. Okonkwo, and C. Okoukwu, "Anti-Sickling and Membrane Stabilizing Effects of *Carica papaya* Leaf Extract," *Br J Med Med Res*, vol. 6, no. 5, pp. 484–492, Jan. 2015, doi: 10.9734/bjmmr/2015/14608.
- [106] B. Canteiro *et al.*, "Effects of Quercetin in transcriptional and post-transcriptional regulation of fetal hemoglobin," in *2023 IEEE 7th Portuguese Meeting on Bioengineering, ENBENG 2023*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2023, pp. 140–143. doi: 10.1109/ENBENG58165.2023.10175363.
- [107] Y. R. Kong *et al.*, "Beneficial role of carica papaya extracts and phytochemicals on oxidative stress and related diseases: A mini review," Apr. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/biology10040287.
- [108] M. Abdullah *et al.*, "Carica papaya increases regulatory T cells and reduces IFN- γ +CD4+ T cells in healthy human subjects," *Mol Nutr Food Res*, vol. 55, no. 5, pp. 803–806, May 2011, doi: 10.1002/mnfr.201100087.
- [109] N. O. A. Imaga *et al.*, "Antisickling property of *Carica papaya* leaf extract," *African Journal of Biochemistry Research*, vol. 3, no. 4, pp. 102–106, 2009, [Online]. Available: <http://www.academicjournals.org/AJBR>
- [110] 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, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.HERMED.2013.04.004.
- [111] O. Adetayo Modupe, O. S. Shokunbi, A. T. Oyelese, and A. M. Adetayo, "In-vitro antisickling and sickling-reversal activities of *Carica papaya* fruit at different stages of ripening," *Babcock University Medical Journal*, vol. 3, no. 2, pp. 10–18, Dec. 2020, doi: 10.38029/bumj.v3i2.38.
- [112] A. Kumari, S. Bhawal, S. Kapila, H. Yadav, and R. Kapila, "Health-promoting role of dietary bioactive compounds through epigenetic modulations: a novel prophylactic and therapeutic approach," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 62, no. 3, pp. 619–639, 2022, doi: 10.1080/10408398.2020.1825286;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
- [113] A. S. Quina, M. Buschbeck, and L. Di Croce, "Chromatin structure and epigenetics," *Biochem Pharmacol*, vol. 72, no. 11, pp. 1563–1569, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.BCP.2006.06.016,.
- [114] S. Cheedipudi, O. Genolet, and G. Dobрева, "Epigenetic inheritance of cell fates during embryonic development," *Front Genet*, vol. 5, no. FEB, p. 76275, Feb. 2014, doi: 10.3389/FGENE.2014.00019/BIBTEX.

- [115] G. L. Russo and P. Ungaro, "Epigenetic Mechanisms of Quercetin and Other Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention," *Epigenetics of Cancer Prevention*, pp. 187–202, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-812494-9.00009-3.
- [116] C. Busch, M. Burkard, C. Leischner, U. M. Lauer, J. Frank, and S. Venturelli, "Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer," *Clin Epigenetics*, vol. 7, no. 1, pp. 1–18, Jul. 2015, doi: 10.1186/S13148-015-0095-Z/FIGURES/3.
- [117] J. Mierziak, K. Kostyn, A. Boba, M. Czemplik, A. Kulma, and W. Wojtasik, "Influence of the Bioactive Diet Components on the Gene Expression Regulation," *Nutrients* 2021, Vol. 13, Page 3673, vol. 13, no. 11, p. 3673, Oct. 2021, doi: 10.3390/NU13113673.
- [118] D. Rossetto, N. Avvakumov, and J. Côté, "Histone phosphorylation," *Epigenetics*, vol. 7, no. 10, pp. 1098–1108, Oct. 2012, doi: 10.4161/EPI.21975.
- [119] 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,.
- [120] M. H. Kuo and C. D. Allis, "Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation," *BioEssays*, vol. 20, no. 8, pp. 615–626, Aug. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H,.
- [121] S. H. Akone *et al.*, "Natural Products Impacting DNA Methyltransferases and Histone Deacetylases," *Front Pharmacol*, vol. 11, p. 551178, Aug. 2020, doi: 10.3389/FPHAR.2020.00992/XML/NLM.
- [122] 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," *Biochemical Journal*, vol. 370, no. 3, pp. 737–749, Mar. 2003, doi: 10.1042/BJ20021321,.
- [123] 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, Mar. 2007, doi: 10.1038/SJ.CR.7310149,.
- [124] S. P. Perrine *et al.*, "Fetal globin gene inducers: Novel agents and new potential," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, Blackwell Publishing Inc., 2010, pp. 158–164. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05593.x.
- [125] 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, Jun. 2013, doi: 10.1042/BST20130010,.

- [126] C. M. Kiefer, C. Hou, J. A. Little, and A. Dean, "Epigenetics of β -globin gene regulation," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 647, no. 1–2, pp. 68–76, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.014.
- [127] D. Lavelle, J. D. Engel, and Y. Sauntharajah, "Fetal Hemoglobin Induction by Epigenetic Drugs," *Semin Hematol*, vol. 55, no. 2, pp. 60–67, Apr. 2018, doi: 10.1053/J.SEMINHEMATOL.2018.04.008.
- [128] Y. Gong *et al.*, "A natural DNMT1 mutation elevates the fetal hemoglobin level via epigenetic derepression of the γ -globin gene in β -thalassemia," *Blood*, vol. 137, no. 12, pp. 1652–1657, Mar. 2021, doi: 10.1182/BLOOD.2020006425,.
- [129] 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, Mar. 2009, doi: 10.1038/NSMB.1568;KWRD=LIFE+SCIENCES.
- [130] G. P. dos Santos, L. T. Rabi, A. A. Bezerra, M. R. da Cunha, A. Iatecola, and V. A. R. Fernandes, "Transcriptional regulators of fetal hemoglobin," *Hematol Transfus Cell Ther*, vol. 46, pp. S258–S268, Nov. 2024, doi: 10.1016/J.HTCT.2024.06.001.
- [131] 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, Mar. 2022, doi: 10.1007/S11033-021-06977-8,.
- [132] 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,.
- [133] M. De Martino *et al.*, "Transcriptional Repressors of Fetal Globin Genes as Novel Therapeutic Targets in Beta-Thalassemia," *Beta Thalassemia*, Jan. 2020, doi: 10.5772/INTECHOPEN.90762.
- [134] N. A. Zakaria *et al.*, "Epigenetic insights and potential modifiers as therapeutic targets in β -thalassemia," *Biomolecules*, vol. 11, no. 5, May 2021, doi: 10.3390/BIOM11050755,.
- [135] 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, Nov. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2007-02-076091,.

- [136] A. Basak and V. G. Sankaran, "Regulation of the fetal hemoglobin silencing factor BCL11A," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1368, no. 1, pp. 25–30, Mar. 2016, doi: 10.1111/NYAS.13024,.
- [137] R. Kumar *et al.*, "Krüppel-like factor 1 (KLF1) gene single nucleotide polymorphisms in sickle cell disease and its association with disease-related morbidities," *Ann Hematol*, vol. 100, no. 2, pp. 365–373, Feb. 2021, doi: 10.1007/S00277-020-04381-Z/TABLES/6.
- [138] J. Yin, X. Xie, Y. Ye, L. Wang, and F. Che, "BCL11A: A potential diagnostic biomarker and therapeutic target in human diseases," *Biosci Rep*, vol. 39, no. 11, 2019, doi: 10.1042/BSR20190604,.
- [139] M. Salmon and M. Salmon, "Transcriptional and Epigenetic Regulation of Krüppel-Like Transcription Factors," *Gene Expression and Phenotypic Traits*, Mar. 2020, doi: 10.5772/INTECHOPEN.91652.
- [140] M. R. Tallack and A. C. Perkins, "Three fingers on the switch: Krüppel-like factor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching," *Curr Opin Hematol*, vol. 20, no. 3, pp. 193–200, May 2013, doi: 10.1097/MOH.0B013E32835F59BA,.
- [141] D. Zhou, K. Liu, C. W. Sun, K. M. Pawlik, and T. M. Townes, "KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching," *Nat Genet*, vol. 42, no. 9, pp. 742–744, Aug. 2010, doi: 10.1038/NG.637;SUBJMETA=176,177,200,2016,208,212,337,631;KWRD=EPIG ENOMICS,GENE+REGULATION,GENE+SILENCING.
- [142] A. Wilber, A. W. Nienhuis, and D. A. Persons, "Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: New therapeutic opportunities," *Blood*, vol. 117, no. 15, pp. 3945–3953, Apr. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2010-11-316893,.
- [143] N. Lohani, N. Bhargava, A. Munshi, and S. Ramalingam, "Pharmacological and molecular approaches for the treatment of β -hemoglobin disorders," *J Cell Physiol*, vol. 233, no. 6, pp. 4563–4577, Jun. 2018, doi: 10.1002/JCP.26292,.
- [144] I. Akinsheye *et al.*, "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia," *Blood*, vol. 118, no. 1, pp. 19–27, Jul. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2011-03-325258,.
- [145] 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, Jul. 2007, doi: 10.1073/PNAS.0611393104,.
- [146] J. Jiang *et al.*, "cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults," *Blood*, vol. 108, no. 3, pp. 1077–1083, Aug. 2006, doi: 10.1182/BLOOD-2006-01-008912.

- [147] “HIC2 HIC ZBTB transcriptional repressor 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.” Accessed: Jul. 02, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23119>
- [148] 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, Nov. 2022, doi: 10.1182/BLOOD-2022-165286.
- [149] M. S. Ivaldi, L. F. Diaz, L. Chakalova, J. Lee, I. Krivega, and A. Dean, “Fetal g-globin genes are regulated by the BGLT3 long noncoding RNA locus,” *Blood*, vol. 132, no. 18, pp. 1963–1973, Nov. 2018, doi: 10.1182/BLOOD-2018-07-862003,.
- [150] 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, Aug. 2017, doi: 10.1101/GAD.303461.117,.
- [151] 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, Jul. 2022, doi: 10.3390/IJMS23137025,.
- [152] G. A. Blobel and M. Crossley, “Charting a noncoding gene for g-globin activation,” *Blood*, vol. 132, no. 18, pp. 1865–1867, Nov. 2018, doi: 10.1182/BLOOD-2018-09-873620,.
- [153] Y. Fang and M. J. Fullwood, “Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer,” *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol. 14, no. 1, pp. 42–54, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.GPB.2015.09.006,.
- [154] Thermo Fisher Scientific, *Cell culture basics handbook*. gibco, 2020. Accessed: Apr. 26, 2025. [Online]. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>
- [155] Sigma-Aldrich, *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*, 3^a Edição. 2016. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/425/663/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf?srsltid=AfmBOoo8yNymNCWZzPMGBkPp6Xklc57nmKztDv6ar6IE9uc7zCYSM8bq>
- [156] B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 6^a Edição. W.W. Norton & Company, 2015. doi: 10.1201/9781315735368.
- [157] R. Ian. Freshney, Amanda. Capes-Davis, Carl. Gregory, and Stefan. Przyborski, *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*, 7^a Edição. Wiley-Blackwell, 2016. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://www.wiley.com/en->

us/Culture+of+Animal+Cells%3A+A+Manual+of+Basic+Technique+and+Speciali
zed+Applications%2C+7th+Edition-p-9781118873649

- [158] R. I. Freshney, *Animal Cell Culture Guide: A Manual of Basic Technique*, 5^a Edição. ATCC - American Type Culture Collection. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>
- [159] Invitrogen and Gibco, *Cell Culture Basics Handbook Cell Culture Basics Cell Culture Basics Cell Culture Basics*. gibco. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: www.invitrogen.com/cellculturebasics
- [160] 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,.
- [161] C. B. Lozzio and B. B. Lozzio, "Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome," *Blood*, vol. 45, no. 3, pp. 321–334, Mar. 1975, doi: 10.1182/BLOOD.V45.3.321.321.
- [162] American Type Culture Collection, *K-562 - CCL-243 Product Sheet*. ATCC - American Type Culture Collection, 2023. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/ccl-243>
- [163] 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.
- [164] E. Fibach and E. A. Rachmilewitz, "The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1202, pp. 10–16, 2010, doi: 10.1111/J.1749-6632.2010.05577.X,.
- [165] R. Mabaera *et al.*, "A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger," *Exp Hematol*, vol. 36, no. 9, pp. 1057–1072, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.exphem.2008.06.014.
- [166] W. Strober, "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability," *Curr Protoc Immunol*, vol. 111, no. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, Nov. 2015, doi: 10.1002/0471142735.IMA03BS111,.
- [167] T. L. Riss *et al.*, "Cell Viability Assays," *Assay Guidance Manual*, Jul. 2016, Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [168] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity," *Eur J Biochem*, vol. 267, no. 17, pp. 5421–5426, Sep. 2000, doi: 10.1046/J.1432-

1327.2000.01606.X;WEBSITE:WEBSITE:FEBS;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.

- [169] F. K. M. Chan, K. Moriwaki, and M. J. De Rosa, "Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity," *Methods in Molecular Biology*, vol. 979, pp. 65–70, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-290-2_7.
- [170] G. Fotakis and J. A. Timbrell, "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicol Lett*, vol. 160, no. 2, pp. 171–177, Jan. 2006, doi: 10.1016/J.TOXLET.2005.07.001.
- [171] 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,.
- [172] C.-H. Shen, "Detection and Analysis of Nucleic Acids," *Diagnostic Molecular Biology*, pp. 167–185, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9.
- [173] B. Matlock, *Assessment of Nucleic Acid Purity (NanoDrop)*. Thermo Scientific, 2015. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: www.thermoscientific.com
- [174] K. L. Manchester, "Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations," *Biotechniques*, vol. 20, no. 6, pp. 968–970, 1996, doi: 10.2144/96206BM05,.
- [175] Thermo Scientific and NanoDrop Products, *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios - T123 Technical Bulletin*. Thermo Scientific, 2012. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: www.thermoscientific.com/nanodrop
- [176] "qPCR efficiency calculations.," *Biotechniques*, vol. 51, no. 6, pp. 401–402, Dec. 2011, doi: 10.2144/000113776,.
- [177] 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, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005.
- [178] Bio-Rad, *The Ultimate qPCR Assay Design Guide*. Bio-Rad, 2019. Accessed: May 01, 2025. [Online]. Available: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf
- [179] E. Ribeiro *et al.*, "Epigenetic and Transcriptional Modulator Potential of Epigallocatechin-3-gallate and Genistein on Fetal Hemoglobin Reactivators Genes," *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, vol. 2, no. 2, p. 100034, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.CCMP.2022.100034.

- [180] M. M. R. Sarker, F. Khan, and I. N. Mohamed, "Dengue Fever: Therapeutic Potential of *Carica papaya* L. Leaves," Apr. 26, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fphar.2021.610912.
- [181] M. Amzad Hossain, S. Hitam, and S. Hadidja Ibrahim Ahmed, "Pharmacological and toxicological activities of the extracts of papaya leaves used traditionally for the treatment of diarrhea," *J King Saud Univ Sci*, vol. 32, no. 1, pp. 962–969, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jksus.2019.07.006.
- [182] J. Nishad, "Stability of plant extracts," *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, pp. 89–126, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-822475-5.00007-7.
- [183] K. Trakarnsanga *et al.*, "An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells," *Nature Communications 2017 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2017, doi: 10.1038/ncomms14750.
- [184] C. F. Cervellera *et al.*, "Immortalized erythroid cells as a novel frontier for in vitro blood production: current approaches and potential clinical application," *Stem Cell Research & Therapy 2023 14:1*, vol. 14, no. 1, pp. 1–13, May 2023, doi: 10.1186/S13287-023-03367-8.
- [185] D. E. Daniels *et al.*, "Comparing the two leading erythroid lines BEL-A and HUDEP-2," *Haematologica*, vol. 105, no. 8, pp. e389–e394, Aug. 2020, doi: 10.3324/HAEMATOL.2019.229211.
- [186] J. S. Hawksworth, "CRISPR-Cas9 gene editing in an immortalized erythroid cell line for production of engineered red blood cells," University of Bristol - School of Biochemistry, 2019. Accessed: May 02, 2025. [Online]. Available: <https://research-information.bris.ac.uk/en/studentTheses/crispr-cas9-gene-editing-in-an-immortalized-erythroid-cell-line-f>
- [187] X. Huang *et al.*, "Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation," *Stem Cells*, vol. 33, no. 5, p. 1470, May 2015, doi: 10.1002/STEM.1969.
- [188] Z. Ismail, S. Z. Halim, N. R. Abdullah, A. Afzan, B. A. Abdul Rashid, and I. Jantan, "Safety evaluation of oral toxicity of *Carica papaya* Linn. Leaves: A subchronic toxicity study in Sprague Dawley rats," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/741470.
- [189] M. López Rubio and M. Argüello Marina, "The Current Role of Hydroxyurea in the Treatment of Sickle Cell Anemia," *Journal of Clinical Medicine 2024, Vol. 13, Page 6404*, vol. 13, no. 21, p. 6404, Oct. 2024, doi: 10.3390/JCM13216404.

- [190] F. Z. Nisa, M. Astuti, A. Murdiati, and S. M. Haryana, "Anti-proliferation and apoptosis induction of aqueous leaf extract of *Carica papaya* L. On human breast cancer cells MCF-7," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 20, no. 1, pp. 36–41, 2017, doi: 10.3923/PJBS.2017.36.41,.
- [191] N. Otsuki, N. H. Dang, E. Kumagai, A. Kondo, S. Iwata, and C. Morimoto, "Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects," *J Ethnopharmacol*, vol. 127, no. 3, pp. 760–767, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jep.2009.11.024.
- [192] T. C. Albershardt, B. M. Iritani, and A. Ruddell, "Evaluation of reference genes for quantitative PCR analysis of mouse lymphocytes," *J Immunol Methods*, vol. 384, no. 1–2, pp. 196–199, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.JIM.2012.07.020,.
- [193] W. Ju *et al.*, "Validation of Housekeeping Genes as Reference for Reverse-Transcription-qPCR Analysis in Busulfan-Injured Microvascular Endothelial Cells," *Biomed Res Int*, vol. 2018, no. 1, p. 4953806, Jan. 2018, doi: 10.1155/2018/4953806.
- [194] J. Lin and C. Redies, "Histological evidence: Housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression," *Dev Genes Evol*, vol. 222, no. 6, pp. 369–376, Nov. 2012, doi: 10.1007/S00427-012-0420-X/FIGURES/4.
- [195] R. Krishnan, S. S. N. Qadiri, J. O. Kim, J. O. Kim, and M. J. Oh, "Validation of housekeeping genes as candidate internal references for quantitative expression studies in healthy and nervous necrosis virus-infected seven-band grouper (*Hyporthodus septemfasciatus*)," *Fish Aquatic Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 1–8, Dec. 2019, doi: 10.1186/S41240-019-0142-3/FIGURES/5.
- [196] E. Panagodimou *et al.*, "Expression stability of ACTB, 18S, and GAPDH in human placental tissues from subjects with PCOS and controls: GAPDH expression is increased in PCOS," *Hormones*, vol. 21, no. 2, pp. 329–333, Jun. 2022, doi: 10.1007/S42000-022-00372-Z,.
- [197] K. H. Ho and A. Patrizi, "Assessment of common housekeeping genes as reference for gene expression studies using RT-qPCR in mouse choroid plexus," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-82800-5;SUBJMETA=136,378,631;KWRD=DEVELOPMENTAL+BIOLOGY,NEUROSCIENCE.
- [198] I. Gheith and A. El-Mahmoudy, "Hemogram and iron indices in renal anemia and the amelioration with *Carica papaya* leaf extract applied on albino rat model," *Biosci Rep*, vol. 39, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1042/BSR20181699,.

- [199] A. HA *et al.*, “Pre-clinical protective potentials of Carica papaya constituents in experimentally induced anemia,” *Am J Transl Res*, vol. 16, no. 7, pp. 3259–3272, 2024, doi: 10.62347/ZQDC9694.
- [200] J. Jodynis-liebert and M. Kujawska, “Biphasic Dose-Response Induced by Phytochemicals: Experimental Evidence,” *Journal of Clinical Medicine 2020*, Vol. 9, Page 718, vol. 9, no. 3, p. 718, Mar. 2020, doi: 10.3390/JCM9030718.
- [201] J. Y. Métais *et al.*, “Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin,” *Blood Adv*, vol. 3, no. 21, pp. 3379–3392, Nov. 2019, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2019000820,.
- [202] L. A Alli and M. P Okoh, “Phyto-Medicine in Gene(s) Targeting Future Direction for Sickle Cell Disease Management,” *Hereditary Genetics*, vol. 5, no. 2, 2016, doi: 10.4172/2161-1041.1000169.
- [203] S. Takase *et al.*, “A specific G9a inhibitor unveils BGLT3 lncRNA as a universal mediator of chemically induced fetal globin gene expression,” *Nat Commun*, vol. 14, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/S41467-022-35404-0,.
- [204] M. Delgadoinho, C. Ginete, B. Santos, A. Miranda, and M. Brito, “Genotypic diversity among angolan children with sickle cell anemia,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 18, no. 10, May 2021, doi: 10.3390/IJERPH18105417,.
- [205] 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, Jul. 2015, doi: 10.1002/AJH.24019.
- [206] P. Vong, H. Ouled-Haddou, and L. Garçon, “Histone Deacetylases Function in the Control of Early Hematopoiesis and Erythropoiesis,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 17, p. 9790, Sep. 2022, doi: 10.3390/IJMS23179790.
- [207] L. E. G. Rietveld, E. Caldenhoven, and H. G. Stunnenberg, “In vivo repression of an erythroid-specific gene by distinct corepressor complexes,” *EMBO Journal*, vol. 21, no. 6, pp. 1389–1397, Mar. 2002, doi: 10.1093/EMBOJ/21.6.1389,.
- [208] L. Varricchio *et al.*, “Identification of NuRSERY, a New Functional HDAC Complex Composed by HDAC5, GATA1, EKLF and pERK Present in Human Erythroid Cells,” *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 50, no. 1, p. 112, 2014, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2014.02.019.
- [209] A. Wei and H. Wu, “Mammalian DNA methylome dynamics: mechanisms, functions and new frontiers,” *Development*, vol. 149, no. 24, p. dev182683, Dec. 2022, doi: 10.1242/DEV.182683.
- [210] D. N. Weinberg *et al.*, “Two competing mechanisms of DNMT3A recruitment regulate the dynamics of de novo DNA methylation at PRC1-targeted CpG

- islands,” *Nature Genetics* 2021 53:6, vol. 53, no. 6, pp. 794–800, May 2021, doi: 10.1038/s41588-021-00856-5.
- [211] K. Mnika *et al.*, “Hydroxyurea-induced miRNA expression in sickle cell disease patients in Africa,” *Front Genet*, vol. 10, no. MAY, 2019, doi: 10.3389/FGENE.2019.00509,.
- [212] H. L. Al-Seadi, M. Z. Sabti, and D. A. Taain, “GC-MS Analysis of Papaya Leaf Extract (*Carica Papaya* L.),” *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, vol. 910, no. 1, Nov. 2021, doi: 10.1088/1755-1315/910/1/012011.
- [213] K. Kadri, “Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications,” *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, Jun. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.86491.
- [214] L. Garibyan and N. Avashia, “Polymerase chain reaction,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, no. 3, pp. 1–4, 2013, doi: 10.1038/jid.2013.1.
- [215] J. Prada-Arismendy and J. E. Castellanos, “Real time PCR. application in dengue studies,” *Colomb Med*, vol. 42, no. 2, pp. 243–258, 2013, doi: 10.25100/CM.V42I2.778.
- [216] J. Rodolpho, S. Lopes, Y. Victor, F. Pinheiro, A. G. Magalhães, and F. L. Campos, “Comparação de protocolos de extração de DNA em Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.)/ Comparison Of DNA Extraction Protocols In Fava-Beans (*Phaseolus lunatus* L.),” *Brazilian Journal of Development*, vol. 7, no. 8, pp. 77786–77806, Aug. 2021, doi: 10.34117/BJDV7N8-137.
- [217] 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, Jun. 2005, doi: 10.1677/JME.1.01755,.
- [218] B. S. Pace *et al.*, “p38 MAP kinase activation mediates γ -globin gene induction in erythroid progenitors,” *Exp Hematol*, vol. 31, no. 11, pp. 1089–1096, 2003, doi: 10.1016/S0301-472X(03)00235-2.
- [219] R. M. Brito and J. Malta-Vacas, “Aplicação do PCR em Tempo Real no estudo de tumores,” *Micron: Revista Técnica de Anatomia Patológica*, 2004.
- [220] M. A. Hoy, “DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction,” *Insect Molecular Genetics*, pp. 307–372, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-415874-0.00008-1.
- [221] 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, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.fm.2011.02.008.

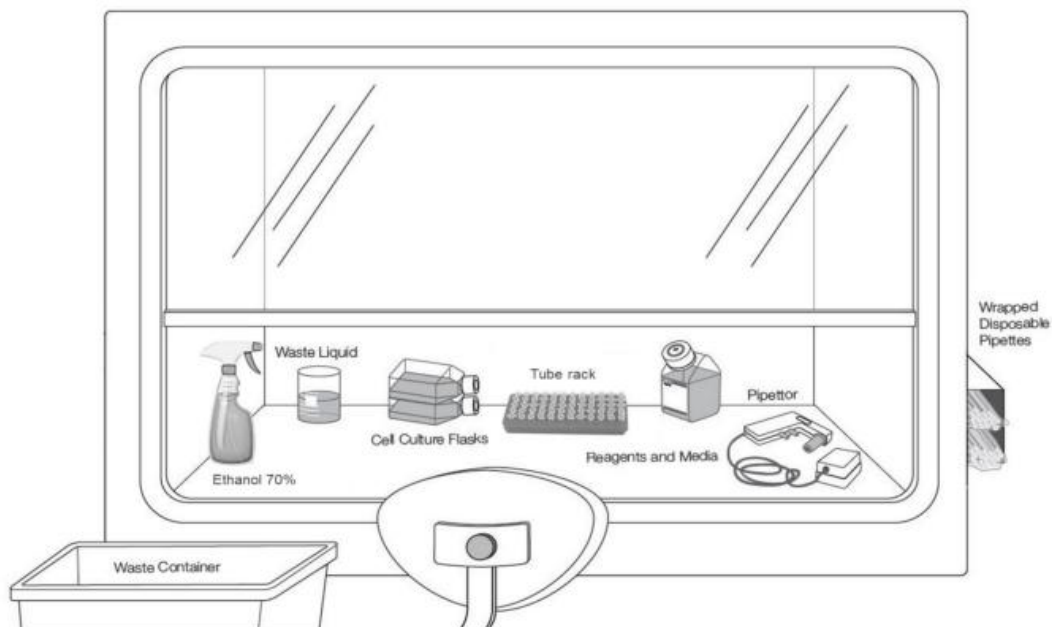
- [222] J. Nestorov, G. Matic, I. Elaković, and N. Tanić, "Gene expression studies: How to obtain accurate and reliable data by quantitative real-time RT PCR," *J Med Biochem*, vol. 32, no. 4, pp. 325–338, Oct. 2013, doi: 10.2478/JOMB-2014-0001.

8. Anexos

Anexo I – Protocolo de Cultura Celular (*H&TRC*)

Regras Básicas de Cultura de Células

- Dentro do laboratório 2.69 utilizar sempre a bata, luvas de nitrilo, apanhar o cabelo e não tocar em nada sem luvas.
- Reservar antecipadamente a utilização do laboratório na folha de marcações.
- Esterilizar a câmara de fluxo com luz UV 20-30 min antes de cada utilização e depois ligar a ventilação, deixando o ar estabilizar durante 5-15 min.
- Limpar a câmara de fluxo antes e depois de cada utilização com etanol 70%, assim como cada material que entrar (frascos, pipetas, caixas de pontas,...).
- Não obstruir as grelhas de ventilação e minimizar distúrbios no fluxo, evitando abrir a porta.
- Preparar um gobelé com lixívia para o descarte de meio de cultura e depois esperar pelo menos 1h para que ocorra a inativação, descartando o conteúdo com bastante água.
- De forma a minimizar o risco de contaminações cruzadas, não manipular células diferentes ao mesmo tempo na câmara de fluxo e fazer falcons de meio para cada linha celular.
- Respeitar o *layout* representado na imagem, mantendo sempre uma zona limpa e suja na câmara de fluxo. Para além disso, manter os frascos abertos o mínimo de tempo possível.



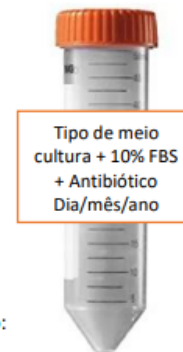
Características das Células segundo o ATCC:

- **K562** – Tipo: células em suspensão; Morfologia: linfoblastos; Tecido: medula óssea; Doença: leucemia mielógena crónica; Manutenção: mudar meio a cada 3 dias, começar nova cultura a 1×10^5 cells/ml e fazer subcultura quando atingem a densidade de 1×10^6 cells/ml em frascos de 75 cm².
- **Hep-2** – Tipo: células aderentes; Morfologia: epitelial; Tecido: derivadas de células HeLa; Doença: carcinoma; Manutenção: mudar meio 2-3x por semana, começar nova cultura a $1-3 \times 10^4$ cell/ml e fazer subcultura a 70-80% confluência (proporção de 1:3 a 1:10) em frascos de 75 cm².

Preparação do Meio de Cultura

1. Identificar os falcons de 50 mL (data e conteúdo);
 2. Colocar 5mL de FBS* previamente inativado (10%);
 3. Perfazer até aos 50 mL com meio RPMI 1640;
- Nota:** Verter no caso de todo o conteúdo do frasco for utilizado
4. Colocar 500 µL de antibiótico;
 5. Acondicionar o meio a 4°C.

*Se o FBS ainda não estiver inativado (frasco novo), proceder ao seguinte protocolo:



Inativação do FBS

1. Banho-maria a 56°C durante 30 min (frasco protegido num saco de plástico para evitar contaminações com a água).
2. Mexer o frasco a cada 10 min.
3. Fazer alíquotas em falcons de 50 mL e congelar a -20°C.

Validade do FBS:

- 2-4 semanas se tiver no frigorífico 2-8°C
- 5 anos se for congelado -20°C

Validade do meio de cultura:

- Após a preparação no falcon dura até 1 mês a 4°C (mas para ensaios usar meios recentemente preparados)

Contagem de células com azul de tripano

1. Colocar entre 10-200µL 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. Pipetar sobre a câmara de Newbauer na ponta da lamela, e com ligeira pressão com os dedos, para que ocorra adesão;
4. Pipetar a solução preparada entre a lamela e a câmara (cerca de 5 a 10µL), 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 as células. Conforme demonstrado na figura 1, a contagem deve ser realizada:

- Nos quadrantes numerados de 1 a 4;
- Contando as células que se encontrem sob os limites superiores e da extrema esquerda dos quadrados (linhas verdes), mas não nos limites inferiores e da extrema direita destes (linhas vermelhas).

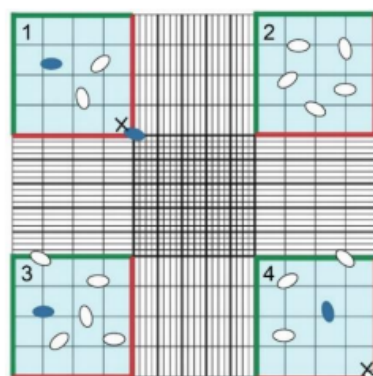


Figura 1 - Áreas numeradas de 1 a 4 para contagem de células e regra para a sua contagem.

6. Calcular a concentração e percentagem de células viáveis através das seguintes equações:

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

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

* Sabendo que a câmara de Newbauer está dividida em 9 quadrados principais, cada um com 0,1mm² de área e que a profundidade desta é de 0,1mm, cada um dos quadrados onde se contam as células terá 0,1mm³ pelo que o fator de conversão para mL é de 10000 (ou 10⁴).

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

Passagem de células aderentes

1. Observar no microscópio invertido a confluência das células;
2. Descartar o meio de cultura para um gobelé (através da inversão do frasco);
3. Pipetar 8mL de PBS com a pipeta de 10mL e lavar 2 vezes as células, agitando o frasco. Na 2ªlavagem, pipetar o restante com a pipeta automática para não sobrar nada;
4. Colocar 3-4mL de tripsina, agitar e retirar o excesso de forma a ficar só uma camada fina;
5. Incubar a 37°C durante 3-4 minutos;
6. Enquanto se aguarda, colocar 13mL de meio num novo frasco de 75cm² devidamente identificado (linha celular, data, nº de passagem, iniciais do investigador);
7. Retirar as células da incubadora, batendo no frasco para estas descolarem das paredes;
8. Colocar 4 a 5 mL de meio no frasco (o FBS presente no meio irá inativar a tripsina). Lavar bem o frasco, fazendo *up and down* com a pipeta;
9. No fim, colocar 1 a 2mL para o novo frasco previamente preparado, visualizar ao microscópio e depois colocar células na estufa;
10. Com o restante conteúdo do frasco inicial, proceder à contagem de células.



Passagem de células em suspensão

1. Observar no microscópio invertido a confluência das células;
2. Resuspender células no meio e transferir para um falcon de 15 mL;
3. Centrifugar o tubo a 1200 RPM durante 5 min.;
4. Descartar o sobrenadante e colocar cerca de 10 mL de PBS;
5. Centrifugar o tubo a 1200 RPM durante 5 min.;
6. Descartar PBS e colocar cerca de 2-3 mL de meio no falcon;
7. Retirar do falcon entre 10-200 µl de células resuspendidas para um eppendorf 1.5 ml, para depois proceder-se à contagem de células (verificar procedimento da pág.3);
8. Num frasco de 75 cm² colocar entre 10-15 mL de meio novo;
9. Colocar as células nesse frasco e agitar ligeiramente em movimentos circulares.
10. Visualizar no microscópio e por fim colocar na estufa a 37°C 5%CO₂.

Criopreservação Celular

1. Verificar as células no microscópio e lavar 1x com PBS.
2. Fazer a contagem de células viáveis e garantir que a viabilidade é de pelo menos de 80%.
3. Centrifugar as células (600-800 rpm) e remover o sobrenadante.
4. Resuspender com o meio criopreservante (CellVation solution 1x) a uma concentração de 1×10^6 - 1×10^7 cells/ml
5. Distribuir pelos criotubos, devidamente identificados, um volume entre 1 e 2 ml.
6. Manter as células durante 30 minutos no gelo, invertendo o tubo a cada 10min.
7. Passar para o congelador -20°C durante 1 hora e depois disso colocar o criotubo na arca a -80°C (mas se possível, criopreservar as células em azoto líquido).
8. Atualizar a folha excel do Inventário de Cultura de Células com a linha celular criopreservada, data, nº de passagem e localização na caixa.



Descongelação Celular

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 15mL com uma P1000;
4. Colocar lentamente (gota a gota) 10mL de meio no falcon;
5. Centrifugar o falcon durante 5 minutos a 1200 RPM;
6. Descartar o sobrenadante (manter o pellet celular) e colocar 5mL de meio no falcon de 15mL (ou 2ml para frascos de 25 cm²), fazendo *up and down* lentamente;
7. Colocar num frasco de 75cm², 10mL de meio (25cm²- 3mL) e 5mL (2ml) de células do falcon de 15mL previamente preparado;
8. Após homogeneização para distribuição uniforme das células, colocar o frasco na estufa a 37°C e com 5% de CO₂;
9. Após 24 a 48 horas, verificar a confluência celular e realizar a mudança do meio.

Procedimento adaptado de:

H&TRC e ESTeSL, “Standard Operational Procedure N°1: Cell Culture Protocols”, *Tech. Bull*, p. 1-5, 2022

Anexo II – Ensaio CellTiter-Blue® (Promega Cooperation)

Procedimento

1. Montar e identificar placas de ensaio de 96 poços (P96);
2. Adicionar 100 µL dos compostos de ensaio e controles, contendo células em meio de cultura, a cada um dos poços apropriados;
3. Incubar 24 horas a 37°C com 5% (v/v) de CO₂;
4. Descongelar o reagente CellTiter-Blue à temperatura ambiente. Pode ser utilizado um banho de água a 37°C para descongelar o reagente, protegendo o mesmo da luz direta;
5. Remover placas de ensaio da incubadora e adicionar 20 µL do reagente CellTiter-Blue em cada um dos poços em estudo;
6. Agitar durante 10 segundos;
7. Incubar durante 4 horas a 37°C com 5% (v/v) de CO₂;
8. Agitar a placa durante 10 segundos;
9. Proceder à leitura da fluorescência a 560/590 nm.

Procedimento adaptado de:

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

Anexo III – Ensaio CytoTox 96® (Promega Cooperation)

Procedimento

1. Montar e identificar placas de ensaio de 96 poços (P96);
2. Adicionar 100 µL dos compostos de ensaio e controlos, contendo células em meio de cultura, a cada um dos poços apropriados;
3. Incubar as células a 37°C durante 24 horas;
4. (Opcional) Se a Solução de Lise for utilizada para gerar um Controlo Positivo de Libertação de LDH máximo (ML), 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.
7. Cobrir a placa com folha ou uma caixa opaca para a proteger da luz e incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente;
8. Acrescentar 50µl de Solução Stop a cada poço em estudo;
9. Rebentar quaisquer bolhas grandes usando uma agulha de seringa;
10. Incubar durante 1 hora;
11. Proceder à leitura e registo da absorvância a 490 ou 492 nm.

Cálculo dos resultados

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

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

Procedimento adaptado de:

Promega Cooperation, “CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin, TB163”, *Tech. Bull.*, p. 1-11, 2010.

Anexo IV – Extração de RNA (Qiagen)

Procedimento

1. Obter o *pellet* seco das amostras celulares.
2. Adicionar 700 µL de *QIAzol Lysis Reagent* e vortexar durante 1 minuto para homogeneizar.
3. Incubar 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 durante 2 a 3 minutos.
6. Centrifugar a 12300 rpm a 4°C durante 15 minutos. O volume da fase aquosa será aproximadamente 400 µL.
7. Transferir a fase aquosa superior para um novo tubo coletor, evitando transferir parte da interfase. 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. Fechar bem a tampa e 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. Armazenar o RNA a -80°C , até à sua utilização.

Procedimento adaptado de:

Qiagen, “miRNeasy Mini Handbook”, *Tech. Bull.*, p. 23-28, 2020. Retrieved from <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=da6c8d17-58c4-411c-a334-bc1754876db3&lang=en>

Anexo V – Reação de síntese de cDNA (NZYtech)

Procedimento

1. Em gelo, preparar a mistura de reação num tubo de microcentrífuga estéril e livre de nucleases, combinando os reagentes descritos na **Tabela 8.1**.

Nota:

- Se for necessário preparar mais do que uma reação, recomenda-se preparar um volume adicional de 10% em relação ao total necessário, para compensar perdas por pipetagem.

Tabela 8.1 – Quantidade de reagentes a utilizar no passo 1. na reação de síntese de cDNA.

Reagente	Quantidade
RNA total	1,5 - 2 µg (14 µL)
<i>Random Hexamer Mix</i>	1 µL
<i>dNTP Mix</i>	1 µL
Volume Final	16 µL

2. Homogeneizar suavemente a mistura e centrifugar brevemente.
3. Incubar a 65 °C durante 5 minutos. De seguida, arrefecer a mistura em gelo durante pelo menos 1 minuto. Centrifugar brevemente e manter em gelo.
4. Ainda em gelo, adicionar os reagentes descritos na **Tabela 8.2** à mistura de reação anterior.

Tabela 8.2 – Quantidade de reagentes a utilizar no passo 4. na reação de síntese de cDNA.

Reagente	Quantidade
<i>RxnBuffer 10x for Supreme RTase</i>	2 µL
<i>NZY Ribonuclease Inhibitor</i>	1 µL
<i>Supreme RTase 1 kU/µL</i>	0,2 µL
Volume Final	20 µL

5. Misturar suavemente e centrifugar brevemente.
6. Incubar a 60 °C durante 1 minuto. (Este passo pode ser ajustado para temperaturas entre 42 °C e 70 °C durante 1 a 5 minutos, consoante as características do RNA total. Para fragmentos de maior dimensão (> 0,5 kb), recomenda-se uma incubação de 10 a 20 minutos a 50–55 °C.)

Notas:

- Se forem utilizados *primers random-hexamer*, deve-se realizar uma incubação inicial a 25 °C durante 10 minutos, antes de prosseguir com a incubação a 60 °C.
 - A enzima *Supreme NZY Reverse Transcriptase (1 kU/μL)* é suficientemente rápida para permitir a síntese de cDNA em apenas 1 minuto. No entanto, em casos específicos (como por exemplo, moldes longos ou com estrutura secundária complexa), uma incubação prolongada até 10 minutos pode aumentar o rendimento da reação.
7. Inativar a reação por aquecimento a 85 °C durante 5 minutos, seguido de arrefecimento imediato em gelo.
 8. Proceder de imediato a aplicações posteriores ou armazenar o cDNA entre -85 °C e -15 °C.

Notas:

- O cDNA pode ser armazenado temporariamente entre -30 °C e -15 °C, ou até uma semana entre 2 °C e 8 °C. Para armazenamento a longo prazo, recomenda-se conservar entre -85 °C e -65 °C. Evitar ciclos repetidos de congelação/descongelação.
- O cDNA obtido pode ser utilizado para clonagem ou como molde em reações de PCR ou qPCR. Tipicamente, 10% da reação de síntese (cerca de 2 μL) é suficiente para a maioria das aplicações em PCR. Opcionalmente, o cDNA pode ser diluído em tampão TE.
- Em reações de qPCR, deve assegurar-se que o volume de cDNA utilizado não ultrapassa 1/10 do volume total da reação. Por exemplo, numa reação de 50 μL, devem ser usados no máximo 5 μL do produto da síntese de cDNA.

Procedimento adaptado de:

NZYtech, “Supreme NZY Reverse Transcriptase 1 kU/μL”, *Tech. Bull*, p. 2-3, 2025.

Retrieved from

https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb494_ifu_en_v2402.pdf

9. Apêndices

Apêndice I – Quantificação de RNA e cDNA

Tabela 9.1 – Resultados da quantificação de RNA, extraído de amostras celulares.

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
C 1	589,883	2,090	2,255
C 2	529,993	2,072	1,343
C 3	536,212	2,085	2,285
HU 1	289,586	2,060	2,171
HU 2	357,281	2,073	2,161
HU 3	335,674	2,070	2,115
1:10 1	197,120	2,058	2,022
1:10 2	107,547	2,008	1,521
1:10 3	129,075	2,009	1,754
1:50 1	132,662	2,027	1,972
1:50 2	187,227	2,065	2,078
1:50 3	163,083	2,065	2,026
Pool	323,4	2,04	1,84

Tabela 9.2 – Resultado da quantificação de cDNA em amostra *pool*, gerado a partir de RNA.

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
Pool	2028,1 *	1,68	2,06

* Os valores apresentados demonstraram contaminação proteica, com uma leitura de 2,17 a absorvância de 260 nm, tendo sido corrigidos para uma quantificação de 1817,3 ng/ μ L.

Apêndice II – Fundamento teórico da técnica de PCR quantitativo em tempo real e procedimento aplicado

A reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis em 1983 e patenteada em 1985, constitui uma técnica fundamental na biologia molecular, amplamente utilizada para a amplificação de sequências específicas de DNA [213], [214]. Este método revolucionário baseia-se num processo cíclico de aquecimento e arrefecimento alternados, que permite sintetizar fragmentos de DNA com recurso à enzima DNA polimerase, em conjunto com outros componentes essenciais como desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), primers específicos (*forward* e *reverse*) e os próprios fragmentos de DNA ou cDNA que se pretendem amplificar [213], [214].

O processo de PCR é dividido em três etapas principais, cada uma ocorrendo a diferentes temperaturas: a fase de desnaturação, onde ocorre a separação das cadeias de DNA; a fase de *annealing*, que permite a ligação dos primers às sequências-alvo; e a fase de extensão, durante a qual se dá a síntese de novas cadeias de DNA [213]. As condições ótimas de temperatura e duração de cada ciclo variam em função de parâmetros como a enzima utilizada, as concentrações de iões bivalentes e dNTPs e a temperatura de *melting* (T_m) dos primers. A T_m , também conhecida por temperatura de fusão, refere-se à temperatura à qual metade das moléculas de DNA está desnaturada, apresentando cadeia simples em vez de dupla [213], [215].

A introdução do PCR quantitativo em tempo real (qPCR) representou um avanço significativo, permitindo não só a amplificação, mas também a monitorização e quantificação do DNA ou RNA alvo em tempo real, com maior precisão e rapidez comparativamente ao PCR convencional [216], [217]. Esta técnica baseia-se na deteção da fluorescência emitida durante a reação, a qual aumenta proporcionalmente à quantidade de produto amplificado [216], [217], [218]. Para tal, são utilizados marcadores fluorescentes, como o SYBR Green, ou sondas específicas, como as TaqMan, em conjunto com termocicladores equipados para detetar a emissão de fluorescência [217], [218], [219], [220].

O qPCR distingue-se ainda pela sua elevada sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detetar baixos níveis de ácidos nucleicos e de proporcionar quantificações rigorosas, tornando-se assim uma ferramenta indispensável na análise da expressão génica, diagnóstico molecular e investigação biomédica [220], [221]. O ponto de deteção da fluorescência, designado por ciclo de limiar (Ct ou Cq), é inversamente proporcional à quantidade inicial do ácido nucleico alvo: valores mais baixos de Ct indicam uma maior quantidade inicial do alvo [221].

Para assegurar a fiabilidade dos resultados obtidos por qPCR, é essencial a normalização dos dados, a qual pode ser realizada através da quantificação absoluta ou relativa. Enquanto a quantificação absoluta determina os níveis exatos de expressão em amostras desconhecidas, a quantificação relativa calcula as diferenças na expressão entre um gene de referência e o gene de interesse, utilizando frequentemente o método $\Delta\Delta Cq$ [131], [188], [219], [222]. Este último método é amplamente empregue, dada a sua eficácia na avaliação das variações relativas de expressão génica sob diferentes condições experimentais [219], [222].

Procedimento – Preparação da mistura de reação

1. Primeiramente procede-se à desinfeção e esterilização da câmara de fluxo laminar, com recurso a lixívia e *Nucleases & Nucleic Acid Cleaner*, da casa comercial *NZYtech*.
2. Preparou-se a mistura de reação, na câmara de fluxo laminar, respeitando as proporções descritas na **Tabela 9.3**, para cada conjunto de triplicados técnicos (3,25 vezes mais do que seria necessário para cada réplica biológica).

Nota:

- O reagente *NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x)* é um reagente comercial para ensaios de qPCR, contendo uma sondas verdes intercalantes, dNTPs, enzimas, estabilizadores e intensificadores da reação. Desta forma, este reagente está pronto a utilizar, sendo necessária somente a adição da cadeia molde de cDNA a amplificar e os primers (*forward* e *reverse*) específicos do gene de interesse.

Tabela 9.3 – Quantidade de reagentes a utilizar na reação RT-qPCR, para cada triplicado.

Reagente	Quantidade
<i>NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x)</i>	32,5 μ L
<i>Primer Forward (300 nM)</i>	1,95 μ L
<i>Primer Reverse (300 nM)</i>	1,95 μ L
H ₂ O	25,35 μ L
Volume Final	61,75 μL

3. Posteriormente, foram adicionados 3,25 μ L de cDNA a cada tubo contendo 61,75 μ L da mistura de reação, perfazendo assim um volume total de 65 μ L.
4. Como controlo negativo, denominado como NTC (*No template control*), utilizou-se água em substituição de cDNA total, de modo a validar os resultados.

5. Divide-se o volume de cada tubo PCR por 3 poços (triplicados técnicos) de uma placa de 96 poços.
6. Após o preenchimento da P96 de acordo com o esquema da experiência, procede-se à sua centrifugação.
7. Coloca-se a placa no equipamento *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* (da casa comercial *Bio-Rad*), programado com o esquema de preenchimento da placa e com as condições apresentadas na **Tabela 9.4**.

Nota:

- A temperatura da fase de *annealing* foi alterada de acordo com o gene em estudo, sendo: 58°C para os genes *GAPDH*, *ActinB*, *HBA*, *HBG1*, *HBG2*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*; e 57°C para os genes *HBB* e *BCL11A*.

Tabela 9.4 – Condições de amplificação da reação de RT-qPCR.

Ciclos	Fase	Temperaturas (°C)	Tempos
1	Desnaturação	95	5 minutos
40	Desnaturação	94	30 segundos
	<i>Annealing</i>	57 ou 58	30 segundos
	Alongamento	72	30 segundos

Procedimento adaptado de:

NZYtech, “NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x)”, *Tech. Bull*, p. 1-2, 2025.

Retrieved from

https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb419_ifu_en_v2401.pdf