

# Modulação da expressão de microRNAs em células humanas K562 induzida por extratos de *Carica papaya*

Edna Ribeiro<sup>1,2</sup>, Beatriz Canteiro<sup>2</sup>, Catarina Ginete<sup>2</sup>, Mário Gomes<sup>2,3</sup>, Miguel Brito<sup>2,3</sup>, Anita Q. Gomes<sup>2,3</sup>, Carina Silva<sup>2-4</sup>

1. Departamento das Ciências do Diagnóstico, Terapêutica e Saúde Pública, Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal. [edna.ribeiro@estesl.ipl.pt](mailto:edna.ribeiro@estesl.ipl.pt)

2. H&TRC – Health & Technology Research Center, ESTeSL – Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

3. Departamento das Ciências Exatas, da Vida, Sociais e Humanas, Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

4. Centro de Estatística e Aplicações, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal.

## RESUMO

**Introdução** – As hemoglobinopatias constituem um dos grupos de doenças monogénicas mais prevalentes a nível mundial. Atualmente, um dos tratamentos disponíveis consiste na indução farmacológica da hemoglobina fetal (HbF) através de vários compostos químicos, sendo o mais comum a hidroxiureia (HU). Contudo, o seu custo elevado em países subdesenvolvidos e o seu perfil de segurança limitam a utilização deste composto. Assim, é essencial a descoberta de novos compostos indutores de HbF com menos efeitos secundários e de fácil acesso, como é o caso dos compostos naturais (e.g., extrato de folha de *Carica papaya* L.). **Objetivo** – Avaliar o efeito da exposição de células K562 (linha celular humana imortalizada de leucemia mieloide) ao extrato metanólico das folhas de *Carica papaya* L. (EMFCP) ao nível da expressão dos miRNAs envolvidos na regulação da HbF. **Métodos** – As células K562 foram expostas durante 24 horas ao EMFCP (0,5; 50 e 100 µg/mL) e a HU (25 µg/mL). A análise da expressão dos miRNAs envolvidos na regulação da HbF (miR-486-3p, miR-34a-5p, miR-210-5p, miR-32-5p e miR-96-5p) foi feita por RT-qPCR, tendo como referência endógena o miR-426-3p. **Resultados** – A análise de dados demonstrou que o EMFCP possui a capacidade de modular a expressão de miRNAs, estando esta associada à diminuição da expressão do miR-486-3p, miR-34a-5p, miR-210-5p, miR-32-5p e miR-96-5p, reguladores da HbF. **Conclusão** – O presente estudo sugere que o EMFCP possui potencial indutor da HbF através da modulação de miRNAs reguladores, constituindo assim uma potencial abordagem eficaz na terapêutica das  $\beta$ -hemoglobinopatias.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -hemoglobinopatias; Hemoglobina fetal; *Carica papaya*; miRNAs.

# microRNAs modulation by *Carica papaya* extracts in the K562 human cell line

## ABSTRACT

**Introduction** – Hemoglobinopathies constitute one of the most prevalent groups of monogenic diseases worldwide. Currently, one of the available treatments consists of the pharmacological induction of fetal hemoglobin (HbF) using various chemical compounds, the most common one being hydroxyurea (HU). However, its high cost in developing countries and its poor safety profile limit its use. Therefore, it is essential to discover new HbF-inducing compounds with fewer side effects and that are easily accessible, such as natural compounds (e.g., *Carica papaya* L. leaf extract). **Objective** – To evaluate the effect of K562 cells' (an immortalized human myeloid leukemia cell line) exposure to methanolic extracts of *Carica papaya* L. leaves (EMFCP) on the expression of miRNAs involved in HbF regulation. **Methods** – K562 cells were exposed for 24 hours to EMFCP (0.5, 50, and 100 µg/mL) and HU (25 µg/mL). The expression of miRNAs involved in HbF regulation (miR-486-3p, miR-34a-5p, miR-210-5p, miR-32-5p, and miR-96-5p) was analyzed by RT-qPCR, using miR-426-3p as an endogenous reference. **Results** – Data analysis demonstrated that EMFCP modulates miRNA expression levels, as confirmed by the observation of decreased expression levels of miR-486-3p, miR-34a-5p, miR-210-5p, miR-32-5p, and miR-96-5p, which are HbF regulators. **Conclusion** – This study suggests that EMFCP has the potential to induce HbF expression through the modulation of regulatory miRNAs, thus constituting a potentially effective approach in the treatment of  $\beta$ -hemoglobinopathies.

*Keywords:  $\beta$ -hemoglobinopathies; Fetal hemoglobin; Carica papaya; miRNAs.*

## Introdução

As hemoglobinopatias são um conjunto de doenças hereditárias da hemoglobina resultantes da síntese estruturalmente anormal ou incompleta de subunidades de  $\beta$ -globina (HBB)<sup>1</sup>. As hemoglobinopatias mais relevantes do ponto de vista de morbidade e mortalidade incluem a doença falciforme e a  $\beta$ -talassemia, estas com maior incidência em África, na região mediterrânica, Sudeste Asiático, Médio Oriente e Extremo Oriente, havendo, no entanto, a nível mundial cerca de 7% de portadores de hemoglobinopatias<sup>2</sup>.

A doença das células falciformes engloba um grupo de patologias hematológicas hereditárias, caracterizadas por mutações no gene *HBB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da

hemoglobina humana, resultando numa variante estrutural da HbA normal, a hemoglobina S (HbS) ou falciforme<sup>3</sup>.

Atualmente, o tratamento mais eficaz baseia-se na transfusão de glóbulos vermelhos, com diminuição da percentagem de hemoglobina S (HbS) em circulação e supressão da hematopoiese<sup>4</sup>. Alguns estudos têm vindo a demonstrar que a presença de hemoglobina fetal (HbF) retarda a polimerização e aumenta a solubilidade da HbS em condições desoxigenadas<sup>5</sup>. Assim, terapias que aumentem a HbF são promissoras, como é o caso da hidroxiureia (HU), que tem demonstrado reduzir o número de crises vaso-oclusivas e hospitalizações<sup>4</sup>.

No entanto, os efeitos adversos associados a esta terapêutica e o seu custo elevado para países em desenvolvimento limitam a utilização deste composto<sup>6</sup>. Assim, é crucial a descoberta de novos compostos com potencial para induzir a expressão da HbF, que tenha poucos efeitos adversos e seja de fácil acesso, como é o caso dos compostos naturais<sup>7</sup>. A *Carica papaya L.*, pertencente à família *Caricaceae*, possui várias propriedades medicinais descritas incluindo anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antivirais, antifúngicas, antitumorais, antibacterianas, diuréticas e antifalciformação<sup>8-10</sup>.

Os potenciais alvos terapêuticos destas doenças incluem os genes da hemoglobina e reguladores da sua expressão. Esta regulação é feita, ao nível transcricional, através da expressão de fatores de transcrição, como o KLF1, B *Cell Lymphoma* 11A (BCL11A) e o fator regulador hematopoiético HBSL-1-MYB, entre outros, bem como ao nível pós-transcricional, através de microRNAs (miRNAs), reguladores negativos da expressão genética<sup>11</sup>.

Nos últimos anos, vários grupos de investigação evidenciaram a contribuição dos miRNAs na regulação da expressão do gene globina e de HbF em células eritropoiéticas<sup>12-14</sup>, pelo que têm vindo a ganhar destaque na área das doenças hematológicas, com vista ao desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico, e ainda de novas opções terapêuticas<sup>14</sup>.

Neste estudo pretendeu-se avaliar o efeito da exposição de extratos de folhas de *C. papaya L.*, nos padrões de expressão de miRNAs envolvidos na regulação da HbF, nomeadamente o miR-486-3p, o miR-34a-5p, o miR-210-5p, o miR-32-5p e o miR-96-5p em células k562.

## Métodos

### Preparação do extrato metanólico de *Carica papaya*

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

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

#### Linha celular K562

Neste estudo foi utilizada a linha celular K562, adquirida a partir da European Collection of Cell Cultures (ECACC, UK), derivada de leucemia mieloide crónica (LMC) humana em crise blástica. A linha celular foi escolhida por ter sido previamente utilizada em estudos de indução de hemoglobina fetal e avaliação de potencial terapêutico de compostos naturais<sup>15-16</sup>. As células K562 foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (catalog no. L0495-500, Biowest), contendo L-Glutamina e 25mM HEPES e suplementou-se o mesmo com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e com 500µL de antibiótico (200mM L-Glutamina, 10000 U penicilina e 10mg/mL de streptomicina) (product no. G6784, Sigma-Aldrich).

#### Exposição de células K562 a EMFCP

Foram preparadas quatro soluções com as concentrações de 0,5; 50; 100 e 500µg/mL de EMFCP para a exposição celular. As células K562 foram também expostas a 25µg/mL de hidroxiureia (HU) (HYDREA®, USP), usado como controlo positivo. A sua incubação foi feita num ambiente húmido a 37° C com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

#### Análise transcricional miRNA

O RNA foi extraído com o kit *miRNeasy Mini Kit* (Quiagen) e quantificado com recurso ao equipamento NanoDrop-ONE (Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA utilizou-se o miRCURY LNA RT Kit (catalog no. 339340, Qiagen). Foi utilizado o PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) CFX Connect™ (Bio-rad), com o kit iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) e *primers* específicos (cf. Tabela 1). O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência endógena.

Os níveis de transcrição foram analisados calculando  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tratamentos} - \Delta Ct \text{ controlo}$ ). As diferenças significativas entre os diferentes grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student (comparação entre dois grupos) e  $p < 0,01$  foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real

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

## Resultados e Discussão

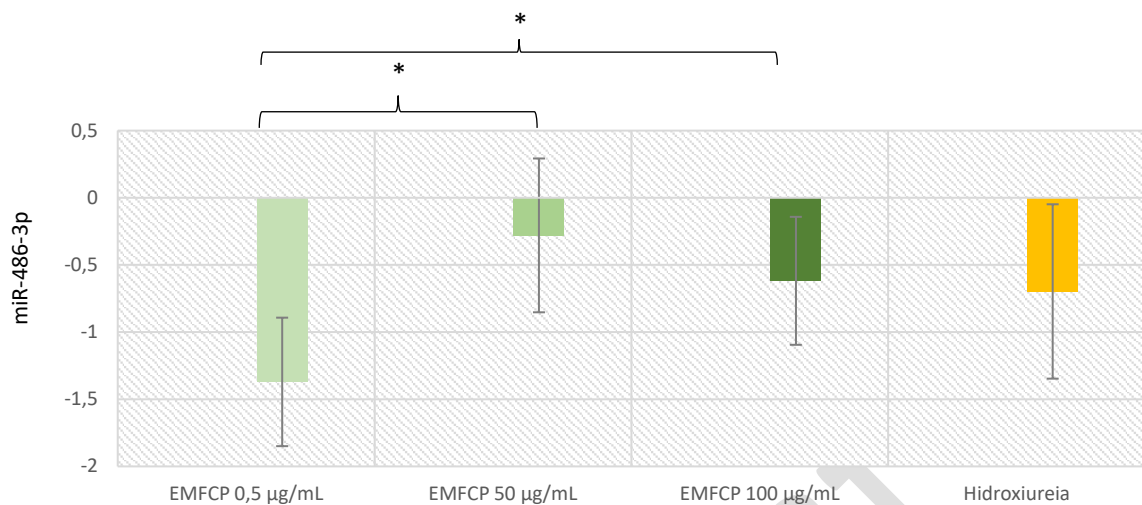
No presente estudo foi realizada a análise dos padrões de expressão de alguns miRNAs reguladores pós-transcricionais da HbF, nomeadamente o miR-486-3p, o miR-34a-5p, o miR-210-5p, o miR-32-5p e o miR-96-5p.

Estudos anteriores demonstraram que a desregulação destes miRNAs poderá estar associada ao aumento da gravidade clínica da doença das células falciformes, sendo que estes podem modular o aumento da expressão da HbF<sup>17</sup>.

### miR-486-3p

O miR-486-3p, situado no cromossoma 8, é um inibidor direto da expressão do gene BCL11A que, por sua vez, inibe a expressão do gene HBG<sup>18-19</sup>, desempenhando assim um papel essencial na regulação dos níveis de HbF na eritropoiese adulta.

A análise transcricional efetuada do miR-486-3p (*cf.* Figura 1) nos diferentes tratamentos revelou uma diminuição da expressão deste miRNA em todas as concentrações do EMFCP, como sucedeu com o controlo positivo HU.



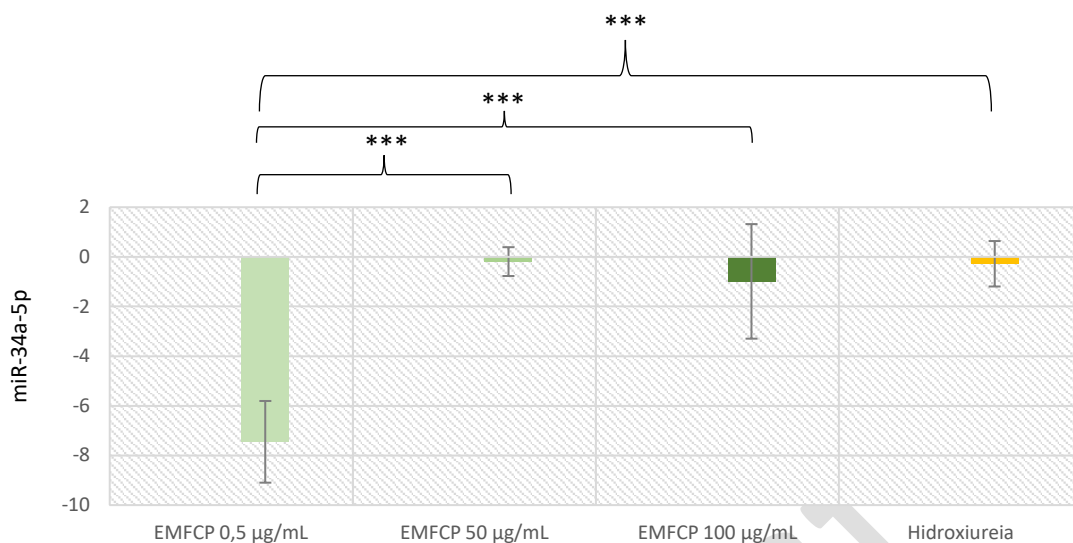
**Figura 1.** Representação gráfica da análise por RT-PCR quantitativo do miR-486-3p após exposição ao EMFCP e à hidroxiureia (HU). Log2 da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio-padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do *fold change* e do Log2 *fold change*, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste *t*.

#### miR-34a-5p

O miR-34a-5p, localizado no cromossoma 1, é um miRNA supressor de tumores regulado pelo p53, associado aos processos de apoptose, diferenciação e vias de transdução de sinal<sup>20</sup>.

Num estudo realizado em indivíduos com  $\beta$ -talassemia demonstrou-se a associação entre os níveis elevados do miR-34a-5p e os níveis elevados de HbF em células K562, resultantes da inibição do gene BCL11A. A sua sobre-expressão, por sua vez, inibe o gene STAT3, um silenciador da g-globina, sugerindo-se um mecanismo indireto da indução da expressão do HbF pelo miR-34a-5p<sup>21</sup>.

No presente estudo, a análise de dados demonstrou a diminuição da expressão do miR-34a-5p no EMFCP em todas as concentrações, com maior relevância na concentração de 0,5µg/mL do EMFCP ( $p < 0,0001$ ) (cf. Figura 2).



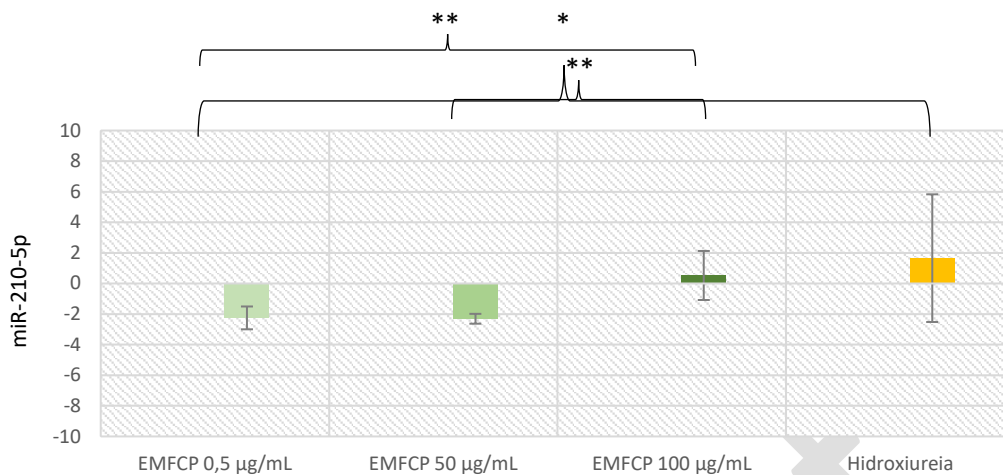
**Figura 2.** Representação gráfica da análise por RT-PCR quantitativo do miR-34a-5p após exposição ao EMFCP e à hidroxiureia (HU). Log2 da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio-padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do *fold change* e do Log2 *fold change*, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste *t*.

### miR-210-5p

O miR-210-5p, localizado no cromossoma 11, regula a expressão da HbF nos reticulócitos e nos eritrócitos através da inibição pós-transcricional da expressão do gene BCL11A, estando associado a níveis elevados de HbF na linha celular K562<sup>17</sup>.

Este miRNA está também relacionado com a hipoxia, podendo ser um alvo relevante para a síntese de HbF, tendo sido reportados níveis elevados associados à persistência hereditária de HbF<sup>13,22</sup>.

A análise da expressão relativa do miR-210-5p para os diversos tratamentos resultou na diminuição da expressão deste miRNA no EMFCP a 0,5 e 50µg/mL, enquanto nos restantes tratamentos (EMFCP a 100µg/mL e HU) se verifica o aumento da expressão do miR-210-5p. A HU aumentou a expressão de forma estatisticamente significativa ( $p = 0,010$ ), de acordo com o previamente demonstrado<sup>23</sup> (cf. Figura 3).



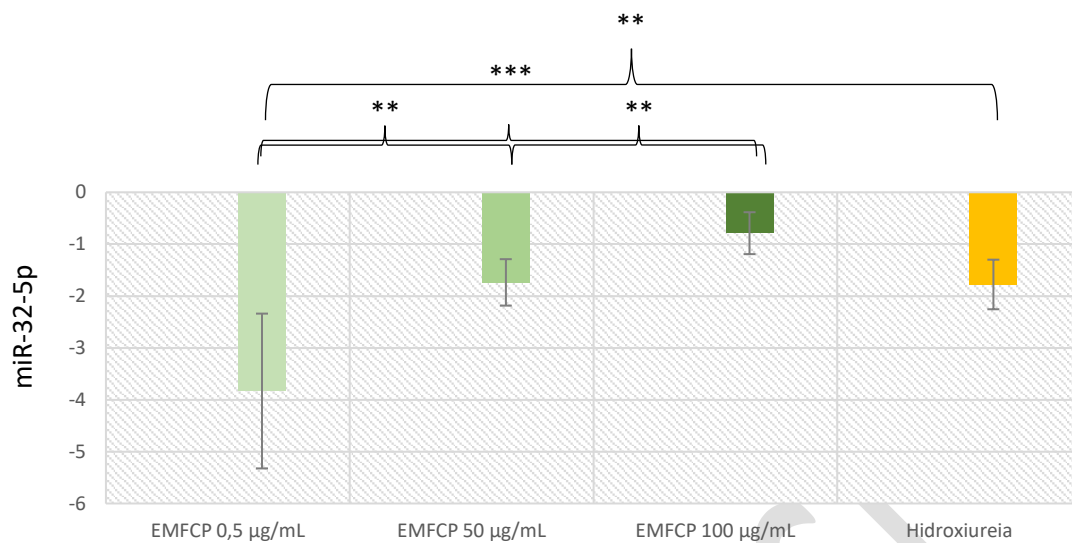
**Figura 3.** Representação gráfica da análise por RT-PCR quantitativo do miR-210-5p após exposição ao EMFCP e à hidroxiureia (HU). Log2 da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio-padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do *fold change* e do Log2 *fold change*, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste *t*.

#### miR-32-5p

O miR-32-5p, que se encontra no cromossoma 9, está associado à regulação e desenvolvimento de diversos tipos de carcinomas<sup>24</sup> e tem como alvo o BCL11A<sup>25</sup>.

Novamente, à semelhança da HU, observou-se a diminuição da expressão do miR-32-5p em todas as concentrações do EMFCP, com EMFCP a 0,5 a induzir a diminuição da expressão deste miRNA de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ), à semelhança da HU ( $p = 0,009$ ) (cf. Figura 4).





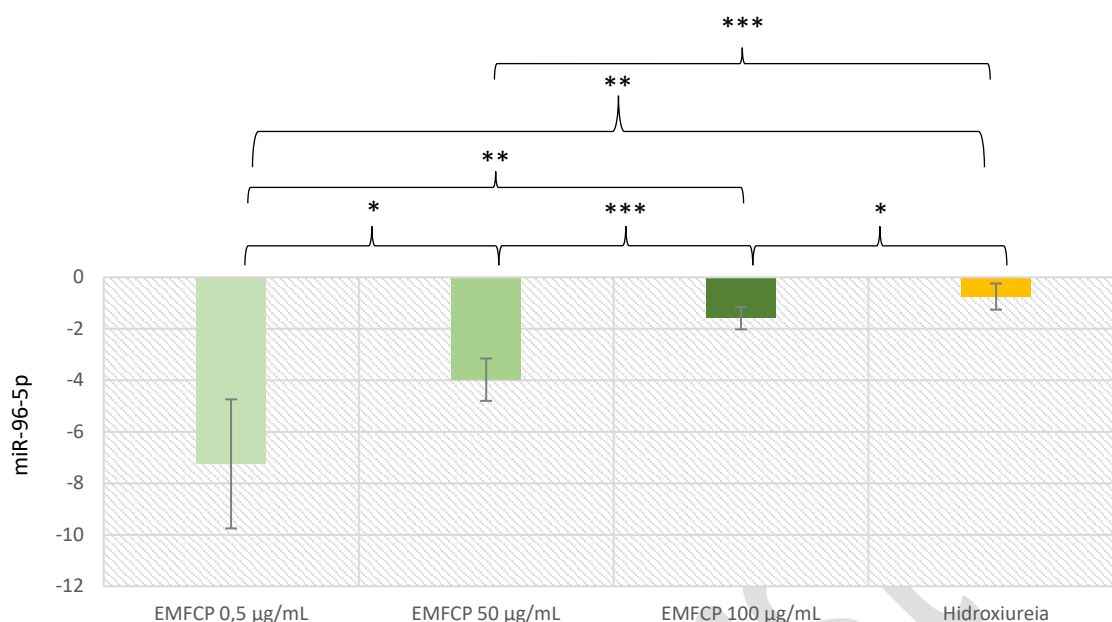
**Figura 4.** Representação gráfica da análise por RT-PCR quantitativo do miR-32-5p após exposição ao EMFCP e à hidroxiureia (HU). Log2 da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio-padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do *fold change* e do Log2 *fold change*, representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , foram calculadas através do teste *t*.

#### miR-96-5p

O miR-96-5p, localizado no cromossoma 7, inibe diretamente a expressão da HbF nos reticulócitos através da eritropoiese humana e tem como alvo o mRNA da gama globina<sup>17,26</sup>. Por outro lado, um estudo mostrou que o miR-96 tem uma correlação positiva com a idade, sendo expresso de forma constante na infância, seguido da sua degradação na idade adulta e da sua diminuição com o envelhecimento<sup>27</sup>.

A análise transcricional do miR-96-5p revelou a diminuição da expressão do miR-96-5p em todas as concentrações do EMFCP, assim como no tratamento com a HU.

O EMFCP a 0,5 e a 50µg/mL reduziu a expressão deste miRNA de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,001$ , respetivamente) (cf. Figura 5).



**Figura 5.** Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do miR-96-5p após exposição ao EMFCP e à hidroxiureia (HU). Log2 da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$  desvio-padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O miR-423-3p foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do *fold change* e do Log2 *fold change*, representadas como \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$ , foram calculadas através do teste *t*.

Os resultados obtidos na análise dos padrões de expressão de miRNAs envolvidos na regulação da HbF, nomeadamente o miR-486-3p, o miR-34a-5p, o miR-210-5p, o miR-32-5p e o miR-96-5p, após exposição aos extratos metanólicos de *C. papaya* L., demonstraram que, de um modo geral, possuem efeitos semelhantes quando comparados com os da HU, especialmente à concentração de 0,5µg/mL. A indução de expressão de HbF pela HU é mediada pela ativação da via de sinalização *p38 mitogen-activated protein kinases* (MAPK) e pela modulação dos níveis de expressão e/ou ligação cromossômica dos reguladores do gene da globina  $\gamma^{28}$ . Considerando que estudos anteriores demonstraram que miRNAs de *C. papaya* possuem a capacidade de regular genes envolvidos em vários processos e vias biológicas, como a via de sinalização MAPK, WNT e GPCR<sup>29</sup>, é possível colocar a hipótese de que estes extratos poderão ativar a mesma via de sinalização e/ou vias semelhantes que a HU<sup>30</sup>. A discrepância dos valores de expressão observados em algumas concentrações de extratos de *C. papaya*, quando comparados com a exposição a HU, pode dever-se ao facto dos fatores necessários para estimularem determinado miRNA serem limitantes nessas condições.

Estudos anteriores demonstraram ainda o potencial de extratos de folhas de *C. papaya*, incluindo extratos metanólicos, para tratamento de doenças epidémicas, destacando a composição fitoquímica e os constituintes farmacológicos do material vegetal, evidenciando,

através de estudos pré-clínicos e clínicos, a sua aplicabilidade como medicamento fitoterapêutico suplementar em contextos clínicos<sup>31</sup>.

Por outro lado, o tempo de exposição celular também poderá estar relacionado com os efeitos transcricionais, como descrito para o constituinte fitoquímico *Epigallocatechin-3-gallate*, na modulação da expressão de genes envolvidos no silenciamento da HbF e mecanismos epigenéticos associados, com variação dos padrões de expressão às 72h e 96h de exposição na linha celular K562<sup>15</sup>.

O presente estudo apresenta-se como uma avaliação preliminar do potencial dos extratos metanólicos de *C. papaya L.* para consideração em estudos futuros que analisem a translação para a aplicabilidade terapêutica, incluindo a variabilidade da composição dos extratos com base em variações sazonais e geográficas, ensaios funcionais que quantifiquem a expressão efetiva de HbF e validação em modelos *in vivo*.

## Conclusão

O presente estudo demonstrou o potencial de compostos naturais, nomeadamente de extratos metanólicos de *C. papaya L.*, como potenciais moduladores da expressão de HbF. A observação da diminuição da expressão de miRNAs, que têm como alvos genes silenciadores de HbF (BCL11A), abrem novas possibilidades para a terapêutica das hemoglobinopatias.

**Agradecimentos.** Os autores reconhecem o apoio do H&TRC – Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia, ESSL – Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa (apoio FCT/MCTES UIDB/05608/2020 e UIDP/05608/2020). Os autores agradecem a gentileza do Sr. Fernando Nunes por colher as folhas de *C. papaya L.* em Faro, Algarve, Portugal.

**Contributo dos autores.** Conceptualização, ER, MB, CS e AQG; metodologia, BC, CG e MG; software, BC, CG e MG; curadoria de dados, BC, CG e MG; validação, ER, MB, CS e AQG; redação do draft original, BC, CG e MG; revisão, validação e edição do texto final, ER, MB, CS e AQG; supervisão, ER, MB, CS e AQG.

## Referências bibliográficas

1. Verma HK, Lakkakula S, Lakkakula BV. Retrospection of the effect of hydroxyurea treatment in patients with sickle cell disease. *Acta Haematol Pol.* 2018;49(1):1-8.
2. Gameiro MS. Caracterização molecular e funcional de variantes alfa de hemoglobina identificadas no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra [dissertation]. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2012. Available from:

<https://hdl.handle.net/10316/25415>

3. Starlard-Davenport A, Fitzgerald A, Pace BS. Exploring epigenetic and microRNA approaches for  $\gamma$ -globin gene regulation. *Exp Biol Med*. 2021;246(22):2347-57.
4. Tanhehco YC. Gene therapy for hemoglobinopathies. *Transfus Apher Sci*. 2021;60(1):103061.
5. Paikari A, Sheehan VA. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2018;180(2):189-200.
6. Elendu C, Amaechi DC, Alakwe-Ojimba CE, Elendu TC, Elendu RC, Ayabazu CP, et al. Understanding sickle cell disease: causes, symptoms, and treatment options. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(38):e35237.
7. Kukreja A, Wadhwa N, Tiwari A. Therapeutic role of natural agents in beta-thalassemia: a review. *J Pharm Res*. 2013;6(9):954-9.
8. Vuong QV, Hirun S, Roach PD, Bowyer MC, Phillips PA, Scarlett CJ. Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *J Herb Med*. 2013;3(3):104-11.
9. Nugroho A, Heryani H, Choi JS, Park HJ. Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2017;7(3):208-13.
10. Vij T, Prashar Y. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. *Asian Pac J Trop Dis*. 2015;5(1):1-6.
11. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(15):3945-53.
12. Tayebi B, Abrishami F, Alizadeh S, Minayi N, Mohammadian M, Soleimani M, et al. Modulation of microRNAs expression in hematopoietic stem cells treated with sodium butyrate in inducing fetal hemoglobin expression. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(1):146-56.
13. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M, Mohammadi-Asl J, et al. MicroRNA expression in  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease: a role in the induction of fetal hemoglobin. *Cell J*. 2016;17(4):583-92.
14. Bianchi N, Zuccato C, Finotti A, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Involvement of miRNA in erythroid differentiation. *Epigenomics*. 2012;4(1):51-65.
15. Ribeiro E, Delgadinho M, Matos E, Santos R, Sousa D, Galante H, et al. Epigenetic and transcriptional modulator potential of epigallocatechin-3-gallate and genistein on fetal hemoglobin reactivators genes. *Clin Complement Med Pharmacol*. 2022;2(2):100034.
16. Li J, Lai Y, Shi L. BCL11A down-regulation induces  $\gamma$ -globin in human  $\beta$ -thalassemia

- major erythroid cells. Hemoglobin. 2018;42(4):225-30.
17. Cyrus C. The role of miRNAs as therapeutic tools in sickle cell disease. Medicina (Kaunas). 2021;57(10):1106.
  18. Lulli V, Romania P, Morsilli O, Cianciulli P, Gabbianelli M, Testa U, et al. MicroRNA-486-3p regulates  $\gamma$ -globin expression in human erythroid cells by directly modulating BCL11A. PLoS One. 2013;8(4):e60436.
  19. Penglong T, Saensuwanna A, Kocharoenwat J, Boorintaragot W, Fupongsiriphan S, Srinoun K. MiR-144 regulates hemoglobin expression in human erythroid cell line. Walailak J Sci Technol. 2020;17(11):1221-9.
  20. Zhang L, Liao Y, Tang L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):53.
  21. Ward CM, Li B, Pace BS. Original research: stable expression of miR-34a mediates fetal hemoglobin induction in K562 cells. Exp Biol Med. 2016;241(7):719-29.
  22. Sun KT, Huang YN, Palanisamy K, Chang SS, Wang IK, Wu KH, et al. Reciprocal regulation of  $\gamma$ -globin expression by exo-miRNAs: relevance to  $\gamma$ -globin silencing in  $\beta$ -thalassemia major. Sci Rep. 2017;7(1):202.
  23. Kargutkar N, Sawant-Mulay M, Hariharan P, Chandrakala S, Nadkarni A. Role of microRNA in hydroxyurea mediated HbF induction in sickle cell anaemia patients. Sci Rep. 2023;13(1):369.
  24. Yuan P, Tang C, Chen B, Lei P, Song J, Xin G, et al. miR-32-5p suppresses the proliferation and migration of pancreatic adenocarcinoma cells by targeting TLDC1. Mol Med Rep. 2021;24(5):752.
  25. MicroRNA-Target Interactions. miRTarBase [Internet]. Available from: <https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database/id/167>
  26. TargetScanHuman. Human | miR-96-5p/1271-5p [homepage]. Whitehead Institute for Biomedical Research; 2021 Sep. Available from: [https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_80/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir\\_sc=&mir\\_c=&mir\\_nc=&mir\\_vnc=&mirg=miR-96-5p](https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_80/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-96-5p)
  27. Eltaweel NH, ElKamah GY, Khairat R, Atia HA, Amr KS. Epigenetic effects toward new insights as potential therapeutic target in  $\beta$ -thalassemia. J Genet Eng Biotechnol. 2021;19(1):51.
  28. Chou YC, Chen RL, Lai ZS, Song JS, Chao YS, Shen CK. Pharmacological induction of human fetal globin gene in hydroxyurea-resistant primary adult erythroid cells. Mol Cell Biol. 2015;35(14):2541-53.
  29. Jha N, Mangukia N, Gadhavi H, Patel M, Bhavsar M, Rawal R, et al. Small RNA

- sequencing and identification of papaya (*Carica papaya* L.) miRNAs with potential cross-kingdom human gene targets. *Mol Genet Genomics*. 2022;297(4):981-97.
30. De Montalembert M, Voskaridou E, Oevermann L, Cannas G, Habibi A, Loko G, et al. Real-life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: results from the prospective ESCORT-HU cohort study. *Am J Hematol*. 2021;96(10):1223-31.
31. Sharma A, Sharma R, Sharma M, Kumar M, Barbhai MD, Lorenzo JM, et al. *Carica papaya* L. leaves: deciphering its antioxidant bioactives, biological activities, innovative products, and safety aspects. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:2451733.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não possuir quaisquer conflitos de interesse.

### **Financiamento**

Este estudo foi financiado pelo projeto IDI&CA-IPL/2024/DifCaya/ESTeSL.

Artigo recebido em 25.09.2025 e aprovado em 02.12.2025