



**Avaliação do impacto dos níveis de expressão de
RalGPS2 em cancro do pulmão e da próstata**
Versão final após defesa

Catarina Isabel da Poça Diniz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Adriana Oliveira Santos

dezembro de 2022



Declaração de Integridade

Eu, Catarina Isabel da Poça Diniz, que abaixo assino, estudante com número de inscrição M10753 de Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridade da Universidade da Beira interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, e que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assim assumo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 5/12/2022

Catarina Isabel da Poça Diniz

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha família todo o apoio que me deu para conseguir alcançar os meus objetivos. Aos meus pais, por todo o suporte que me deram, por cada ensinamento, por cada palavra de força e de motivação, por estarem presentes em todos os momentos. À minha irmã por ter a capacidade de descomplicar até as situações que parecem mais impossíveis, por me fazer ver as situações de uma perspetiva descontraída e descomplicada que me ajudou em tantos momentos difíceis.

Quero agradecer à professora Adriana todo o trabalho que fez comigo, todos os ensinamentos que me deu, todo o auxílio que me prestou ao longo deste último ano, toda a disponibilidade que teve e todo tempo que dispensou para que este trabalho fosse possível.

Agradecer também aos meus colegas de laboratório que me ajudaram em muitos momentos e que me acompanharam ao longo da execução deste trabalho.

Agradeço o financiamento das verbas do financiamento base (UIDB/00709/2020) e do financiamento programático (UIDP/00709/2020) do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), com fundos nacionais inscritos no orçamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Quero agradecer a todos os meus amigos por toda a ajuda e por todo o apoio que me deram.

Por último agradecer à pessoa que estive ao meu lado em cada momento para festejar comigo cada pequena vitória e para me dar força sempre que precisei. Obrigada a ti Luís por isto e por tudo o resto que tu sabes.

Resumo

O cancro da próstata é o que mais afeta homens, sendo de todos os tipos de cancro o segundo mais frequente a nível mundial. Por outro lado, o cancro do pulmão é o mais letal. O forte impacto destas doenças a nível mundial continua a impulsionar a investigação científica sobre o seu desenvolvimento e progressão, bem como sobre o seu tratamento.

A sobreativação dos cofatores transcricionais YAP/TAZ, regulados negativamente pela via supressora tumoral *Hippo*, tem sido associada a diversos tipos de cancro, incluindo cancro da próstata, promovendo a proliferação celular. Além disso, RalGPS2 é um fator de troca de nucleotídeos de guanina e o seu silenciamento tem demonstrado ter a capacidade de diminuir a proliferação de células tumorais, mas o mecanismo não foi totalmente esclarecido. Recentemente, foi demonstrado que o aumento da sua expressão está associado a mau prognóstico dos doentes com adenocarcinoma do pulmão, o que reforça o interesse de prosseguir com a investigação do seu papel em células tumorais.

Assim, este estudo teve como objetivos principais procurar evidências de uma possível interação entre RalGPS2 e os cofatores de transcrição YAP/TAZ no cancro da próstata. Este objectivo foi atingido quer por uma abordagem experimental, avaliando o silenciamento de RalGPS2 em combinação com tratamentos que levam à inativação de YAP/TAZ, quer através de uma abordagem bioinformática, explorando dados de transcriptómica de tumores de acesso livre.

Na primeira abordagem, efetuou-se o silenciamento de RalGPS2 em linha celulares de cancro da próstata (DU145 e PC3) e de cancro do pulmão (A549) em combinação com ausência de soro fetal bovino (FBS) do meio de cultura e tratamentos com sinvastatina. Na 2ª abordagem, realizou-se uma análise de dados de transcriptómica por forma a perceber qual a expressão de RALGPS2 e o seu valor prognóstico em cancro da próstata. Para além disso, avaliou-se o nível de correlação existente entre os níveis de expressão dos genes RalGPS2, YAP1 e WWTR1 em adenocarcinoma da próstata e em tumores neuroendócrinos da próstata.

Tanto a ausência de FBS como a adição de sinvastatina a 10 ou 30 μ M tiveram efeito na distribuição do ciclo celular na linha DU145, induzindo o aumento do número de células em fase G1 e sua diminuição na fase S. No que respeita à indução de apoptose,

apenas a concentração mais elevada a induziu nesta linha, mas a sua combinação com ausência de soro teve um efeito sinérgico.

Nas condições de transfeção usadas, o silenciamento de RalGPS2 não teve um efeito claro no crescimento celular das células estudadas, apesar de se poder ter devido parcialmente a ter sido usado um controlo de transfeção com elevada toxicidade inespecífica, e parte devido ao silenciamento incompleto do gene alvo. Quanto à sua combinação com a remoção de soro ou sinvastatina, o efeito foi maioritariamente aditivo. Contudo, este efeito não foi específico se comparado com o siRNA usado como controlo, ficando a dúvida se por não se ter usado o controlo correto. Na linha A549 verificou-se que a combinação do silenciamento com a uma baixa concentração de sinvastatina, sem efeito por si só, teve um ligeiro efeito sinérgico de inibição do crescimento celular, apesar de não se terem detetado efeitos sinérgicos na indução e apoptose ou na distribuição do ciclo celular.

No que respeita à análise de transcriptómica realizada, não se detetou valor prognóstico significativo na expressão de RalGPS2 em cancro da próstata, mas verificou-se existirem evidências de uma correlação muito forte entre a expressão de YAP1 e RalGPS2 específica quer de tecido saudável, adenocarcinomas e tumores neuroendócrinos da próstata.

Palavras-chave

A549; Apoptose; Cancro da próstata; Cancro do pulmão; Ciclo celular; DU145; PC3; RalGPS2; Transcriptómica; Tumores neuroendócrinos; YAP1; YAP/TAZ

Abstract

Prostate cancer is the one that most affects men, being the second most common of all types of cancer worldwide. On the other hand, lung cancer is the most lethal. The strong impact of these diseases worldwide continues to drive scientific research into their development and progression as well as their treatment.

Overactivation of transcriptional cofactors YAP/TAZ, downregulated by the *Hippo* tumor suppressor pathway has been associated with several types of cancer, including prostate cancer, promoting cell proliferation. Furthermore, RalGPS2 is a guanine nucleotide exchange factor and its silencing has been shown to have the ability to decrease tumor cell proliferation, but the mechanism has not been fully clarified. It has recently been shown that the increase in its expression is associated with a worse prognosis in patients with lung adenocarcinoma which reinforces the interest in continuing with the investigation of its role in tumor cells.

The main objectives of this study were to look for evidence of a possible interaction between RalGPS2 and YAP/TAZ transcriptional cofactors in prostate cancer. This was achieved both by an experimental approach, evaluating RalGPS2 silencing in combination with treatments that lead to YAP1/TAZ inactivation, and through a bioinformatics approach exploring open access tumor transcriptomics data.

In the first approach RalGPS2 was silenced in prostate cancer (DU145 and PC3) and lung cancer (A549) cell lines in combination with privation of fetal bovine serum (FBS) from the culture medium and treatments with simvastatin. In the second approach, an analysis of transcriptomics data was performed to understand the expression of RALGPS2 and its prognostic value in prostate cancer. Furthermore, the level of correlation between the expression levels of RalGPS2, YAP1 and WWTR1 genes in prostate adenocarcinoma and in prostate neuroendocrine tumors was evaluated.

Both the privation of FBS and the addition of 10 or 30 μ M simvastatin had an effect on the cell cycle distribution in the DU145 line, inducing an increase in the number of cells in G1 phase and their decrease in S phase. Only the highest concentration induced apoptosis in this cell line but its combination with privation of serum had a synergistic effect.

Under the transfection conditions used, RalGPS2 silencing did not have a clear effect on cell growth in the cells studied, although this may have been partly due to the use of a transfection control with high nonspecific toxicity and partly due to incomplete silencing of the target gene. As for its combination with serum removal or simvastatin, the effect was mostly additive but not specific compared to the siRNA used as a control, but it remains to be seen whether the correct control was used. In line A549 it was found that the combination of silencing with a low concentration of simvastatin without effect by itself had a slight synergistic effect of inhibiting cell growth although no synergistic effects were detected in induction and apoptosis or in the cell cycle distribution.

Regarding the transcriptomic analysis performed no significant prognostic value was detected in the expression of RalGPS2 in prostate cancer but there was evidence of a very strong correlation between the expression of YAP1 and RalGPS2 specific to healthy tissue, adenocarcinomas and neuroendocrine tumors of the prostate.

Keywords

A549; Apoptosis; Cell cycle; DU145; Lung cancer; Neuroendocrine tumors; PC3; Prostate cancer; RalGPS2; Transcriptomics; YAP1; YAP/TAZ

Índice

Resumo.....	7
Abstract.....	9
Índice.....	11
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	17
Lista de Acrónimos	19
Introdução	21
1.1. Cancro do pulmão e da próstata - contextualização.....	22
1.2. Via <i>Hippo</i> e os cofatores transcricionais YAP1 e WWTR1.....	24
1.2.1. Soro e estatinas na regulação da ativação de YAP/TAZ.....	25
1.3. RalGPS2	26
Objetivos.....	29
Materiais e métodos	31
3.1. Materiais:.....	31
3.2. Cultura celular em adesão	32
3.3. Ensaio de resazurina para avaliar o crescimento celular	32
3.4. Distribuição do ciclo celular e apoptose (Sub-G ₁).....	33
3.5. Tratamentos.....	34
3.5.1. Transfeção	34
3.5.2. Tratamento com sinvastatina.....	35
3.5.3. Transfeção em combinação com tratamentos de sinvastatina.....	36
3.5.4. Tratamento sem soro.....	36
3.5.5. Transfeção em combinação com ausência de soro.....	37
3.6. Análise bioinformática de dados de acesso livre	37
3.7. Análise estatística	37
Resultados	39
4.1. Avaliação do efeito da ausência de soro e de adição de sinvastatina na proliferação e sobrevivência celulares <i>in vitro</i>	39
4.2. Ensaio com sinvastatina.....	40
4.3. Transfeção.....	47
4.4. Combinação da transfeção com a remoção do soro do meio de cultura	50
4.5. Combinação da transfeção com a adição de sinvastatina ao meio de cultura. ..	52

4.6. Avaliação morfológica, distribuição do ciclo celular e apoptose (fração Sub-G1) com recurso à combinação de sinvastatina, ausência de soro e silenciamento com siRNA nas linhas PC3 e A549	54
4.7. Expressão, e correlação da expressão, dos genes YAP1, RalGPS2 e WWTR1 em adenocarcinoma da próstata e do pulmão e em tumores neuroendócrinos da próstata	62
4.8. Análise de sobrevivência para adenocarcinoma da próstata e do pulmão com dados do <i>OncoDB</i>	69
4.9. Análise de um <i>heatmap</i> com valores de expressão génica	71
Conclusão	75
Bibliografia	77
Apêndice	83
A. Ciclo celular	83
A.1. Distribuição do ciclo celular da linha A549 para a condição ausência de soro	83
A.2. Efeito da remoção de soro durante 24h e 72h e do tratamento com sinvastatina na linha de cancro da próstata DU145	83
B. Bioinformática	85
B.1. Gráficos de correlação de diferentes tipos de cancro retirados do <i>OncoDB</i>	85
B.2. Bancos de dados utilizados para fazer o <i>heatmap</i> com valores de expressão génica	87
B.3. Identificação dos 12 genes assinatura de tumores da próstata neuroendócrinos para formar o banco de dados	89
B.4. Métodos utilizados para elaborar os gráficos de correlação e os <i>boxplots</i>	90
B.5. Dados estatísticos obtidos para os <i>boxplots</i> de adenocarcinomas da próstata e tumores neuroendócrinos	91
B.6. Avaliação da normalidade da distribuição dos dados para tumores neuroendócrinos da próstata	94
B.7. Ampliação das zonas assinaladas no <i>heatmap</i>	96

Lista de Figuras

Figura 1 - Avaliação do impacto da ausência de soro fetal bovino, e de fazer lavagem com PBS aquando da troca de meio, no crescimento celular.....	39
Figura 2 - Avaliação do crescimento celular após tratar as células com sinvastatina....	42
Figura 3 - Fenótipo da linha celular DU145 após ser tratada com ausência de soro durante 24 h, 48 h e 72 h em combinação com sinvastatina 10 μ M e 30 μ M.	45
Figura 4 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha DU145 após tratar com sinvastatina 10 e 30 μ M e manter em ausência de soro durante 48 h.	46
Figura 5 - Análise de Sub-G1 na linha DU145 com sinvastatina 10 e 30 μ M em combinação com ausência de soro 48 h.	47
Figura 6-Transfecção das linhas DU145 e PC3 para otimização das condições.	48
Figura 7 - Transfecção da linha A549 para otimizar as condições de transfecção.	49
Figura 8-Avaliação do crescimento celular quando as células foram tratadas com ausência de soro durante 48 h em combinação com o silenciamento com siRNA.	51
Figura 9 - Avaliação do crescimento celular quando as células foram silenciadas em combinação com tratamento com sinvastatina.....	53
Figura 10 - Fenótipo da linha celular PC3 após ser transfetada com lipofectamina:siRNA na razão 1,5:15 e tratada com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos.	55
Figura 11 - Fenótipo da linha celular A549 após ser transfetada com a razão lipofectamina:siRNA 1:12 na ausência de soro durante 48 h e com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos.....	56
Figura 12 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha PC3 após tratar com sinvastatina 1 μ M, e silenciar com siRNA na razão 1,5:15.....	57
Figura 13 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha A549 após tratar com sinvastatina 1 μ M, manter na ausência de soro durante 48 h e silenciar com siRNA na razão 1:12.	60
Figura 14 - Análise de Sub-G1 na linha PC3 com silenciamento na razão 1,5:15 em combinação com sinvastatina 1 μ M. A linha foi tratada com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos.	61
Figura 15 - Análise de Sub-G1 na linha A549 com silenciamento na razão 1:12 em combinação com sinvastatina 1 μ M e ausência de soro.	62
Figura 16 - <i>Boxplot</i> dos níveis de expressão para os genes RalGPS2 (A), YAP1 (B) e WWTR1 (C) em adenocarcinoma da próstata (PRAD).	63

Figura 17 - <i>Boxplot</i> dos níveis de expressão para os genes RalGPS2, YAP1 e WWTR1 em adenocarcinoma do pulmão (LUAD).	64
Figura 18 - Correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinomas da próstata (A) e do pulmão (B) com dados da base <i>OncoDB</i> [53]. ..	64
Figura 19 - Correlação de expressão dos genes WWTR1 e RALGPS2 em adenocarcinoma da próstata (A) e em adenocarcinoma do pulmão (B).	65
Figura 20 - <i>Boxplot</i> dos níveis de expressão de YAP1 (A) e RALGPS2 (B) em adenocarcinomas da próstata.	66
Figura 21 - Correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinoma da próstata.	67
Figura 22 – <i>Boxplot</i> dos níveis de expressão de YAP1 (A) e RALGPS2 (B) em tumores da próstata neuroendócrinos.	68
Figura 23 -Correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em tumores da próstata neuroendócrinos.	69
Figura 24 - Análise de sobrevivência tendo em conta a expressão do gene RalGPS2 em adenocarcinomas da próstata (A) e do pulmão (B) com os dados da base de dados <i>OncoDB</i> [53].	70
Figura 25 - Análise de sobrevivência tendo em conta a expressão do gene YAP1 em adenocarcinoma da próstata (A) e do pulmão (B) com os dados da base de dados <i>OncoDB</i> [53].	70
Figura 26 - Análise de sobrevivência tendo em conta a expressão do gene WWTR1 em adenocarcinoma da próstata (A) e do pulmão (B) com os dados da base de dados <i>OncoDB</i> [53].	71
Figura 27 - <i>Heatmap</i> com valores de expressão génica.	72
Figura 28 - Ciclo celular da linha A549 com ausência de soro durante 48 h.	83
Figura 29 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha DU145 após tratar com sinvastatina 10 e 30 μ M e manter em ausência de soro durante 24 e 72 h.	84
Figura 30 - Análise de Sub-G1 na linha DU145 com sinvastatina 10 e 30 μ M em combinação com ausência de soro 24 e 78 h.	85
Figura 31 - Gráficos de correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em diferentes tipos de cancro retirados da base de dados aberta <i>OncoDB</i> [53].	86
Figura 32 - Exemplo de <i>heatmap</i> para seleção das amostras neuroendócrinas.	90
Figura 33 - Representação gráfica do resultado de <i>Shapiro-Wilk normality test</i> para os dados dos genes YAP1 e RalGPS2.	95
Figura 34 - Ampliação da zona A.	96
Figura 35 - Ampliação da zona B.	96
Figura 36 - Ampliação da zona C.	96

Figura 37 - Ampliação da zona D	97
Figura 38 - Ampliação da zona E.	97

Lista de Tabelas

Tabela 1-Sequências de siRNA utilizados no silenciamento, adquiridos na forma hibridada e modificados por precipitação de etanol.	31
Tabela 2 - Sequências de siRNA utilizados no silenciamento de RalGPS2, adquiridos na forma de pool.....	31
Tabela 3 - Resultados da análise estatística <i>Two-way ANOVA</i> com os dados estatísticos da experiência de avaliação do crescimento celular com e sem FBS.	40
Tabela 4 - Resultados estatística para a linha DU145 tratada com sinvastatina. A análise feita foi <i>Two-way ANOVA</i> seguida de um teste de comparações múltiplas de <i>Sidak</i> ...	43
Tabela 5 - Resultados estatísticos para a linha PC3 tratada com sinvastatina. A análise feita foi <i>Two-way ANOVA</i> seguida de um teste de comparações múltiplas de <i>Sidak</i> ...	43
Tabela 6 - Resultados estatísticos para a linha A549 tratada com sinvastatina. A análise feita foi <i>Two-way ANOVA</i> seguida de um teste de comparações múltiplas de <i>Sidak</i> ...	44
Tabela 7 - Lista de genes que se relacionam com YAP1.	87
Tabela 8 - Identificação dos bancos de dados que formam o <i>heatmap</i> com os valores de expressão génica.	88
Tabela 9 - Identificação dos 12 genes assinatura de tumores da próstata neuroendócrinos.....	89
Tabela 10 - Dados estatísticos obtidos para os <i>boxplots</i> de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinoma da próstata.	91
Tabela 11 - Dados estatísticos obtidos para os <i>boxplots</i> de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 em tumores neuroendócrinos da próstata.	92
Tabela 12 - Amostras de tecidos ou células de próstata selecionadas para formar o banco de dados neuroendócrino após a verificação do perfil de expressão dos 12 genes assinatura através de realização de um <i>heatmap</i> para cada banco de dados.	93
Tabela 13 - Resultados do <i>Shapiro-Wilk Test</i> para os dados de expressão de adenocarcinoma e tumores neuroendócrinos de próstata.....	94

Lista de Acrónimos

A549	Linha celular de carcinoma do pulmão
AJUBA	Do inglês, <i>Ajuba LIM Protein</i>
AR	Do inglês, <i>androgen receptor</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIRC5	Do inglês, <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i>
CCN2	Do inglês, <i>Cellular Communication Network Factor 2</i>
CCND1	Ciclina D1
DLG3	Do inglês, <i>Discs Large MAGUK Scaffold Protein 3</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DU145	Linha celular de carcinoma da próstata
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
FBS	Soro Fetal Bovino
FRMD6	Do inglês, <i>FERM Domain Containing 6</i>
FSC	Dispersão lateral, do inglês <i>forward scatter</i>
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
Hpo	Quinase Ste20 <i>Hippo</i>
ID1	Do inglês, <i>Inhibitor Of DNA Binding 1, HLH Protein</i>
KRB	Do inglês, <i>Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer</i>
LEF1	Do inglês, <i>Lymphoid Enhancer Binding Factor 1</i>
LGL2	Do inglês, <i>LLGL Scribble Cell Polarity Complex Component 2</i>
LUAD	Adenocarcinoma do pulmão
MYC	Do inglês, <i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>
NF2 ou MER	Do inglês, <i>NF2, Moesin-Ezrin-Radixin Like (MERLIN) Tumor Suppressor</i>
NKD1	Do inglês, <i>NKD Inhibitor of WNT Signaling Pathway 1</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PC3	Linha celular de adenocarcinoma da próstata
PH	Domínio <i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PRAD	Adenocarcinoma da próstata
Ral A	Do inglês, <i>RAS Like Proto-Oncogene A</i>
Ral B	Do inglês, <i>RAS Like Proto-Oncogene B</i>

RalGPS2	Do inglês, <i>Ral GEF With PH Domain And SH3 Binding Motif 2</i>
RB1	Do inglês, <i>RB Transcriptional Corepressor 1</i>
RNAseq	Sequenciação de RNA
Say	Proteína facilitadora Salvador
SH3	Domínio SH3
siLUC	Do inglês, <i>anti-luciferase-targeting siRNA</i>
siPLK1	Do inglês, <i>siRNA targeting polo-like kinase 1</i>
siRNA	Do inglês, <i>Small interfering RNA</i>
SMAD3	Do inglês, <i>SMAD Family Member 3</i>
SNAI2 ou SLUG	Do inglês, <i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>
SOX1	Do inglês, <i>SRY-Box Transcription Factor 1</i>
TCF	Do inglês, <i>transcription factor</i>
TCF7L1	Do inglês, <i>Transcription Factor 7 Like 1</i>
TEAD	Do inglês, <i>TEA Domain Transcription Factor</i>
TP53	Proteína de tumor p53
TP73	Proteína de tumor p73
WNT	Via de sinalização WNT
WTS	NDR Warts quinase
WWC1 ou KIBRA	Do inglês, <i>WW And C2 Domain Containing 1</i>
WWTR1	Do inglês, <i>WW Domain Containing Transcription Regulator 1</i>
YAP1	Do inglês, <i>Yes1 Associated Transcriptional Regulator</i>
YKI	Coativador transcricional Yorkie
YWHAZ	Do inglês, <i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta</i>

Capítulo 1

Introdução

Uma das maiores questões da sociedade é saber como se desenvolvem os tumores e, acima de tudo, como os tratar. Porém, e apesar de todos os estudos e avanços feitos até aos dias de hoje, não foi ainda possível encontrar uma resposta definitiva, permanecendo esta como uma área muito ativa de investigação científica.

O cancro continua a ser uma das patologias que mais impacto tem na vida das pessoas e na saúde pública, com uma elevada taxa de mortalidade associada. O cancro do pulmão foi o que teve maior taxa de mortalidade em Portugal à data de 2020 e o cancro da próstata era o oitavo com maior taxa de mortalidade de acordo com os dados fornecidos pelo GLOBOCAN2020 num total de 9416 provocadas pelo cancro no referido ano [1].

Trabalho anterior da equipa de investigação demonstrou que RalGPS2, uma proteína pouco conhecida que participa na regulação das GTPases RalA e RalB, é necessária para a proliferação e sobrevivência de células de adenocarcinoma do pulmão de forma pelo menos independente destas proteínas, regulando a expressão de SKP2 e os inibidores da proliferação p21 e p27 [2]. Adicionalmente, estudos de dados de transcriptómica vieram demonstrar que uma elevada expressão diferencial de RalGPS2 estava associada a um pior prognóstico em doentes de adenocarcinoma do pulmão [3], o que confirma o interesse em perceber melhor o papel de RalGPS2 em células tumorais. Por outro lado, houve um primeiro trabalho de uma colega de mestrado em Bioquímica que explorou o silenciamento de RalGPS2 no crescimento de células PC3 de cancro da próstata, tendo demonstrado um efeito inibidor no seu crescimento, bem como uma aparente indução de apoptose espontânea das células com uma das sequências usadas [4]. Neste trabalho também foi testado se havia inativação dos cofatores de transcrição “*yes-associated protein 1*” (YAP1 também conhecida como YAP1) e o “*WW-domain-containing transcription regulator 1*” (WWTR1 comumente referido como TAZ), codificados por genes parálogos [5], YAP1/WWTR1, aquando do silenciamento de RalGPS2, não se tendo encontrado evidência que suportasse essa hipótese.

O presente trabalho de investigação foi desenhado no sentido de alargar o estudo de uma possível interação entre silenciamento de RalGPS2 e a inativação de YAP/TAZ a outras linhas de cancro da próstata e de cancro do pulmão.

Nas seguintes subsecções introdutórias é feita uma revisão da literatura sobre cancro do pulmão e da próstata, da via *Hippo* e da sua regulação e, finalmente, do pouco que se conhece sobre a proteína RalGPS2.

1.1. Cancro do pulmão e da próstata - contextualização

O aparecimento e a progressão tumoral estão muitas vezes associados a fatores ambientais tais como a exposição a radiação ultravioleta, a ondas eletromagnéticas e a radiação ionizante, ao consumo de tabaco e álcool, bem como à exposição a químicos presentes no quotidiano, à dieta e à ausência da prática de atividade física, nomeadamente à presença de compostos mutagénicos e carcinogénicos, tais como as nitrosaminas, nos alimentos que consumimos, e às infeções frequentes que provocam uma acumulação no genoma de várias células no nosso organismo [6]. Por outro lado, há fatores biológicos e eventual predisposição genética que influenciam a progressão tumoral, como por exemplo facilitando a propagação de erros que ocorrem durante a replicação do DNA no genoma das células filhas [7].

O cancro do pulmão é o mais diagnosticado e a principal causa de morte em todo o mundo [1]. O desenvolvimento deste tipo de cancro está muitas vezes associado ao histórico de tabagismo, à idade, a fatores genéticos, à dieta, ao consumo de álcool e a existência de doenças crónicas prévias [8], [9]. Um diagnóstico precoce desta doença é essencial para melhorar o prognóstico de cada paciente. Para tal, os métodos de deteção da doença têm sido amplamente melhorados e otimizados ao longo dos anos. Assim, uma avaliação de amostras citológicas e de tecido é adequada para efetuar o diagnóstico tendo em conta que o fator de transcrição 1 e a napsina A são marcadores moleculares específicos para adenocarcinoma de pulmão [10].

O cancro da próstata é o mais diagnosticado nos homens sendo o segundo mais frequente a nível mundial, a seguir ao cancro do pulmão, e foi o mais frequentemente detetado em 105 países segundo dados da GLOBOCAN em 2018. Apesar de ainda haver poucos dados relativamente às causas que lhe dão origem, existem dados que o associam a uma predisposição genética e étnica [1]. Assim, para o cancro da próstata os fatores de risco englobam a idade, a existência de histórico da doença na família, a predisposição genética e a origem étnica, sendo destes a idade o fator com maior impacto [11]. A deteção precoce deste, como de qualquer tipo de tumor, é essencial para garantir o melhor prognóstico e, portanto, há algumas décadas que se utiliza o teste para o antigénio prostático específico em rastreio. Este teste consiste na deteção de uma serina protéase que é produzida em secreções normais do tecido prostático e que

apenas é libertada no sangue quando há uma alteração na estrutura da próstata, nomeadamente uma rutura do tecido. Os resultados deste teste podem indicar a necessidade de efetuar uma biópsia por forma a detetar um possível tumor prostático [12], [13].

A próstata é formada por células neuroendócrinas, basais e luminais, que se encontram inseridas no estroma fibromuscular [14]. Possui uma arquitetura específica com zonas bem delineadas das quais a central, a periuretral e a periférica, juntamente com o estroma fibromuscular. Dentro dos diferentes tipos de células que formam a camada fibromuscular é importante referir que as epiteliais luminais são responsáveis pela produção de secreções proteicas e apresentam elevados níveis de recetor de androgénios (AR, do inglês, *Androgen Receptor*). As células basais expressam p63 e as citoqueratinas 5 e 14, com pouca ou nenhuma expressão de AR. Por último, é importante referir que as células neuroendócrinas são raras e não se conhece ainda uma função específica para as mesmas, apesar de estar comprovado que são AR-negativas [15].

Os tratamentos para cancro da próstata direcionam-se maioritariamente para o AR, porém, a resistência a este tipo de estratégias torna-se cada vez maior, ou seja, a maioria dos cancros da próstata torna-se resistente à castração, sendo independente da sinalização do AR. Adicionalmente, em alguns casos, ocorre uma alteração no fenótipo das células que formam o tecido tumoral para células pequenas e pouco diferenciadas negativas ao AR. Este tipo de fenótipo é conhecido como cancro da próstata neuroendócrino. Este tipo de cancro é maioritariamente associado a estádios posteriores da doença e desenvolve-se maioritariamente como um mecanismo de resistência ao tratamento. Ao nível genómico verifica-se que alterações como a perda de TP53 (p53) e RB1 são mais fortes e significativas em tumores de próstata neuroendócrinos, porém estas alterações não se revelam suficientes para provocar por si só a transformação de adenocarcinomas em tumores neuroendócrinos [16]. A grande maioria dos tumores prostáticos são adenocarcinomas (cerca de 95%) e os tumores neuroendócrinos representam menos de 2% dos casos de tumor diagnosticados, porém, evidências demonstram que estes se observam maioritariamente em tumores recorrentes ou resistentes a androgénios [12], [17].

A linha celular PC3, comumente utilizada para estudar cancro da próstata *in vitro*, provém originalmente de uma metástase óssea de um paciente com cancro da próstata [18]. Contudo, esta linha, apesar de derivar de um adenocarcinoma, caracteriza-se por ter um crescimento e uma proliferação celular independente de androgénios e,

portanto, uma vez que não possui expressão do AR tem sido muitas vezes utilizada para avaliar o fenótipo de tumores neuroendócrinos quando comparada com linhas celulares de cancro da próstata sensíveis a androgénios [19].

1.2. Via *Hippo* e os cofatores transcricionais YAP1 e WWTR1

Cada vez mais é importante conseguir vias de tratamento alternativas aos tratamentos mais utilizados, quer no cancro do pulmão, quer no cancro da próstata, nomeadamente os direcionados ao AR. Assim, uma das vias de sinalização que tem captado interesse tem sido a via *Hippo*. A via *Hippo* foi descoberta pela primeira vez na espécie *Drosophila melanogaster*, conhecida como mosca da fruta, e é formada por uma cascata de quinases, na qual a quinase Ste20 *Hippo* (Hpo) fosforila e ativa a família NDR Warts quinase (Wts) através da proteína facilitadora Salvador (Sav) que contém um domínio WW. A Wts posteriormente fosforila e ativa o coativador transcricional Yorkie (Yki). Quando ocorre inativação dos supressores de tumor Hpo, Sav e Wts, ou sobreexpressão da oncoproteína Yki ocorre proliferação celular excessiva e apoptose diminuída [20].

Esta via está presente em mamíferos e tem associadas proteínas homólogas, ou seja, Mst1/2 corresponde a Hpo, WW45 a Sav, Lats1/2 a Wts, e o YAP/TAZ correspondem à oncoproteína Yki. Quando a via *Hippo* está ativa, os cofatores de transcrição YAP/TAZ encontram-se fosforilados e ligados a proteínas do tipo 14-3-3 no citoplasma, o que resulta na sua inibição e, portanto, ocorre diminuição da proliferação celular [21].

A via *Hippo* tem demonstrado ser um fator preponderante na supressão tumoral, uma vez que atua na limitação do crescimento de órgãos, na manutenção da homeostase celular, na regeneração de tecidos e principalmente na regulação da proliferação celular, influenciando desta forma o crescimento das células. Além disso, os cofatores de transcrição YAP/TAZ têm revelado estar altamente presentes e ativos em cancro da próstata [22]. Estes reguladores transcricionais alternam a sua presença entre o citoplasma e o núcleo no qual interagem com os fatores de ligação ao DNA, TEAD, entre outros, participando, portanto na via *Hippo* como transdutores [23].

Vários estudos comprovaram que a presença de YAP/TAZ ativos em células aderentes é essencial para que ocorra proliferação celular e, portanto, uma sobreexpressão de YAP1 ou WWTR1 em células ou tecidos pode levar ao desenvolvimento de cancro ou ao crescimento exagerado dos tecidos [5]. Além disso, YAP/TAZ apresentam ainda a capacidade de promover a autorenovação de células estaminais, que é de extrema

importância na regeneração de tecidos, na proliferação dos tecidos embrionários e quando as células sofrem transformações neoplásicas [23].

Para além das funções anteriormente referidas, YAP/TAZ têm ainda um papel preponderante no desempenho de funções como a regulação da diferenciação do pâncreas, a regulação da angiogénese e o desenvolvimento cardíaco, a indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a promoção da mielinização dos axónios periféricos [5].

Todas estas evidências remetem para que os coativadores YAP/TAZ sejam potenciais alvos de tratamentos direcionados em tumores, permitindo estabelecer novas abordagens para diminuir, e até eliminar, o crescimento de células tumorais [23].

O cofator de transcrição YAP1 encontra-se muitas vezes sobre expresso e hiperativado em cancro da próstata, porém os mecanismos que levam a estes acontecimentos ainda não são completamente compreendidos o que abre portas a novas linhas de investigação.

Além disso, estudos demonstraram que YAP1 apresenta um comportamento diferente de acordo com o tipo de tumor em que é detetado, existindo alterações muito evidentes quando comparados tumores neuroendócrinos com adenocarcinomas nomeadamente da próstata [24]. Relativamente ao coativador WWTR1, apesar de ser homólogo de YAP1 as funções desempenhadas por um não são reprodutíveis na totalidade pelo outro. Assim, evidências demonstram que WWTR1 consegue aumentar a síntese de DNA e tem implicações na regulação do ciclo celular que são independentes de YAP1 [25].

1.2.1. Soro e estatinas na regulação da ativação de YAP/TAZ

Existem inúmeros fatores que têm a capacidade de regular a via *Hippo*, nomeadamente componentes presentes no soro fetal bovino (FBS) e que estão presentes na cultura de células *in vitro*.

As proteínas Rho e Ras, responsáveis pela transdução de sinal de vários recetores membranares com atividade tirosina quinase, encontram-se localizadas na face interna da membrana celular [26]. Estudos colocam em evidência o papel das estatinas na inibição da atividade das proteínas Ras e RhoA. [27] Hoque *et al.* demonstraram que a inativação de RhoA pode ser o mecanismo molecular pelo qual as estatinas estão ligadas à supressão tumoral [11]. As estatinas pertencem a uma família de medicamentos com baixo peso molecular que inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril-

coenzima A (HMG-CoA) redutase e que são comumente utilizados para tratar patologias associadas a distúrbios lipídicos tais como o colesterol alto (também conhecido como hipercolesterolemia) [28]. Contudo, o papel das estatinas no tratamento de vários tipos de cancro tem sido amplamente estudado e já surgiram evidências de que as mesmas podem induzir a apoptose e inibir a proliferação celular através do impedimento da passagem da fase G1 à fase S do ciclo celular bem como da regulação negativa das quinases dependentes de ciclina que facilitam a progressão do ciclo celular [29].

No que respeita à indução de apoptose, estudos demonstram que ocorre a concentrações mais altas de estatinas, contrariamente ao que acontece para a inibição da proliferação celular que exige concentrações mais baixas para ocorrer [29]. Neste campo, a sinvastatina tem demonstrado eficácia na inibição da proliferação celular através da indução da paragem do ciclo celular na fase G1 para linhas celulares de cancro da próstata, nomeadamente a linha PC3 [30].

Murtola *et al* demonstraram que a utilização de sinvastatina em concentrações significativas tem a capacidade de interromper a progressão do ciclo celular e provocar a apoptose de células, nomeadamente células tumorais da próstata [31]. Ainda na mesma linha de investigação Sivaprasad *et al* reforçaram a influência que a sinvastatina tem no ciclo celular em linhas de cancro da próstata, nomeadamente a linha PC3 e a linha DU145 [30]. A sinvastatina demonstrou ainda ter a capacidade de promover a degradação do oncogene p53, envolvido na supressão tumoral, senescência e apoptose [32], e reduzir a proliferação celular e a metástase óssea de células de cancro de pulmão através da inibição da fosforilação da quinase na via de sinalização MAPK/ERK [33].

1.3. RalGPS2

RalGPS2 é um fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF, do Inglês *Guanine nucleotide exchange factor*) independente de Ras, que é uma das GEFs responsável pela ativação das GTPases RalA e RalB, comumente mutadas em cancro [2, 34]. As proteínas Ral, localizadas na membrana plasmática, estão envolvidas em vários processos celulares que incluem a proliferação e diferenciação celular [35, 36], o transporte vesicular [37], a neurosecreção [38] e a organização do citoesqueleto [39]. Estas podem ser ativadas pelas proteínas Ras, através da presença de cálcio e plaquetas em fibroblastos e pelo PI3K e Src no caso dos neutrófilos [40].

Na região N-terminal RalGPS2 possui o domínio GEF e na região C-terminal um motivo PxxP e um domínio Pleckstrin Homology (PH) de ligação ao domínio SH3 [40].

O domínio PH-PxxP consegue ligar-se a produtos de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Ceriani *et al.* demonstraram inclusivamente que nas células PC12 uma sequência dominante negativa de RalGPS2 inibe a ativação da proteína RalA, resultando na promoção da diferenciação neuronal em resposta ao NGF (do inglês, *Nerve Growth Factor*) [34].

Esta GEF tem expressão constitutiva, mas especificidade tecidual (expressão mais forte) para o tecido linfoide (Linfócitos B e plasmócitos), testículos (aumentando com a diferenciação de espermatogónias em espermatozóides, e neuronais, em particular as células fotorreceptoras da retina (bastonetes e cones) [41, 42]. Habitualmente encontra-se localizada no citosol, ou seja, intracelularmente, e foi associada à doença de Alzheimer [41, 42]. Há evidências de que RalGPS2 possa estar envolvida na organização do citoesqueleto através da ligação aos filamentos de actina e na polimerização da mesma [40].

É importante referir que foi demonstrado que o silenciamento de RalGPS2 tem a capacidade de diminuir a proliferação de células tumorais, entre as quais várias linhas de cancro do pulmão, e de induzir a apoptose das mesmas [2]. Para além disso, D'Aloia *et al.* demonstraram a importância que a presença de RalGPS2 tem no crescimento celular de células tumorais de cancro da bexiga [43].

O papel da RalGPS2, apesar de ainda ser pouco claro e evidente em cancro da próstata, foi anteriormente avaliado na progressão do ciclo celular de células de cancro do pulmão. Verificou-se através do silenciamento do gene que ocorreu uma diminuição na taxa de sobrevivência das células e que o mesmo estava associado a uma paragem do ciclo celular na fase G1 nas linhas celulares A549 e H1299, de adenocarcinoma do pulmão [2].

Assim, neste estudo proponho-me a avaliar o impacto dos níveis de expressão de RalGPS2 em cancro de pulmão e da próstata através de análise de transcriptómica a par do desenvolvimento de estratégias *in vitro* que demonstrem ter a capacidade de reduzir a proliferação das células tumorais tais como a utilização de sinvastatina, o silenciamento do gene RalGPS2 e a ausência de fatores de crescimento.

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi explorar uma possível interação entre RalGPS2 e os cofatores de transcrição YAP/TAZ no cancro da próstata e do pulmão.

Mais concretamente, o primeiro objetivo específico foi avaliar a combinação do silenciamento de RalGPS2 com tratamentos que, entre outros efeitos, levam à inativação dos cofatores de transcrição YAP/TAZ, na proliferação e na sobrevivência de células tumorais. Foram selecionados como tratamentos a combinar com o silenciamento de RalGPS2 a adição de sinvastatina e ausência de soro. A hipótese foi que a combinação resultaria num efeito aditivo ou sinérgico na inibição do crescimento das células tumorais. Para poder dar resposta a este objetivo estabeleceu-se como tarefas:

- Avaliar o crescimento de linhas celulares tumorais de cancro da próstata e de pulmão na ausência e presença de FBS e sinvastatina;
- Validar o grau de silenciamento de RalGPS2 nas diferentes linhas celulares;
- Avaliar a combinação de tratamentos com sinvastatina/remoção do FBS e silenciamento de RalGPS2.

Por outro lado, numa perspetiva bioinformática definiu-se como segundo objetivo específico perceber qual o valor prognóstico da expressão de RalGPS2 em cancro da próstata e qual a correlação que existe com a expressão e/ou ativação de YAP1 e o WWTR1. Para atingir este objetivo, foram efetuadas várias análises de dados de transcriptómica com acesso livre, nomeadamente:

- Avaliação da relação entre o nível de expressão de RalGPS2 e o prognóstico de doentes com cancro da próstata e os níveis de expressão de YAP1 e WWTR1.
- Procura de evidências da correlação da expressão de RalGPS2 com a ativação dos cofatores YAP/TAZ.
- Avaliação da expressão de RalGPS2 e YAP1 em cancro da próstata neuroendócrino.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1. Materiais:

O dimetil sulfóxido (DMSO) utilizado para criopreservar as linhas celulares e para preparar a solução de sinvastatina com a qual se efetuaram os tratamentos foi comprado à *PanReac AppliChem* (Darmstadt, Alemanha). A água usada na preparação de meio de cultura e soluções foi água ultra-pura (*Mili-Q*, obtida no sistema de purificação da *Millipore*, Massachusetts, Estados Unidos da América). O tampão fosfato salino (PBS) foi preparado por diluição de uma solução concentrada 10× (composição final de 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄ e 20 mM KH₂PO₄).

Foram adquiridos à Eurogentec (Seraing, Bélgica) os siLUC, siPLK1 e siRalGPS2_#231 (Tabela 1) sem modificações químicas na forma de híbridos modificados por precipitação de etanol. O siLUC foi utilizado contra o gene da luciferase como controlo negativo da transfeção, o siPLK1 foi usado contra o gene da PLK1, que é um regulador da mitose, e é utilizado como controlo positivo da transfeção e o siRalGPS2_#231 foi utilizado tendo como gene alvo de silenciamento o gene RalGPS2. No que respeita ao pool siRalGPS2 foi adquirido à Dharmacon (Lafayette, Colorado, Estados Unidos da América) na forma de *ON-TARGETplus Human RalGPS2 siRNA-SMARTpool* com modificações químicas (Tabela 2).

Tabela 1-Seqüências de siRNA utilizados no silenciamento, adquiridos na forma hibridada e modificados por precipitação de etanol.

Marca	siRNA	Gene alvo	Seqüências alvo
Eurogentec	siLUC_s	Luciferase	CGU-ACG-CGG-AAU-ACU-UCG-A
	siPLK1_s	PLK1	CGG-GCA-AGA-UUG-UGC-CUA-A
	siRalGPS2_#231-s	RalGPS2	GAU-UCA-GCA-UAC-CCA-UCA-A

S- sense

Tabela 2 - Seqüências de siRNA utilizados no silenciamento de RalGPS2, adquiridos na forma de pool.

Marca	siRNA	Gene alvo	Código	Seqüências alvo
Dharmacon	Pool siRalGPS2	RalGPS2	J-009877-05	CUCAGAGACUAUUAAGUA
			J-009877-06	AGAAUAUGCGGGUCAGUA
			J-009877-07	UAGCAGCUCUGAAUCCUUA
			J-009877-08	UCUCAACUCUGUUCAGUAU

3.2. Cultura celular em adesão

As linhas celulares de carcinoma da próstata DU145, de adenocarcinoma da próstata PC3 e de carcinoma de pulmão A549 tiveram origem na *American Type Culture Collection* (ATCC: HTB-81, CRL-1435 e CRM-CCL-185, respetivamente). Estas linhas celulares foram cultivadas em adesão com meio RPMI-1640 (*Biowest*, Nuaille, França) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS, *PAN BIOTECH*, Aidenbach, Alemanha) inativado pelo calor e 1% de penicilina-estreptomicina (Merck, Alemanha). As células foram incubadas em condições padrão de cultura celular (5% CO₂, 95% humidade relativa [HR]) a 37 °C, e sub-cultivadas por ação de uma solução de tripsina (Tripsina 125 mg/L, EDTA 1 mM, Glucose 0,1%, em PBS, pH 7,4) de forma a nunca exceder 70-80% de confluência, com renovação do meio a cada 2-3 dias.

3.3. Ensaio de resazurina para avaliar o crescimento celular

Foi preparada uma solução *stock* de resazurina (*Alfa Aesar*, Haverhill, Massachusetts, Estados Unidos da América) dissolvendo aproximadamente 60 mg em 100 mL de PBS com agitação durante 30 minutos protegida da luz, sendo posteriormente filtrada e aliquotada. Seguidamente mediu-se a absorvência de uma amostra diluída 100× em PBS aos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm numa célula de 1 cm, calculando-se de seguida a concentração de resazurina na solução *stock*, armazenando as mesmas posteriormente a -20 °C.

A concentração de resazurina oxidada (C_{ox} , Eq. 1) e reduzida (C_{red} , Eq. 2), bem como a percentagem de resazurina reduzida (%_{red}, Eq. 3) foram calculadas através dos coeficientes de extinção molar de cada uma das formas de resazurina nos dois comprimentos de onda. Ao comprimento de onda de 570 nm a resazurina reduzida tem um ϵ de 155677 e a resazurina na forma oxidada tem de 80586. Ao comprimento de onda de 600 nm a resazurina reduzida tem um ϵ de 14652 e a resazurina na forma oxidada de 117216.

$$C_{ox} (\mu M) = \frac{155677 \times A_{600} - 14652 \times A_{570}}{117216 \times 155677 - 80586 \times 14652} \times 100 \times 10^6 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$C_{red} (\mu M) = \frac{(117216 \times A_{570} - 80586 \times A_{600})}{117216 \times 155677 - 80586 \times 14652} \times 100 \times 10^6 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\%_{red} = \frac{C_{red}}{C_{red}+C_{ox}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Para efetuar o ensaio de redução da resazurina as células foram semeadas e incubadas nas respetivas densidades e tempos correspondentes a cada tratamento (especificadas na secção de tratamentos). No último dia de incubação foi preparada uma solução de resazurina diluída em KRB (NaH₂PO₄.H₂O 0,238 g/L, Na₂HPO₄ 0,1178 g/L, KCl 0,34 g/L, NaCl 7 g/L, MgCl₂.6H₂O 0,725 g/L, NaHCO₃ 1,2602 g/L, D-glucose 1,8016 g/L e CaCl₂.2H₂O 0,176 g/L) tendo em conta o volume final pretendido de acordo com a placa, à concentração final de 30 µM. O meio em cada poço foi substituído por 200 µL da solução de resazurina e a placa incubada à temperatura de 37 °C, com 5% CO₂ e 95% HR, isolada da luz, por um período de tempo entre 1 e 4 horas até se verificar uma mudança de cor dos poços de controlo (fluorescência alvo de aproximadamente 10000). Por último era medido o valor de fluorescência de cada poço com recurso ao aparelho espectrofluorímetro *SpectraMax Gemini EM* no comprimento de onda de excitação de 544 nm e no comprimento de onda de emissão de 549 nm e calculada a percentagem de crescimento celular (CC%) em comparação com o controlo de células não tratadas (Eq. 4).

$$CC\% = \frac{\text{Fluorescência}(\text{teste}) - \text{Fluorescência}(\text{meio})}{\text{Fluorescência média dos controlos}} \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

3.4. Distribuição do ciclo celular e apoptose (Sub-G1)

Por forma a avaliar a distribuição do ciclo celular e o número relativo de células em apoptose tardia (fração Sub-G1) efetuou-se o ensaio de citometria de fluxo com marcação do DNA por iodeto de propídio segundo o método descrito por Riccardi *et al.* [44].

Para realizar o ensaio, as células ficaram a incubar com os respetivos tratamentos durante os tempos correspondentes em placas de 6 poços, conforme descrito nas respetivas secções. No final da incubação recolheu-se o sobrenadante de cada poço para tubos falcon devidamente identificados, lavando os poços com PBS de seguida e recolhendo o mesmo para os tubos. Posteriormente, os poços foram tripsinizados e a suspensão celular foi recolhida para os respetivos tubos. De seguida, os poços foram lavados novamente com PBS e a solução foi recolhida. Seguidamente, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 300 × g. Por último as células foram ressuspensas

em 500 μ L de PBS após descartar o sobrenadante e fixadas com 4,5 mL de etanol 70% (v/v) a -20 °C mantendo os tubos no gelo 30 min, e depois guardadas *overnight* a -20 °C.

Adicionalmente, preparou-se o tampão de extração de DNA com 192 mL de fosfato dissódico 0,2 M (5,68 g de fosfato dissódico em 200 mL de água Mili-Q a pH 7,8) e 8 mL de 0,1% de Triton X-100 (100 μ L de detergente em 100 mL de água Mili-Q). Para além disso procedeu-se à preparação da solução de marcação de DNA com 20 μ g/mL de iodeto de propídio e 10 μ g/mL a 0,2 mg/mL de RNase livre de DNase (Ribonuclease A de pâncreas bovino, Ref. R4875 da marca *Sigma-Aldrich*, Missouri, Estados Unidos da América) em PBS.

No dia da citometria adicionou-se aos tubos 5 mL de PBS para diluir o etanol e centrifugou-se a mistura a 400 \times g durante 5 minutos removendo depois o sobrenadante. A suspensão celular foi novamente ressuspensa em 0,4 mL de PBS aos quais se adicionaram 0,5 mL de tampão de extração de DNA e incubou-se a mistura à temperatura ambiente durante 5 minutos, sendo a mesma posteriormente centrifugada a 400 \times g por 5 minutos. Por último, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 0,3 mL de solução de marcação de DNA, ficando a incubar durante pelo menos 30 minutos isoladas da luz à temperatura ambiente antes da aquisição.

O ciclo celular e fração de células Sub-G1 (apoptóticas) foi avaliado com recurso ao aparelho *BD FACSCalibur* com o programa *CellQuest TM*. O comprimento de onda utilizado foi de 488 nm para excitação do iodeto de propídio e eram recolhidos pelo menos 20000 eventos em dispersão lateral (FSC, *forward scatter*) ajustando os parâmetros de forma precisa para eliminar parcialmente resíduos celulares (*debris*).

A análise dos resultados obtidos no ensaio de citometria foi feita com recurso ao programa *FlowJo* (v. 10.5.3, FLOWJO.LLC, Ashland, Estados Unidos da América) para determinar as fases do ciclo celular de cada amostra de acordo com o algoritmo pragmático de *Watson* [45].

3.5. Tratamentos

3.5.1. Transfeção

Para realizar a transfeção as células foram semeadas, no dia anterior, em 64 μ L de meio nas placas de 96 poços e em 1600 μ L de meio no caso das placas de 6 poços e colocadas na incubadora em condições padrão de cultura.

Para as linhas DU145 e A549 determinou-se que as condições ideais para os ensaios em placas de 96 poços eram de 1000 células por poço para uma experiência de 96 h desde o início do tratamento, ou seja, 4 dias, e para a linha PC3 1000 células por poço para experiências de 120 h, ou seja, 5 dias. Em placas de 6 poços foram semeadas 30000 células por poço, tendo em conta o aumento proporcional da área do poço.

Por forma a realizar a transfeção foram preparados tubos *RNase free* com os lipoplexos. Estes tinham OPTIMEM, que posteriormente foi alterado para MEM (Biowest, Nuaille, França), siRNA (siLUC, siPLK1, siRalGPS2_#231 e pool siRalGPS2) com lipofectamina RNAiMAX (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) nas proporções indicadas, a uma concentração final 5× a pretendida no poço e ficavam a incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente antes de serem colocados 16 µL por poço (contendo 64 µl de meio completo), em placas de 96 poços e 400 µL por poço (contendo 1600 µl de meio completo), nas placas de 6 poços.

No dia seguinte à transfeção foram adicionados 100 µL de meio aos poços nas placas de 96 e 3 mL de meio nos poços das placas de 6 poços, por forma a que as células estivessem em condições ideais de crescimento.

3.5.2. Tratamento com sinvastatina

As células foram semeadas de forma idêntica ao descrito anteriormente para a transfeção. Posteriormente foram efetuados dois tipos de tratamento: tratamento com dose única (durante 72 h e 48 h) e um tratamento com doses diárias (durante 3 dias e 4 dias, de acordo com o otimizado para cada linha celular).

Para preparar as soluções de tratamento partiu-se de uma solução inicial de sinvastatina (adquirida à *Bld Pharmatech Ltd*, Shangai, China) em DMSO à concentração de 10 mM, da qual era preparada uma solução intermédia à concentração de 300 µM em meio de cultura. A partir desta eram preparadas soluções com diluições sucessivas para concentrações de 100 µM, 30 µM, 10 µM, 3µM, 1 µM, 0,3 µM e 0,1 µM.

Na modalidade de tratamento único foi retirada a totalidade de meio que se encontrava no poço e adicionados 200 µL das soluções de sinvastatina, preparadas no dia anterior ao tratamento e mantidas a 4 °C, às células em cultura 72 h e 48 h antes do final da experiência para as placas de 96 poços. No caso das placas de 6 poços foram adicionados 4 mL de solução de sinvastatina preparada no dia anterior às células em cultura a 72 h e 48 h do fim da experiência.

No que diz respeito aos tratamentos com doses diárias as soluções eram preparadas no próprio dia e eram adicionadas à placa, retirando a solução que se encontrava nos poços e adicionando 100 µL nas placas de 96 poços e 2 mL nas placas de 6 poços de solução nova todos os dias a 4 e 3 dias do fim da experiência.

3.5.3. Transfeção em combinação com tratamentos de sinvastatina

Após otimizar as condições de transfeção e as condições ideais para os tratamentos com sinvastatina testou-se a combinação dos tratamentos em conjunto.

Assim, na linha DU145, iniciando 24 h após a transfeção nas razões de 1:10 e 1,5:15, foram efetuados 3 tratamentos com uma solução de sinvastatina a 0,3 µM renovada nos poços todos os dias retirando a solução do poço e adicionando 100 µL da solução de sinvastatina à referida concentração preparada de fresco.

No caso da linha PC3 as combinações foram feitas com a razão de transfeção de 1,5:15 e duas concentrações diferentes de sinvastatina. Assim, foram efetuados 4 tratamentos em dias seguidos, para os quais a solução de sinvastatina foi preparada de fresco, nos quais se retirava a totalidade de solução que se encontrava no poço e se adicionavam 100 µL de solução de sinvastatina a 0,3 µM. Para além disso, foi ainda testado o tratamento único, no qual as células transfetadas foram expostas a um tratamento único com a duração das 48 h finais da experiência, com uma solução de sinvastatina a 3 µM, sendo que para tal era retirado todo o líquido do poço e se adicionavam 200 µL de solução de sinvastatina, preparada no próprio dia.

Para a linha A549 escolheu-se combinar com a transfeção na razão 1:12 a modalidade de 3 tratamentos com uma solução de 1 µM. Para tal, retirou-se a totalidade de meio de cada poço e adicionaram-se 100 µL de nova solução de sinvastatina preparada no próprio dia.

3.5.4. Tratamento sem soro

Na linha DU145 (com 2000 células/poço durante 5 dias) o meio foi substituído por meio sem FBS durante as últimas 72 h, 48 h e 24 h de experiência, tendo-se avaliado também a diferença entre lavar ou não os poços 1× com PBS no momento da mudança de meio com soro para meio sem soro.

3.5.5. Transfeção em combinação com ausência de soro

Na linha A549, numa densidade de 1000 células por poço ao longo de 4 dias, combinou-se a razão de transfeção 1:12 com a ausência de soro durante 48 h retirando o meio presente em cada poço e adicionando 200 µL de meio sem soro a cada poço. Na linha DU145 utilizaram-se as razões de transfeção 1:10 e 1,5:15, para uma densidade de 1000 células por poço durante 4 dias, juntamente com a ausência de soro durante 48 h, retirando o meio de cada poço que tinha fatores de crescimento e adicionando meio novo sem FBS. Por último, na linha celular PC3 foi utilizada para a combinação a razão de transfeção de 1,5:15, numa densidade celular de 1000 células por poço durante 4 dias, em conjunto com a ausência de FBS durante 48 h, sendo o procedimento o mesmo que para as restantes linhas celulares.

3.6. Análise bioinformática de dados de acesso livre

Para efetuar uma análise bioinformática dos níveis de expressão dos genes RALGPS2, YAP1 e WWTR1 utilizaram-se os dados de transcriptómica de tumores e ferramentas de análise disponíveis na base de dados aberta *OncoDB* [19], criando *boxplots* de cada gene para cada tipo de cancro (adenocarcinoma da próstata e do pulmão). Foi efetuada ainda a correlação de expressão dos referidos genes nestes *data sets*, bem como noutros tipos de tumores para comparação. Adicionalmente, por forma a avaliar a sobrevivência dos pacientes com adenocarcinoma da próstata e adenocarcinoma do pulmão em função da expressão dos genes RALGPS2, YAP1 e WWTR1 geraram-se os gráficos de *Kaplan-Meier* diretamente na mesma base de dados.

Além disso, foram realizadas análises independentes por uma colaboradora usando bases de dados de acesso livre distintas descritas em apêndice (Apêndice B4).

3.7. Análise estatística

Por forma a obter os gráficos de resultados e os dados da análise estatística utilizou-se o *software GraphPad Prism* (San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América) versão 8.0.1.

Na avaliação do efeito da ausência de soro e da sinvastatina no crescimento celular, a análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak*.

Relativamente aos dados correspondentes ao ensaio de distribuição do ciclo celular da linha DU145 foi feita uma análise *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* que permitiram fazer comparações com o grupo de

controlo e entre grupos, respetivamente. Por outro lado, para analisar Sub-G1 da mesma linha realizou-se uma análise *One-way ANOVA*, para comparar todas as condições com o controlo, e em seguida um teste de comparações múltiplas de *Tukey* que permitiu comparar os resultados entre grupos.

Para analisar o significado estatístico da transfeção das linhas DU145 e PC3 a análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* emparelhada seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak*. Por outro lado, o significado estatístico da linha A549 foi obtido através da realização de uma análise *One-way ANOVA* emparelhada seguida de um teste de comparações múltiplas de *Dunnett*.

No que respeita ao ensaio feito com combinação de transfeção e ausência de soro, a análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak* para os grupos siLUC e pool siRalGPS2. Para além disso, para o grupo siPLK1 a análise estatística foi uma *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

Relativamente ao tratamento das linhas celulares com sinvastatina em combinação com a transfeção foi feita uma análise *Two-way ANOVA* emparelhada seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak* para os grupos siLUC e pool siRalGPS2 e para o grupo siPLK1 a análise estatística foi uma *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

O significado estatístico das diferenças na distribuição do ciclo celular com recurso à combinação de sinvastatina, ausência de soro e silenciamento com siRNA nas linhas PC3 e A549 foi obtido através de uma análise estatística *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Para além disso, para a análise da apoptose em ambas as linhas a análise estatística realizada foi *One-way ANOVA* seguida também de um teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Avaliação do efeito da ausência de soro e de adição de sinvastatina na proliferação e sobrevivência celulares *in vitro*.

Conforme esperado, o crescimento das células DU145 foi fortemente afetado pela ausência de FBS no meio, mas também pelas lavagens com PBS aquando das trocas de meio (Figura 1). De facto, verificou-se que em relação ao controlo negativo (com soro) houve um decréscimo acentuado, superior a 50%, no crescimento celular na ausência de soro durante 72 h nos poços com e sem lavagem com PBS. Nesta condição não houve diferenças estatisticamente relevantes entre fazer ou não a lavagem com PBS.

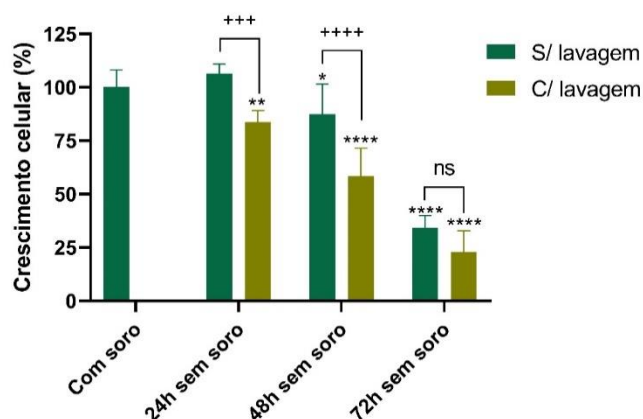


Figura 1 - Avaliação do impacto da ausência de soro fetal bovino, e de fazer lavagem com PBS aquando da troca de meio, no crescimento celular.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e + para comparações entre grupos. As células foram mantidas em ausência de FBS durante as últimas 24, 48 e 72 h de experiência para avaliar o crescimento celular. Para além disso, aquando da troca de meio completo para meio sem soro procedeu-se à lavagem de alguns poços com PBS para avaliar o impacto da lavagem no crescimento celular. Esta experiência tem um n=8 para cada condição que pertenciam todos à mesma experiência.

No que respeita às 48 h verificou-se que, em relação aos poços com soro, a ausência de FBS inibiu o crescimento celular com relevância estatística nos poços com ou sem lavagem, contudo, a lavagem com PBS induziu maior inibição. A lavagem com PBS

também foi relevante nas células que foram sujeitas à ausência de soro durante apenas as 24 h finais da experiência, em que somente os poços lavados inibiram com significado estatístico o crescimento em relação ao controlo com soro.

A análise de variância (*Two-way ANOVA*) indicou que o tempo em horas de ausência de soro no meio foi o fator mais relevante a afetar o crescimento celular, contribuindo para 83,04% da variância (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da análise estatística *Two-way ANOVA* com os dados estatísticos da experiência de avaliação do crescimento celular com e sem FBS.

Fonte de variância	% de variância	Valor de p
Interação	3,375	< 0,0001
Tempo (h)	83,04	< 0,0001
Lavagem	6,449	< 0,0001

Tendo em conta os resultados apresentados, para combinar com os restantes tratamentos escolheu-se manter as células em meio sem soro durante as 48 h finais de cada experiência sem lavar os poços com PBS aquando da mudança de soro, uma vez que se verificava uma ligeira inibição no crescimento celular sem que a condição fosse por si só demasiado tóxica para combinar com outra.

A diminuição do crescimento celular na ausência de soro ocorreu de acordo com o esperado uma vez que, de acordo com a literatura, o FBS apresenta funções no que respeita à proliferação celular e em assegurar as atividades essenciais à sobrevivência das células [46]. Para além disso, o FBS é ainda responsável por enriquecer o meio de cultura com hormonas, fatores de ligação e vitaminas por forma a garantir que o meio de crescimento das células é o mais semelhante possível ao *in vivo* [47].

4.2. Ensaios com sinvastatina

Está descrito na literatura que as estatinas, habitualmente utilizadas para tratamento da hipercolesterolemia, incluindo a sinvastatina, têm efeito em células de cancro da próstata, nomeadamente na redução da proliferação e no aumento da apoptose [28]. De forma a seleccionar a condição a combinar com o silenciamento de RalGPS2, foram testadas diferentes condições de tratamento com sinvastatina nas 3 linhas de cancro em estudo.

O efeito da sinvastatina na linha celular DU145 foi avaliado em dose únicas de 0,3 a 100 μM por 48 h e 72 h ou em tratamentos múltiplos de 0,1 a 30 μM com repetições de 3 ou 4 tratamentos diários (Figura 2A). A inibição do crescimento foi mais pronunciada com

72 h de tratamento do que com 48 h, mas a diferença teve significado estatístico apenas nas concentrações mais elevadas de 30 μM e 100 μM (Tabela 4). Estas concentrações são pouco relevantes uma vez que são muitíssimo mais elevadas do que as que são habitualmente alcançadas *in vivo* que atinge níveis plasmáticos de cerca de 10 a 34 ng/mL (C_{max}), equivalente a 0,02 - 0,08 μM , com doses orais de 40 mg [48, 49]. A falta de relevância das concentrações muitas vezes usadas *in vitro* foi já discutida por Björkhem-Bergman *et al.*, que argumenta ainda que as baixas concentrações no plasma estão presentes por períodos de tempo curtos enquanto que em incubações *in vitro* pode durar até 4 dias [50]. Contudo, a sinvastatina é habitualmente de toma diária, e tanto a sinvastatina como a forma ativa não deverão permanecer nas culturas *in vitro* por muito tempo devido a degradação química e metabolização pelas células, pelo que as concentrações teóricas de partida serão na verdade superiores às realmente presentes no poço [51]. Ainda assim, é seguro dizer que concentrações *in vitro* teoricamente superiores a 10 μM não são relevantes. Com 72 h de tratamento único, houve uma ligeira inibição do crescimento de cerca de 25% com a concentração de 10 μM , mas nas concentrações inferiores, mais relevantes considerando as atingidas *in vivo*, não houve efeito mensurável.

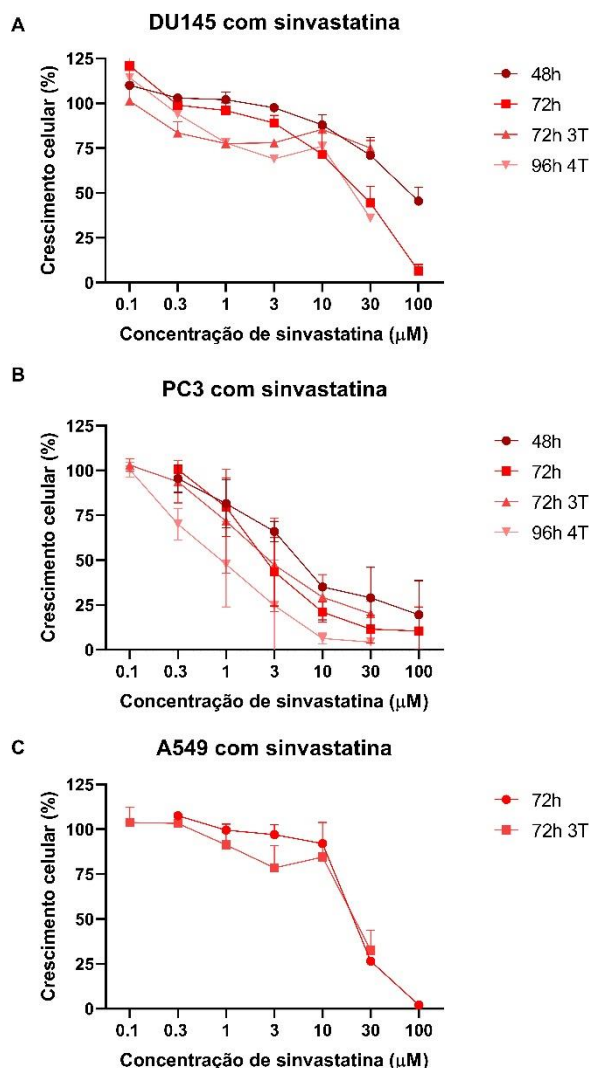


Figura 2 - Avaliação do crescimento celular após tratar as células com simvastatina.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak*. (A) - A linha DU145 foi tratada com soluções de simvastatina com concentrações entre 0.1 μM e 100 μM durante 48 ou 72 h ou em 3 ou 4 tratamentos. O grupo de amostras tinha um $n=2$ para os grupos 48h, 72h e 3T 72h. O grupo 4T 96h tem um $n=1$. (B) - A linha PC3 foi tratada com soluções de simvastatina com concentrações entre 0.1 μM e 100 μM durante 48 ou 72 h ($n=2$) ou em 3 ou 4 tratamentos ($n=3$). (C) - A linha A549 foi tratada com soluções de simvastatina com concentrações entre 0.1 μM e 100 μM durante 72 h ($n=2$) ou em 3T 72h ($n=4$).

Uma vez que a simvastatina é lábil em meio aquoso a pH fisiológico, foi avaliado se a renovação diária da simvastatina no meio produziria maior efeito, o que se confirmou (Tabela 4, 72 h vs. 72h 3T). Verificou-se que uma diminuição do crescimento celular em cerca de 25% com 3 tratamentos múltiplos a 1 μM , 10 \times menos do que com um tratamento único. Contudo, 1T e 3T só foram significativamente diferentes na concentração de 30 μM (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados estatística para a linha DU145 tratada com sinvastatina. A análise feita foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak*.

Comparação	Fonte de variação	Valor de <i>p</i>	Resumo do valor de <i>p</i>	Teste multi-comparativo		
				Concentração (μM)	Valor de <i>p</i>	Resumo do valor de <i>p</i>
48 h vs. 72 h	Interação	0,0235	*			
	Concentração	< 0,0001	****			
	Tempo de tratamento	< 0,0001	****			
				30	0,0159	*
			100	0,0007	***	
72 h vs. 72 h 3T	Interação	0,0010	**			
	Concentração	0,0003	***			
	Tempo de tratamento	0,9727	ns			
				30	0,0037	**
72 h 3T vs. 96 h 4T	Interação	0,0039	**			
	Concentração	0,0006	***			
	Tempo de tratamento	0,0261	*			

A linha PC3 pareceu mais sensível à sinvastatina do que a DU145, embora se tivesse verificado alguma variabilidade entre repetições (Figura 2B). Devido à elevada variabilidade, nesta linha não se verificaram diferenças estatisticamente relevantes quando se comparou o tratamento durante 48 h e 72 h, nem quando se procedeu à comparação dos resultados para 3 tratamentos e 4 tratamentos (Tabela 5). Para além disso os resultados não demonstraram diferenças estatísticas quando comparados os 3 tratamentos com o tratamento durante 72 h para as concentrações em comum compreendidas entre 0,3 e 30 μM .

Tabela 5 - Resultados estatísticos para a linha PC3 tratada com sinvastatina. A análise feita foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak*.

Comparação	Fonte de variação	Valor de <i>p</i>	Resumo do valor de <i>p</i>
48h vs. 72h	Interação	0,6481	ns
	Concentração (μM)	< 0,0001	****
	Tempo de tratamento	0,0709	ns
72h 3T vs. 96h 4T	Interação	0,8445	ns
	Concentração (μM)	< 0,0001	****
	Tempo de tratamento	0,0022	**
72h vs. 72h 3T	Interação	0,8988	ns
	Concentração (μM)	< 0,0001	****
	Tempo de tratamento	0,8667	ns

Na linha A549 realizaram-se tratamentos únicos com a duração de 72 h e 3 tratamentos diários com concentrações de sinvastatina semelhantes às usadas nas outras linhas (Figura 2C). Contudo, não houve diferença significativa entre 1 e 3 tratamentos diários, apesar de se vislumbrar uma pequena diferença sem significado estatístico a 3 μM

(Tabela 6). Ficou claro, isso sim, que só se obtém um efeito pronunciado de inibição do crescimento celular acima de 10 μM .

Tabela 6 - Resultados estatísticos para a linha A549 tratada com sinvastatina. A análise feita foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak*.

Comparação	Fonte de variação	Valor de p	Resumo do valor de p
72h vs. 72h 3T	Interação	0,5122	ns
	Concentração (μM)	< 0,0001	****
	Tempo de tratamento	0,1440	ns

Apesar da diminuição do crescimento celular das linhas A549, PC3 e DU145 quando as mesmas foram tratadas com sinvastatina, os resultados obtidos não foram verdadeiramente os esperados, uma vez que o efeito só foi verificado quando foram utilizadas concentrações de sinvastatina muito mais altas do que as consideradas seguras *in vivo*.

Murtola *et al.* demonstram que tratamentos *in vitro* com sinvastatina em concentrações compreendidas entre 2 e 10 μM provocaram paragem na progressão do ciclo celular e apoptose em células de cancro da próstata, nomeadamente PC3 e DU145. Para além disso, à concentração de 0,1 μM durante 5 dias, considerada relevante clinicamente, verificou-se indução de senescência nas linhas de cancro da próstata [11, 31, 52]. Para além disso, a sinvastatina a 2 μM durante 2 dias teve efeito no aumento da fase G1 do ciclo celular nas linhas PC3 e DU145, contrariamente à fase S na qual se verificou uma diminuição [11]. Um outro estudo demonstrou que a linha PC3 tratada com 10 μM durante 48 h provocou um aumento do número de células em G1 [30].

Para aprofundar o conhecimento do efeito da remoção de soro e do tratamento com sinvastatina na linha de cancro da próstata DU145, esclarecendo se resulta da inibição da proliferação ou morte celular, ou se seria uma combinação de ambos, foi avaliado o efeito destes tratamentos na morfologia, distribuição do ciclo celular e na indução espontânea de apoptose. Foi avaliada sinvastatina a 10 μM e 30 μM , remoção de FBS durante as últimas 48 h e a combinação destes tratamentos. Na Figura 3 é possível observar o fenótipo das células DU145 no final da experiência antes de realizar o ensaio de citometria. Na mesma é possível verificar que existe uma diminuição do número de células e uma alteração da morfologia nas condições sem soro em combinação com sinvastatina (Figura 3, painéis 5 e 6) bem como nas condições sinvastatina 30 μM durante 48 h e 72 h (Figura 3, painéis 9 e 10). Nas restantes condições verificam-se alterações na morfologia, mas sem alterações significativas no número de células presentes.

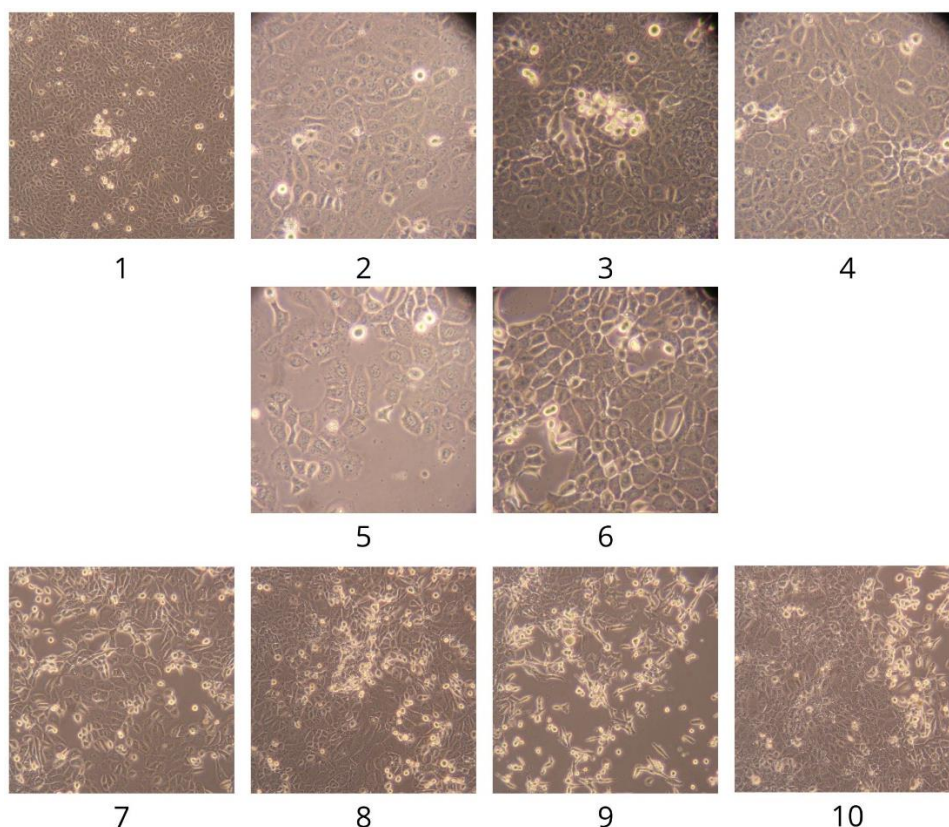


Figura 3 - Fenótipo da linha celular DU145 após ser tratada com ausência de soro durante 24 h, 48 h e 72 h em combinação com sinvastatina 10 μ M e 30 μ M.

As imagens foram obtidas com uma ampliação de 10 \times . (1) - Controlo negativo; (2) - Células mantidas na ausência de soro durante 24 h; (3) - Células mantidas na ausência de soro durante 48 h; (4) - Células mantidas na ausência de soro durante 72 h; (5) - Células mantidas na ausência de soro durante 24 h em combinação com tratamento de sinvastatina 10 μ M; (6) - Células mantidas na ausência de soro durante 48 h em combinação com tratamento de sinvastatina 10 μ M; (7) - Células tratadas com sinvastatina a 10 μ M durante 48 h; (8) - Células tratadas com sinvastatina a 10 μ M durante 72 h; (9) - Células tratadas com sinvastatina a 30 μ M durante 48 h; (10) - Células tratadas com sinvastatina a 30 μ M durante 72 h.

Tanto a remoção do soro como a adição de sinvastatina nas duas concentrações testadas provocaram um aumento do número de células em G1 e diminuição do número de células na fase S do ciclo celular comparando com o controlo (Figura 4). O efeito foi mais pronunciado com 30 μ M de sinvastatina do que com 10 μ M ($p < 0.0001$). Contudo as combinações não tiveram um efeito mais pronunciado do que apenas a remoção de soro, sugerindo um efeito antagonista. Foram também efetuadas experiências semelhantes, mas com a remoção de soro por 24 h e 72 h, que originaram resultados idênticos (Apêndice A2). Isto pode significar que a sinvastatina regulará as mesmas vias de regulação da proliferação estimuladas pelo soro, que já se encontram inibidas na ausência de soro, e por isso não terá efeito aditivo na inibição da proliferação celular.

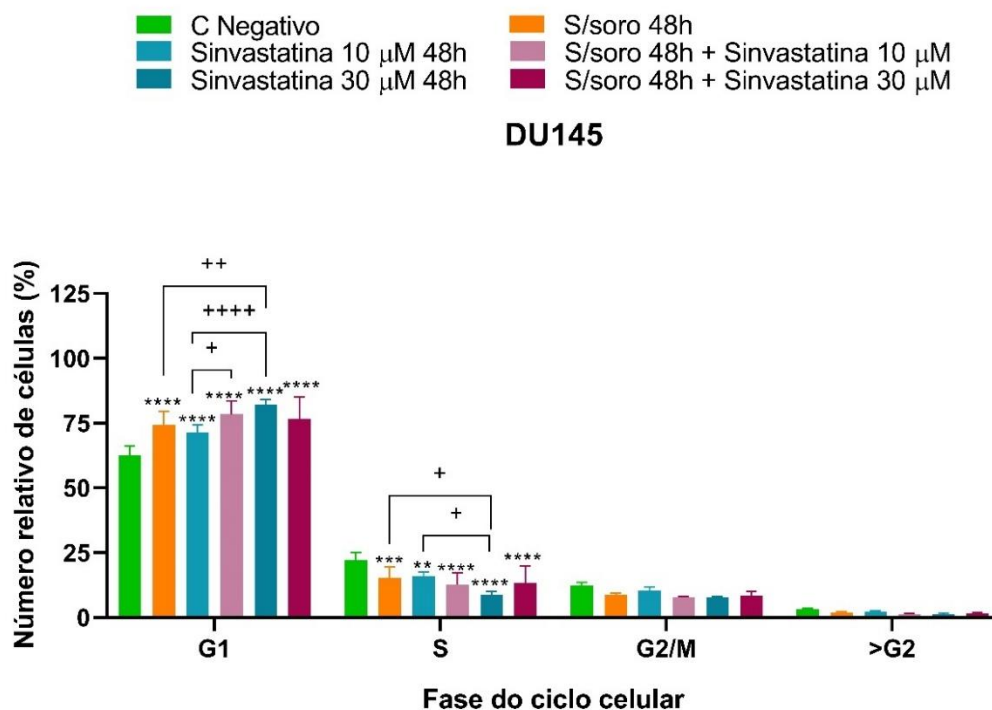


Figura 4 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha DU145 após tratar com sinvastatina 10 e 30 µM e manter em ausência de soro durante 48 h.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e + para comparações entre grupos.

No que respeita à indução de apoptose (Figura 5) a remoção de soro não teve qualquer efeito e a sinvastatina sozinha induziu apoptose apenas na concentração de 30 µM, efeito que foi muito mais pronunciado na combinação com ausência de soro durante 48 h ($p < 0.0001$). Isto sugere um efeito sinérgico entre estes dois tratamentos relativamente à indução de apoptose. Daqui se infere que apenas em concentrações artificialmente altas a sinvastatina induz apoptose nesta linha, e que a ausência de soro sensibiliza as células para este efeito.

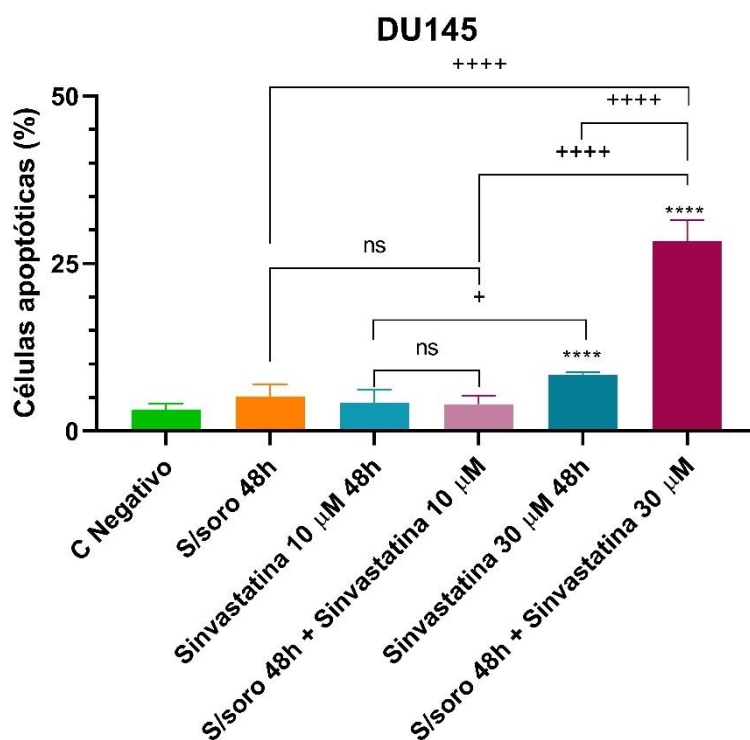


Figura 5 - Análise de Sub-G1 na linha DU145 com sinvastatina 10 e 30 μ M em combinação com ausência de soro 48 h.

A análise estatística realizada foi *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e + para comparações entre grupos.

4.3. Transfeção

A transfeção com siRNA foi testada na linha celular DU145 com diferentes razões de volume de lipofectamina por quantidade de siRNA [0,5:5; 1:10; 1,5:10, 1,5:15, 2:10 e 3:10 (μ L:pmol)]. Os resultados são mostrados primeiro relativamente ao controlo de células não tratadas, e depois normalizados relativamente ao controlo negativo de transfeção (siLUC).

Com 2 e 3 μ L de lipofectamina : 10 pmol siRNA e uma concentração final de siRNA no poço de 10 nM verificou-se elevada toxicidade com o siRNA controlo, sobretudo na razão 3:10 (Figura 6A). A razão 0,5:5 (5 nM siRNA no poço) foi pouco eficaz e a 1,5:10 (10 nM siRNA no poço) ainda relativamente tóxica (siLUC com um efeito de inibição do crescimento de cerca de 50%) (Figura 6B). As razões 1:10 e 1,5:15 de lipofectamina:siRNA (μ L:pmol) (10 nM e 15 nM de siRNA no poço) apresentaram valores de inibição de crescimento celular pelo siPLK1 (controlo positivo) mais claros, embora o tratamento com siRalGPS2_#231 e pool siRalGPS2 não tenha provocado

maior inibição do crescimento do que o controlo negativo (siLUC) nesta linha (Figura 6C).

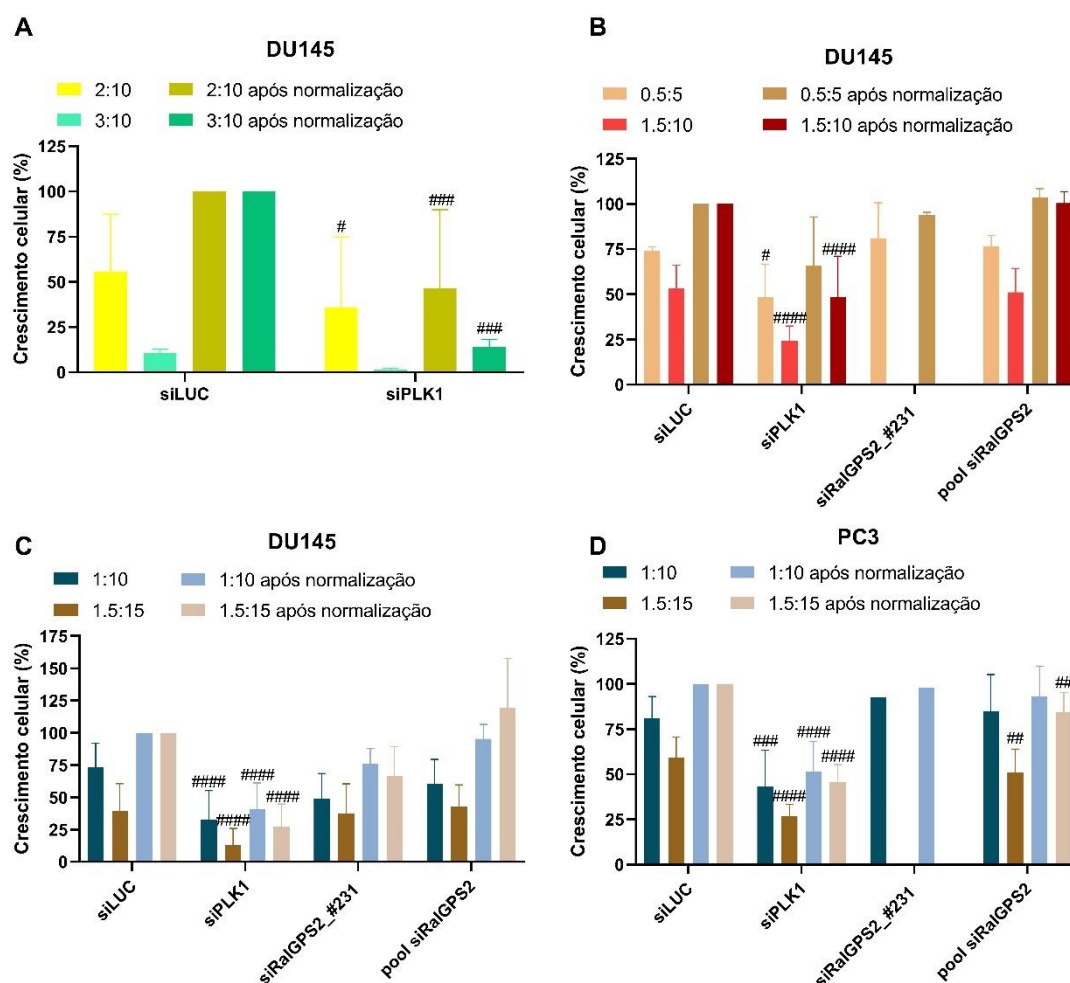


Figura 6-Transfeção das linhas DU145 e PC3 para otimização das condições.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* emparelhada seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak* e as diferenças significativas foram assinaladas com # quando comparados os grupos com o siLUC. (A) - A linha DU145 foi transfetada nas razões 2:10 (n=4) e 3:10 (n=2) com os controlos de transfeção para testar a toxicidade e a eficácia das razões. (B) - A linha DU145 foi transfetada com as razões 0,5:5 (n=2) e 1,5:10 (n=6). (C) - A linha DU145 foi também transfetada com as razões 1:10 (n=10) e 1,5:15 (n=8), que se revelaram as melhores condições de silenciamento. (D) - A linha PC3 foi também transfetada com as razões 1:10 (n=4) e 1,5:15 (n=9).

No que respeita à linha celular PC3 (Figura 6D) foram testadas as condições que tinham demonstrado ter melhores efeitos na linha DU145, ou seja, 1:10 e 1,5:15 de lipofectamina:siRNA ($\mu\text{L}:\text{pmol}$). Assim, verificou-se inibição significativa do crescimento celular com o siPLK1 quando comparado com o siLUC, bem como uma ligeira diminuição significativa com pool siRalGPS2 na razão 1,5:15.

De ressaltar que o siLUC, apesar de ser um controlo de sequência única e sem modificações químicas, tal como o siPLK1 e o siRalGPS2_#231, poderá ainda assim ter alguns efeitos inespecíficos no crescimento celular, que mascarem parcialmente o efeito dos siRNA específicos. Por outro lado, não é de todo o controlo ideal para o pool siRalGPS2, que se considera poder originar efeitos inespecíficos em menor extensão por ser um pool de diferentes sequências e conter modificações químicas que o tornarão mais específico.

No caso da linha celular A549 apenas se testou a razão 1:12 de lipofectamina:siRNA ($\mu\text{L}:\text{pmol}$), uma vez que existia conhecimento prévio sobre o comportamento da linha quando transfetada com os siLUC, siPLK1, siRalGPS2_#231 [2]. Verificou-se que ocorreu um decréscimo no crescimento celular das células transfetadas com siPLK1 e apenas uma tendência no mesmo sentido com o siRalGPS2_#231 em comparação com as células transfetadas com o controlo positivo siLUC (Figura 7).

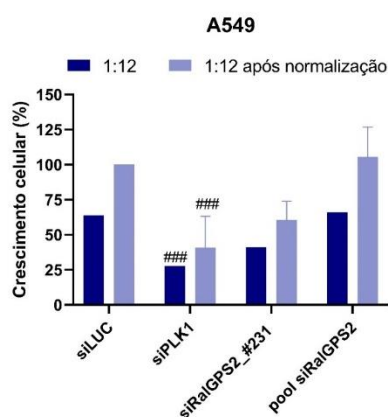


Figura 7 - Transfecção da linha A549 para otimizar as condições de transfecção.

A análise estatística foi uma *One-way ANOVA* emparelhada seguida de um teste de comparações múltiplas de *Dunnnett* e as diferenças significativas foram assinaladas com # quando comparados os grupos com o siLUC. A linha foi transfetada com lipofectamina : siRNA na razão 1:12 com um n=8.

De uma forma geral os níveis de transfecção parecem não ter sido reprodutíveis, uma vez que houve elevada variabilidade no nível de citotoxicidade obtido entre experiências, talvez pelo facto de não estarem reunidas as condições ideais de transfecção, nomeadamente ao nível de ter a totalidade dos materiais necessários com a garantia de serem *RNase free*. Para além disso, é também importante referir que apesar da relativa toxicidade do controlo negativo (siLUC), foi utilizada para executar as experiências menos lipofectamina do que a recomendada no protocolo que acompanha o produto. As mesmas razões 1:10 e 1:12 de lipofectamina:siRNA ($\mu\text{L}:\text{pmol}$) tinham sido

usadas com sucesso em diversas linhas noutro laboratório, habitualmente produzindo valores de inibição do crescimento celular relativamente a células não tratadas superiores a 90% com a mesma sequência de siPLK1 [2].

4.4. Combinação da transfeção com a remoção do soro do meio de cultura

Após testar o nível de transfeção em cada linha escolheu-se como siRNA contra RalGPS2 o pool siRalGPS2 para combinar com a ausência de soro por 48 h. Assim, para a linha DU145 foram combinadas para a transfeção as condições de 48 h na ausência de FBS e a transfeção na razão de 1,5:15 e obtiveram-se resultados com efeitos da remoção de soro e transfeção mais acentuados (Figura 8B). Por outro lado, como esta condição pareceu ser algo tóxica, testou-se ainda para a linha DU145 a condição de transfeção 1:10 e verificou-se haver diferenças estatisticamente significativas apenas na condição presença de FBS quando comparado o resultado de siPLK1 com o controlo não tratado (Figura 8A). Ou seja, também não se observaram indícios de efeito sinérgico na combinação de silenciamento de RalGPS2 e remoção do soro.

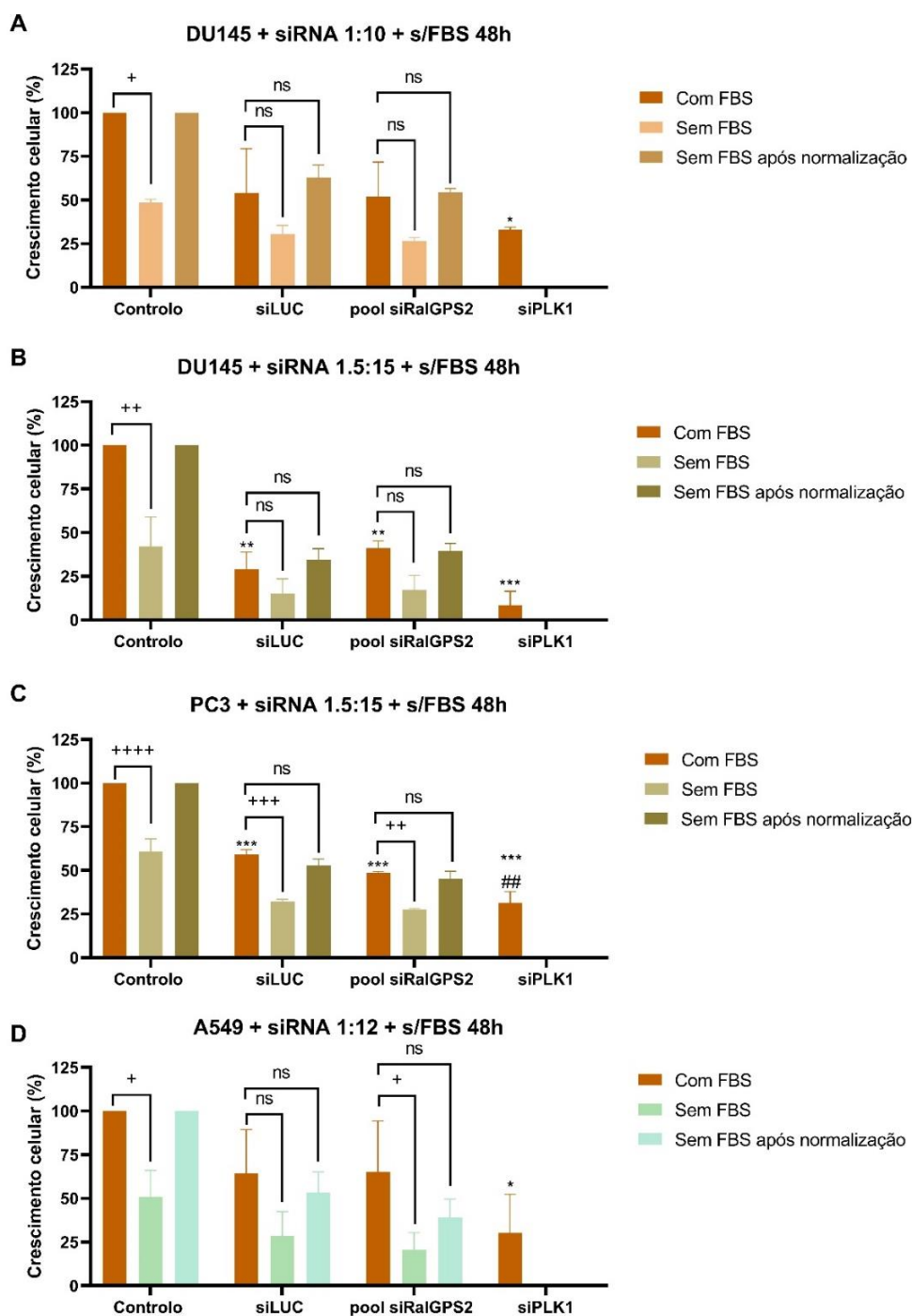


Figura 8-Avaliação do crescimento celular quando as células foram tratadas com ausência de soro durante 48 h em combinação com o silenciamento com siRNA.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak* para os grupos siLUC e pool siRalGPS2 e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo, # quando comparados os grupos com o siLUC e + para comparações entre grupos. Para o grupo siPLK1 a análise estatística foi uma *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo, # quando comparados os grupos com o siLUC. (A) - A linha DU145 foi transfetada com a razão 1:10 em combinação com a ausência de soro durante as 48 h finais da experiência para um n=2. (B) - A linha DU145 transfetada na razão 1,5:15 em combinação com ausência de soro durante 48 h tinha um n=2. (C) - A linha PC3 foi mantida na ausência de soro durante as últimas 48 h

da experiência e foi silenciada com a razão 1,5:15 com um n=2. (D) - A linha A549 foi transfetada com a razão 1:12 e mantida na ausência de soro durante as 48 h finais de experiência com um n=3.

Na linha PC3 foram combinadas as mesmas condições que para a linha DU145, ou seja, a razão de transfeção de 1,5:15 e 48 h sem FBS. Tanto o soro como a transfeção por si só inibiram significativamente o crescimento celular (Figura 8C). A combinação dos tratamentos levou ainda a uma inibição mais forte, contudo, o efeito da combinação parece ter sido aditivo, pois não se observaram diferenças entre os tratamentos com siRNA e os resultados normalizados com a combinação de tratamentos.

Considerou-se ainda para a linha A549 a razão de transfeção 1:12 e ausência de FBS 48 h e verificou-se que a remoção do soro inibiu significativamente o crescimento celular na ausência de transfeção, bem como na condição de células transfetadas com pool siRalGPS2 (Figura 8D). Após normalização dos resultados sem soro, o crescimento normalizado da combinação do silenciamento de RalGPS2 e remoção do soro não foi significativamente diferente estatisticamente ao do silenciamento de RalGPS2 na presença de soro, indicando um possível efeito aditivo entre a remoção de soro e silenciamento de RalGPS2 na inibição do crescimento celular nesta linha. De facto, nas linhas de cancro da próstata (PC3 e DU145) e do pulmão (A549) estudadas, os resultados são indicativos de não ter existido interação específica entre o silenciamento de RalGPS2 com a ausência de soro durante 48 h. Para aumentar a confiança na interpretação do resultado obtido seria necessário diminuir a variabilidade existente ou aumentar o número de repetições. As células transfetadas com siPLK1 apresentaram diferenças em relação ao grupo controlo, comprovando a eficiência da transfeção.

4.5. Combinação da transfeção com a adição de sinvastatina ao meio de cultura

Na linha DU145, 3 tratamentos diários de sinvastatina a 0,3 μ M por si só originaram uma ligeira inibição do crescimento celular, que foi mais acentuada na condição de transfeção apenas (em ambas as razões 1:10 e 1,5:15, mas mais na segunda), embora apenas o siPLK1 tivesse mostrado diferenças significativas respetivamente ao siLUC (Figura 9A). A combinação dos dois tratamentos não diminuiu significativamente o crescimento celular comparativamente à transfeção por si só. No caso da razão 1,5:15, os valores do crescimento celular após transfeção com o siLUC e os valores normalizados da combinação com sinvastatina 0,3 μ M e siLUC apresentaram uma diferença significativa, o que não se verificou com o pool siRalGPS2. Isto parece sugerir

que é algum efeito do siLUC que tem nesta condição um efeito sinérgico na combinação com o tratamento por sinvastatina.

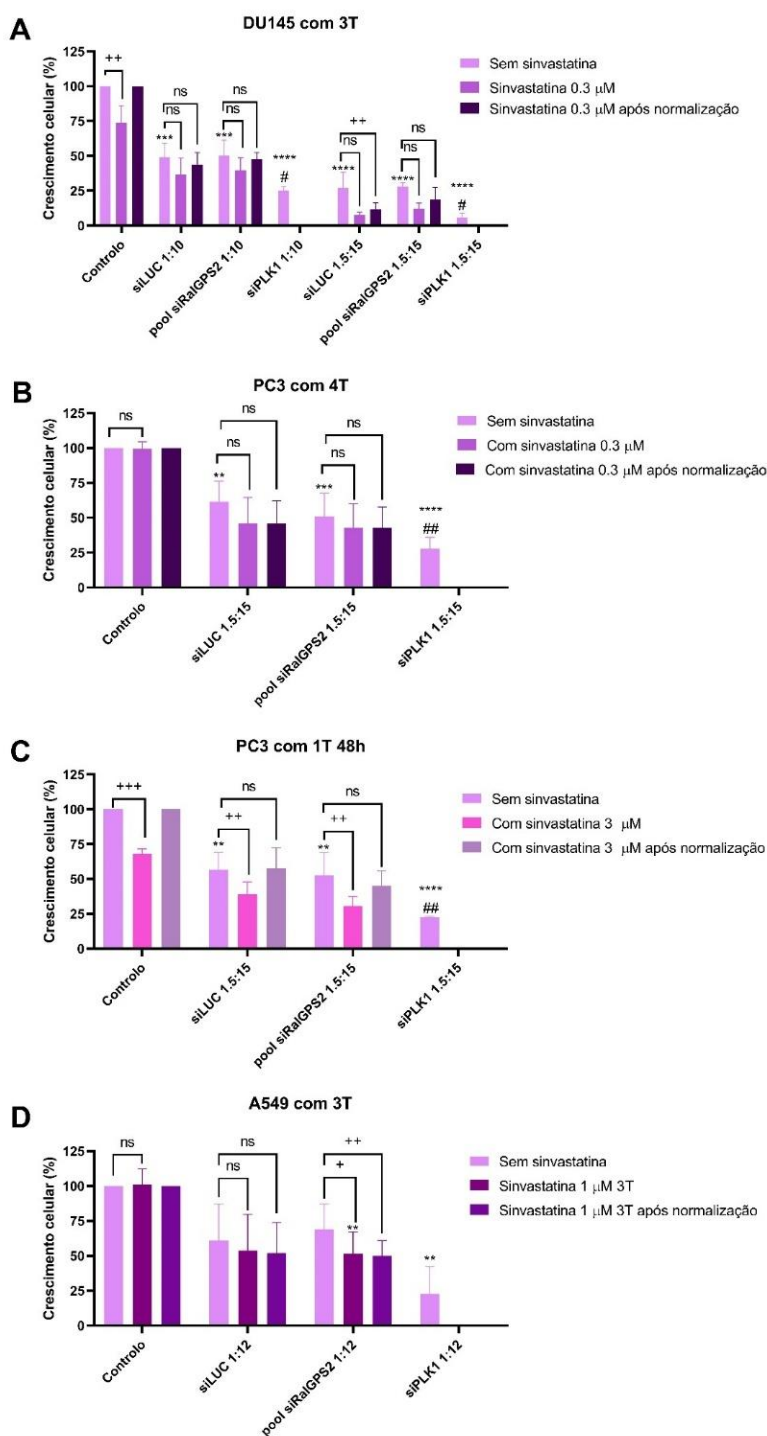


Figura 9 - Avaliação do crescimento celular quando as células foram silenciadas em combinação com tratamento com sinvastatina.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* emparelhada seguida de um teste de comparações múltiplas de *Sidak* para os grupos siLUC e pool siRalGPS2 e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo, # quando comparados os grupos com o siLUC e +

para comparações entre grupos. Para o grupo siPLK1 a análise estatística foi uma *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo, # quando comparado com o siLUC.

A linha PC3 foi tratada com uma solução de sinvastatina a 0,3 μM renovada diariamente durante 4 dias (4T) e transfetada com uma razão de 1,5:15 (Figura 9B). Houve nesta linha uma inibição significativa apenas pela transfeção com siLUC, pool siRalGPS2 e siPLK1 comparativamente ao grupo de células não tratadas. O crescimento celular das células transfetadas com siPLK1 foi também significativamente inferior quando comparado com o siLUC. Não houve evidência de efeitos sinérgicos, tal como na linha anterior. Como os 4 tratamentos não tiveram nenhum efeito mensurável neste conjunto de experiências, testou-se ainda a modalidade de tratamento único durante as últimas 48 h de experiência com uma solução de sinvastatina superior, 3 μM , em combinação com a transfeção na razão 1,5:15 (Figura 9C). Os resultados evidenciam novamente o efeito da transfeção e um efeito inespecífico aditivo da combinação.

No que respeita à linha A549, após ser tratada com uma solução de sinvastatina 1 μM (3 tratamentos diários) e transfetada na razão 1:12 (Figura 9D) em comparação ao grupo controlo destaca-se o resultado estatisticamente significativo do siPLK1. Enquanto por si só ou em combinação com o siLUC a sinvastatina à concentração de 1 μM parece não ter tido efeito, a sinvastatina demonstrou um pequeno efeito quando combinada com as células transfetadas com o pool siRalGPS2. Estes resultados são sugestivos de sinergia, indicando que a sinvastatina aumenta a toxicidade do silenciamento do pool siRalGPS2, mesmo sendo um efeito pequeno, sensibilizando as células para o silenciamento deste gene.

4.6. Avaliação morfológica, distribuição do ciclo celular e apoptose (fração Sub-G1) com recurso à combinação de sinvastatina, ausência de soro e silenciamento com siRNA nas linhas PC3 e A549

A linha PC3 foi tratada com sinvastatina a 1 μM em 3 tratamentos em conjunto com o silenciamento com siRNA. Na figura 10 é possível observar o fenótipo das células no final da experiência, antes de retirar as mesmas para os tubos nos quais foram marcadas para o ensaio de citometria. Assim, é possível perceber que apenas as células tratadas com siPLK1 tiveram uma redução no número de células e alterações na morfologia. No que respeita às restantes condições verificou-se uma ligeira diminuição

do número de células comparativamente ao grupo controlo, mas sem alterações significativas na morfologia.

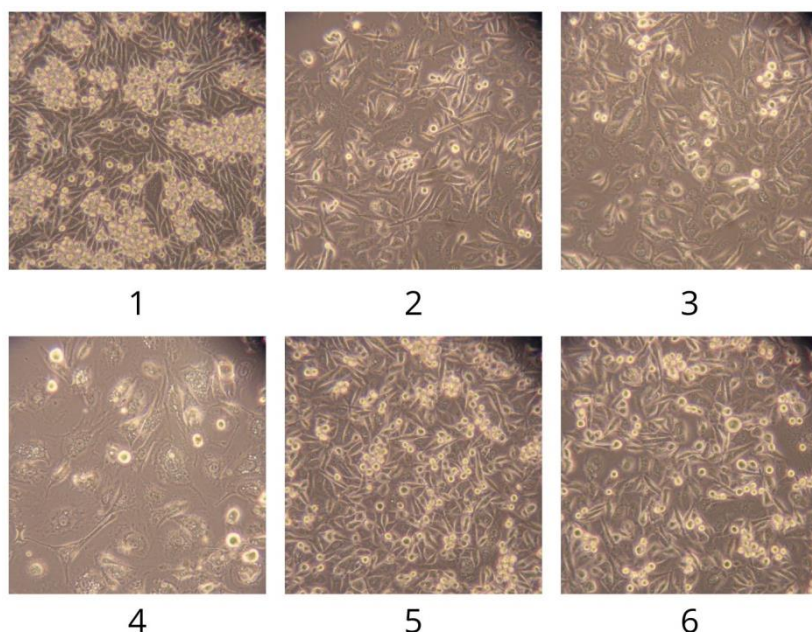


Figura 10 - Fenótipo da linha celular PC3 após ser transfetada com lipofectamina:siRNA na razão 1,5:15 e tratada com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos.

(1) - Controlo negativo; (2) - Células transfetadas com siLUC; (3) - Células transfetadas com pool siRalGPS2; (4) - Células transfetadas com siPLK1; (5) - Células tratadas com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos; (6) - Células transfetadas com pool siRalGPS2 em combinação com tratamento com sinvastatina 1 μ M 3 tratamentos.

A linha A549 foi tratada com sinvastatina a 1 μ M em 3 tratamentos em conjunto com o silenciamento com siRNA e com ausência de FBS durante 48 h. Na figura 11 é possível observar o fenótipo das células no final da experiência, antes de retirar as mesmas para os tubos nos quais foram marcadas para o ensaio de citometria. Desta forma, e por observação da imagem, é possível perceber que as células tratadas com siPLK1 tiveram uma redução no número de células e alterações na morfologia. Para além disso, as células mantidas em ausência de soro durante 48 h demonstraram ter alterações na morfologia e uma redução do número de células, o que é coincidente com o observado na análise de citometria de fluxo em que estas condições são as que apresentam maior percentagem de células apoptóticas. Nas restantes condições verifica-se apenas uma pequena diminuição do número de células comparativamente ao grupo controlo porém sem alterações morfológicas significativas.

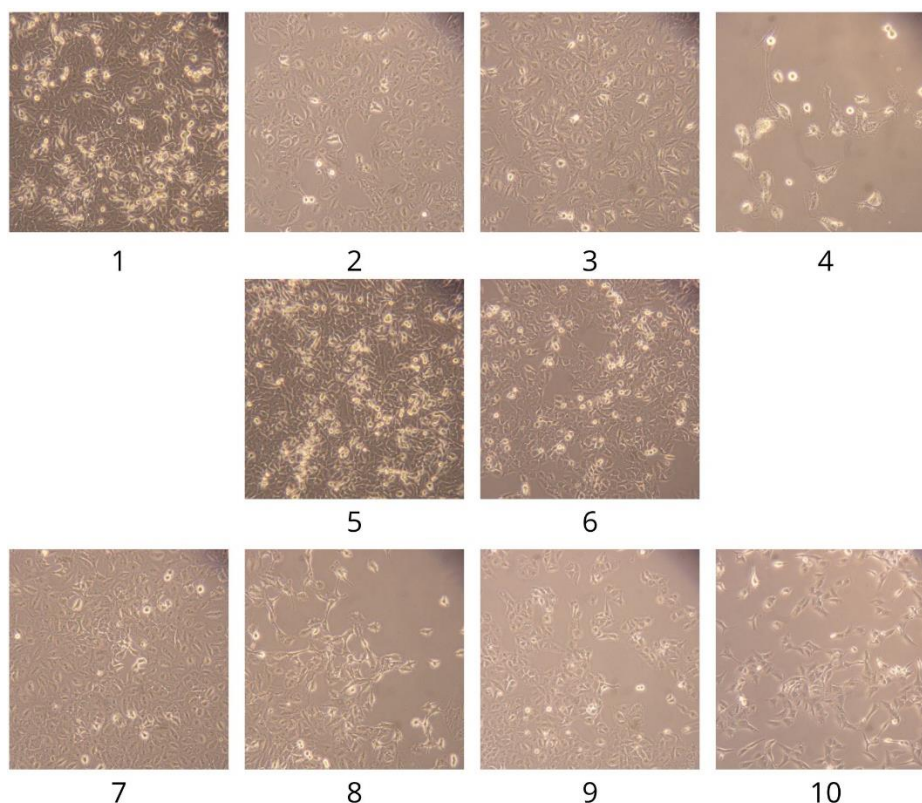


Figura 11 - Fenótipo da linha celular A549 após ser transfetada com a razão lipofectamina:siRNA 1:12 na ausência de soro durante 48 h e com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos.

(1) - Controlo negativo; (2) - Células transfetadas com siLUC; (3) - Células transfetadas com pool siRalGPS2; (4) - Células transfetadas com siPLK1; (5) - Células tratadas com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos; (6) - Células mantidas na ausência de soro durante 48 h; (7) - Células transfetadas com combinação de siLUC e sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos; (8) - Células transfetadas com pool siRalGPS2 em combinação com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos; (9) - Células transfetadas com siLUC em combinação com ausência de soro durante 48 h; (10) - Células transfetadas com pool siRalGPS2 em combinação com ausência de soro durante 48 h.

Com respeito aos resultados de distribuição do ciclo celular mostrados em seguida, devem ser tidas em conta algumas considerações na sua interpretação. Observou-se alguma variabilidade nos resultados devido à incerteza do modelo ao definir os picos correspondentes a cada fase do ciclo celular (os valores dos coeficientes de variação nem sempre se mantiveram abaixo de 5 tal como recomendado), muito devido à existência de ruído pela toxicidade dos tratamentos e, por fim, o facto de o número de repetições ser baixo.

No que respeita à linha celular PC3 (Figura 12) foi possível verificar que o siPLK1 apresentou diferenças significativas relativamente aos controlos de células não tratadas e ao siLUC na percentagem de células nas fases G1, G2/M e >G2 do ciclo celular

($p < 0.0001$) (Figura 12). Para além disso, o pool siRalGPS2 originou uma diminuição ligeira, mas significativa, no número de células em G1 quando comparado com o controlo de células não tratadas ($p = 0.0445$) e com o siLUC ($p = 0.0412$). Relativamente à combinação do pool siRalGPS2 com sinvastatina a $1 \mu\text{M}$ durante as últimas 48 h da experiência é importante referir que na fase S o número relativo de células aumentou quando comparado com o siLUC apresentando um valor de $p = 0.0429$ e na fase G1 o valor diminuiu quando comparado com o siLUC tendo a diferença um valor de $p = 0.074$. Ainda na fase G1 o pool siRalGPS2 mostrou ter resultados significativos quando comparado com o controlo com um valor de $p = 0.0080$.

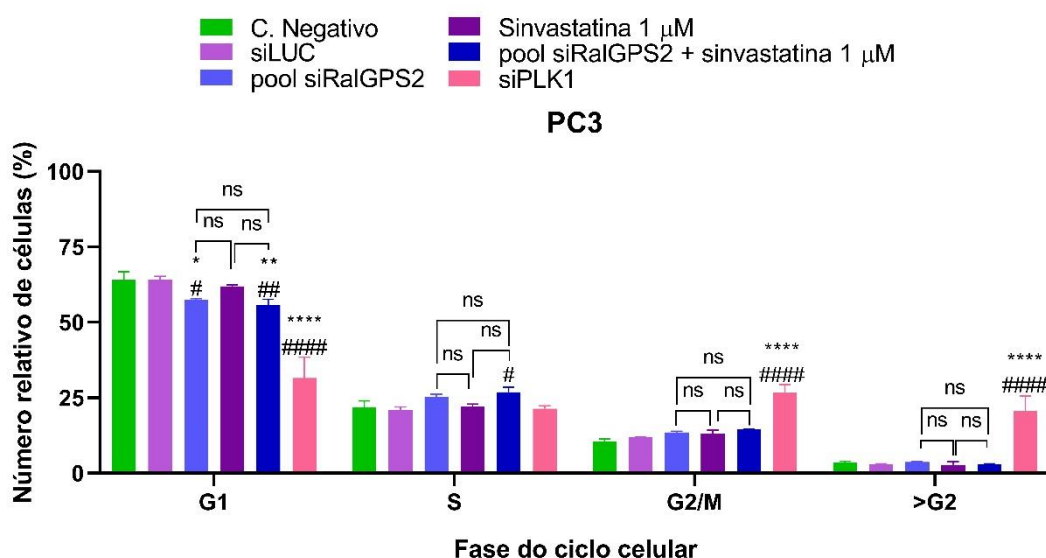


Figura 12 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha PC3 após tratar com sinvastatina $1 \mu\text{M}$, e silenciar com siRNA na razão 1,5:15.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* para comparações entre grupos e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e # quando comparados os grupos com o siLUC.

Por último é importante referir que em nenhuma das fases do ciclo celular houve diferenças significativas estatisticamente quando comparados os resultados de pool siRalGPS2 com o grupo tratado com sinvastatina $1 \mu\text{M}$ e com o grupo do pool siRalGPS2 em combinação com a solução de sinvastatina, bem como não se verificaram diferenças entre o grupo tratado com sinvastatina $1 \mu\text{M}$ e o grupo do pool siRalGPS2 em combinação com a sinvastatina.

Para a linha PC3 verificou-se que o pool siRalGPS2 provocou uma diminuição da fase G1 e um aumento da fase S e o tratamento com sinvastatina $1 \mu\text{M}$ durante 48 h não teve

efeito no ciclo celular. Relativamente ao silenciamento com siPLK1 demonstrou haver hiperdiploidia e paragem na fase G₂/M, tal como esperado.

Relativamente à linha celular A549 verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas nas diferentes fases do ciclo celular quando comparada cada condição com o grupo controlo e com o grupo transfetado com siLUC.

Assim, em G₁ quando comparados com o grupo controlo as condições siLUC, pool siRalGPS2 com sinvastatina 1 µM, siLUC sem soro, pool siRalGPS2 sem soro e siPLK1 apresentam um $p < 0.0001$. Para além disso, o pool siRalGPS2 apresentou um $p = 0.0002$, o grupo com sinvastatina 1 µM um $p = 0.4773$ e por último o a condição siLUC com sinvastatina 1 µM um $p = 0.0001$. Ainda na mesma fase do ciclo celular, e comparando todos os grupos com o siLUC verificou-se que os grupos siLUC sem soro, pool siRalGPS2 sem soro e siPLK1 apresentam um $p < 0.0001$. Além disso, o grupo sinvastatina 1 µM demonstrou ter significado estatístico com um $p = 0.0095$.

No que respeita à fase S do ciclo celular os grupos siLUC sem soro, pool siRalGPS2 sem soro e siPLK1 apresentam um $p < 0.0001$ quando comparados com o siLUC. Para além disso, em comparação com o grupo de controlo, o grupo siPLK1 apresenta um $p < 0.0001$, o grupo siLUC tem um $p = 0.0009$, o pool siRalGPS2 com sinvastatina 1 µM um $p = 0.0132$, o pool siRalGPS2 tinha um $p = 0.0072$, o pool sem soro apresenta um $p = 0.0001$ e o grupo tratado com sinvastatina 1 µM tem um $p = 0.0487$. Por último o grupo siLUC com sinvastatina 1 µM apresenta significado estatístico com um $p = 0.0003$ e o grupo siLUC sem soro tem um $p = 0.0005$.

Na fase G₂/M quando se procedeu à comparação de todos os grupos com o controlo verificou-se que havia significado estatístico para as condições siLUC sem soro, pool siRalGPS2 sem soro e siPLK1. Os mesmos grupos demonstraram ter significado estatístico quando comparados com o controlo de transfeção siLUC. Na fase >G₂ apenas o grupo siPLK1 apresenta significado estatístico quando comparado com os grupos controlo com siLUC.

Quanto aos resultados obtidos na linha A549 verificou-se que em nenhuma das fases do ciclo celular houve diferenças significativas quando se compararam os grupos siLUC sem soro com pool siRalGPS2 sem soro (Figura 13B). Para além disso, entre os grupos pool siRalGPS2 com sinvastatina 1 µM, siLUC com sinvastatina 1 µM e sinvastatina 1 µM não se verificam diferenças estatisticamente significativas para as fases S, G₂/M e >G₂ porém na fase G₁ entre o grupo tratado com sinvastatina 1 µM e o grupo pool

siRalGPS2 com sinvastatina 1 μ M houve significado estatístico com um $p= 0.0401$ (Figura 13A). No que respeita à comparação feita entre o grupo pool siRalGPS2 e pool siRalGPS2 sem soro verificou-se a existência de resultados significativos na fase G1 ($p<0.0001$), S ($p<0.0001$) e G2/M ($p=0.0003$) não sendo significativa para $>G2$.

É de referir que na linha A549 o silenciamento com siPLK1 demonstra ter o efeito esperado uma vez que para o crescimento celular na fase G2/M, ou seja, as células não conseguem completar a mitose. Por outro lado, siLUC e pool siRalGPS2 demonstraram não ter efeito na mitose, porém houve uma ligeira diminuição da fase G1 e um aumento da fase S. Além disso, a sinvastatina na concentração 1 μ M provocou um aumento da fase S.

Apesar de não constar do gráfico da linha A549 a condição sem soro 48 h (uma vez que o ajuste do modelo de análise no programa *FlowJo* não se mostrou confiável devido à dificuldade do mesmo em ajustar o ciclo celular nesta condição) a paragem da proliferação celular em G1 das condições siLUC sem soro e pool siRalGPS2 sem soro deve-se à ausência de soro e não à combinação de ausência de soro com o silenciamento. Para além disso, verificou-se que os grupos com ausência de soro tiveram um aumento da fase G1 (ou seja, paragem na proliferação celular) e uma diminuição das fases S e G2/M.

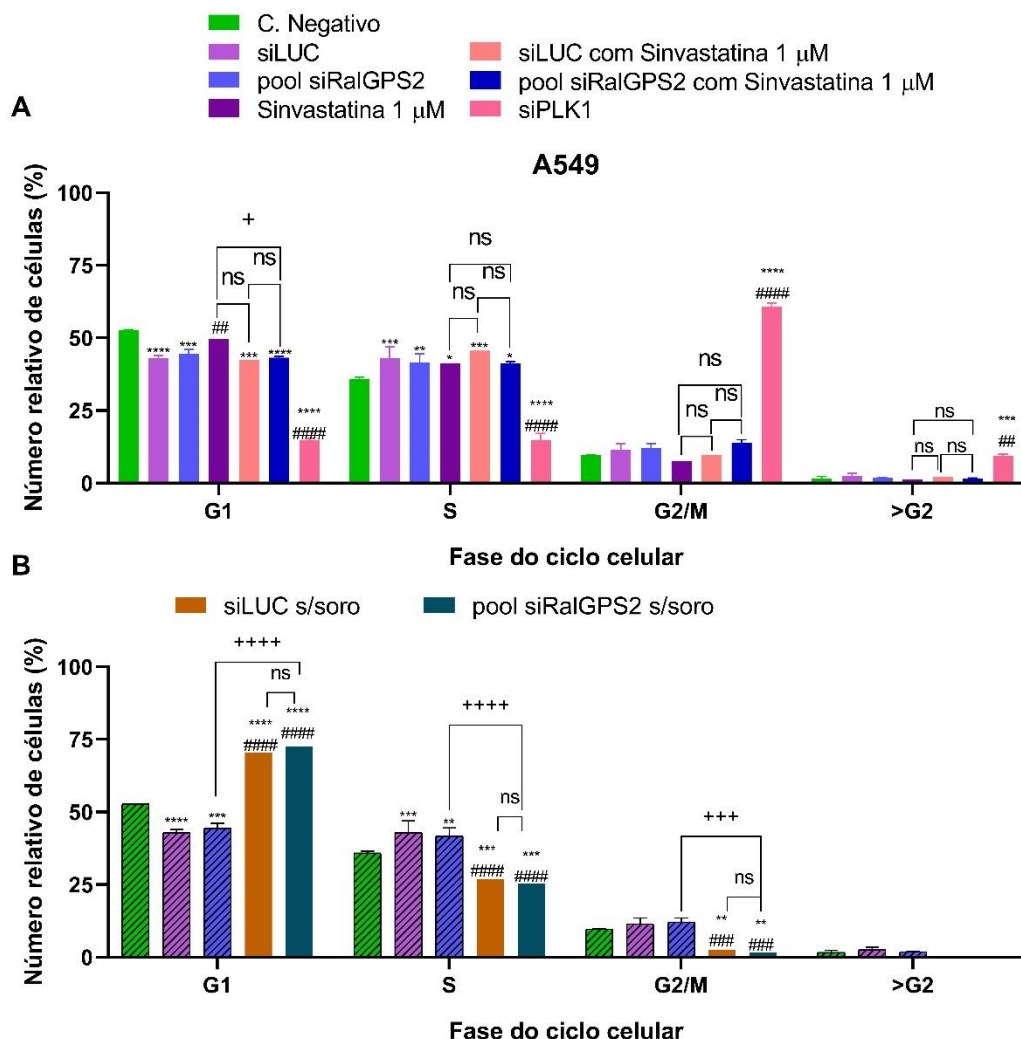


Figura 13 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha A549 após tratar com simvastatina 1 μ M, manter na ausência de soro durante 48 h e silenciar com siRNA na razão 1:12.

A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo, # quando comparados os grupos com o siLUC e + para comparações entre grupos. Os grupos de controlo, siLUC e pool siRalGPS2 que estão presentes nos dois gráficos são comuns a ambos uma vez que se trata da mesma experiência. (A) - A linha A549 foi transfetada e tratada em combinação simvastatina 1 μ M em três tratamentos. (B) - A linha A549 foi transfetada na razão 1:12 em combinação com ausência de soro (n=1) durante 48 h.

Relativamente à percentagem de células apoptóticas (ou seja, a percentagem de células que se encontra em Sub-G1) na linha PC3 (Figura 14) verificou-se que as células transfetadas com siPLK1 apresentavam resultados significativos estatisticamente quando comparadas com as do grupo controlo ($p=0.0065$) e com as transfetadas com o siLUC ($p=0.0094$).

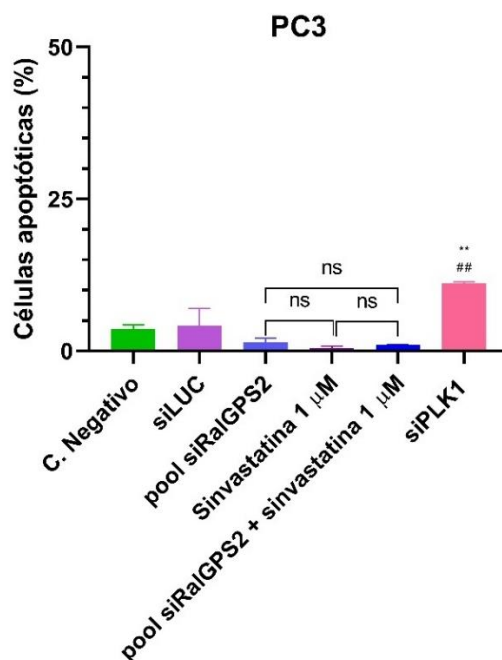


Figura 14 - Análise de Sub-G1 na linha PC3 com silenciamento na razão 1,5:15 em combinação com sinvastatina 1 µM. A linha foi tratada com sinvastatina 1 µM em 3 tratamentos.

A análise estatística realizada foi *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e # quando comparados os grupos com o siLUC.

No que diz respeito à percentagem de células que se encontra em Sub-G1 na linha celular A549 (Figura 15) verifica-se um aumento da percentagem de células apoptóticas nos grupos siLUC em combinação com ausência de soro durante 48 h e pool siRalGPS2 com ausência de FBS 48 h que não se revelou significativo quando comparados os grupos entre si.

Em relação à percentagem de células apoptóticas para a linha A549 verificou-se que quando comparados os grupos com o grupo controlo havia diferenças significativas para as condições siLUC sem soro ($p=0.0053$), pool siRalGPS2 sem soro ($p=0.0028$) e siPLK1 ($p=0.0005$). Para além disso, quando comparados os mesmos grupos com o siLUC apresentam valores significativos estatisticamente com $p=0.0059$ para siLUC sem soro, $p=0.0030$ para o pool siRalGPS2 sem soro e $p=0.0005$ para siPLK1.

Relativamente à comparação entre o grupo pool siRalGPS2 e o grupo pool siRalGPS2 sem soro há uma diferença significativa com um $p=0.0030$ e verificou-se que na fase Sub-G1 do ciclo celular não houve diferenças significativas quando se compararam os grupos siLUC sem soro com pool siRalGPS2 sem soro. Além disso, entre os grupos pool

siRalGPS2 com sinvastatina 1 μ M, siLUC com sinvastatina 1 μ M e sinvastatina 1 μ M não se verificam diferenças estatisticamente significativas para a fase Sub-G1.

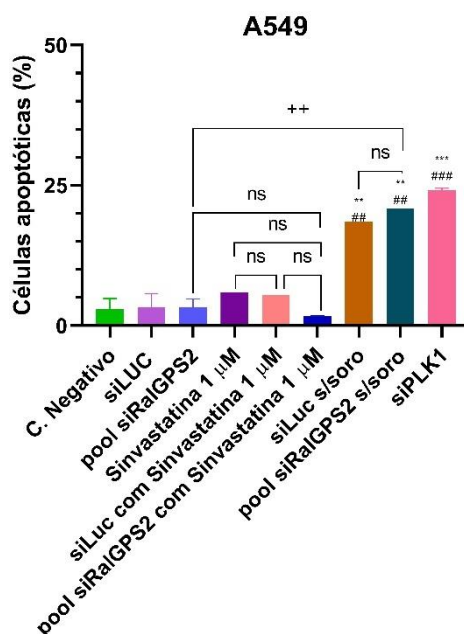


Figura 15 - Análise de Sub-G1 na linha A549 com silenciamento na razão 1:12 em combinação com sinvastatina 1 μ M e ausência de soro.

A linha foi tratada com sinvastatina 1 μ M em 3 tratamentos e mantida na ausência de soro durante 48 h. A análise estatística realizada foi *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo, # quando comparados os grupos com o siLUC e + para comparações entre grupos.

Para a linha A549 a ausência de soro durante 48 h, apesar de não ser mostrada no gráfico devido às falhas existentes no método de quantificação, demonstrou ter elevada toxicidade e provocar elevada apoptose (Apêndice A1).

4.7. Expressão, e correlação da expressão, dos genes YAP1, RalGPS2 e WWTR1 em adenocarcinoma da próstata e do pulmão e em tumores neuroendócrinos da próstata

Para explorar o significado clínico da expressão de RALGPS2 em cancro da próstata, foi usada a base de dados de acesso livre *OncoDB* [53]. Analisando os níveis de expressão dos genes RALGPS2, YAP1 e WWTR1 em tecido tumoral de adenocarcinoma da próstata e em tecido normal (indivíduos saudáveis) verificou-se que os níveis de expressão de RALGPS2 em tumores não são diferentes dos controlos (Figura 16A).

Contudo, há diminuição nos níveis de expressão de YAP1 e de WWTR1 nos tumores de adenocarcinoma da próstata comparativamente a indivíduos saudáveis (com $p=1,5 \times 10^{-10}$ e $p=6,5 \times 10^{-7}$, respetivamente, Figura 16B e 16C).

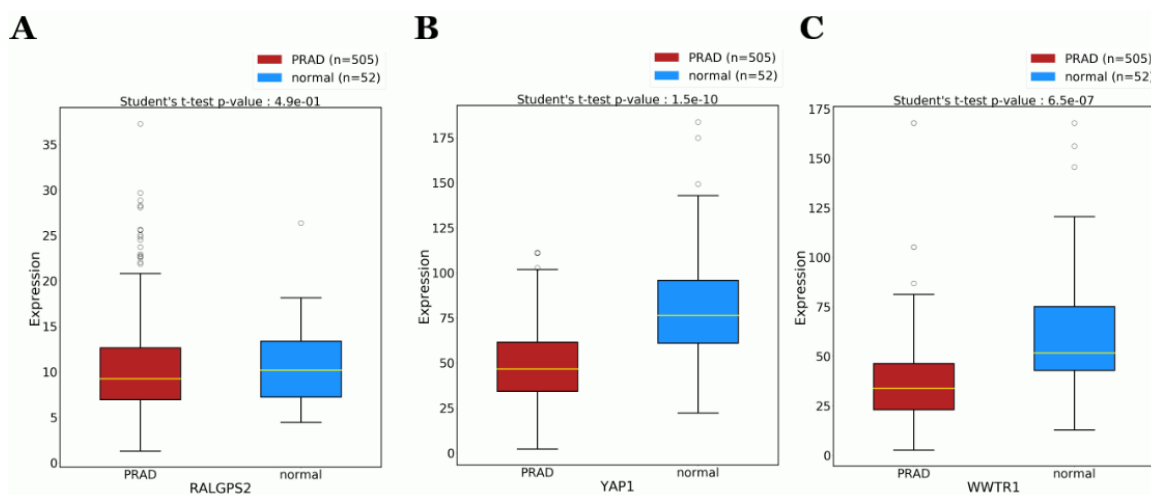


Figura 16 - *Boxplot* dos níveis de expressão para os genes RalGPS2 (A), YAP1 (B) e WWTR1 (C) em adenocarcinoma da próstata (PRAD).

Os dados e a análise foram efetuados com a base de dados *OncoDB*. A amostra disponível incluiu 505 pacientes e 52 controlos.

Para comparar com o observado em cancro da próstata, analisaram-se também os dados disponíveis na mesma base de dados para adenocarcinoma do pulmão. No que respeita ao gene RALGPS2 foi possível verificar que há uma maior expressão em adenocarcinoma do pulmão comparativamente ao tecido normal ($p=8,6 \times 10^{-60}$, Figura 17A). Neste caso, não se observou diferença significativa nos níveis de expressão de YAP1 em doentes com adenocarcinoma do pulmão comparativamente aos valores de expressão do mesmo gene em indivíduos saudáveis (Figura 17B). Por outro lado, para o gene WWTR1 verificou-se que os níveis de expressão são mais elevados em tecido normal do que em tecido tumoral ($p=1,3 \times 10^{-15}$, Figura 17C).

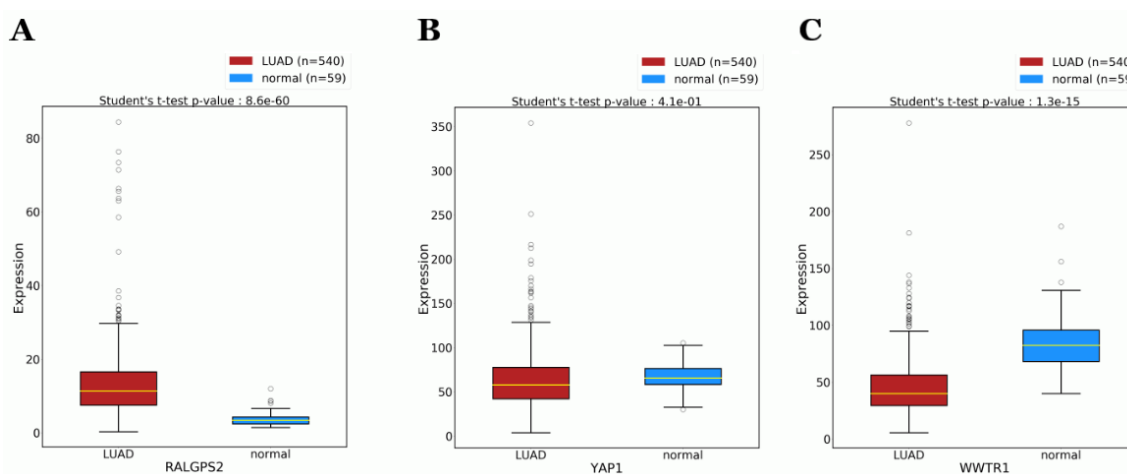


Figura 17 - Boxplot dos níveis de expressão para os genes RalGPS2, YAP1 e WWTR1 em adenocarcinoma do pulmão (LUAD).

Os dados foram retirados da base de dados *OncoDB* [53] e a análise foi feita para um n=540 pacientes e um n=59 controles.

De forma surpreendente, quando se foi analisar a correlação dos níveis de expressão, foi evidente uma correlação positiva entre YAP1 e RALGPS2 (Figura 18) em adenocarcinoma da próstata (para um grupo de amostras de 505 pacientes) com valores de R superiores a 0,5 (neste caso $R=0,5623$), e com relevância estatística.

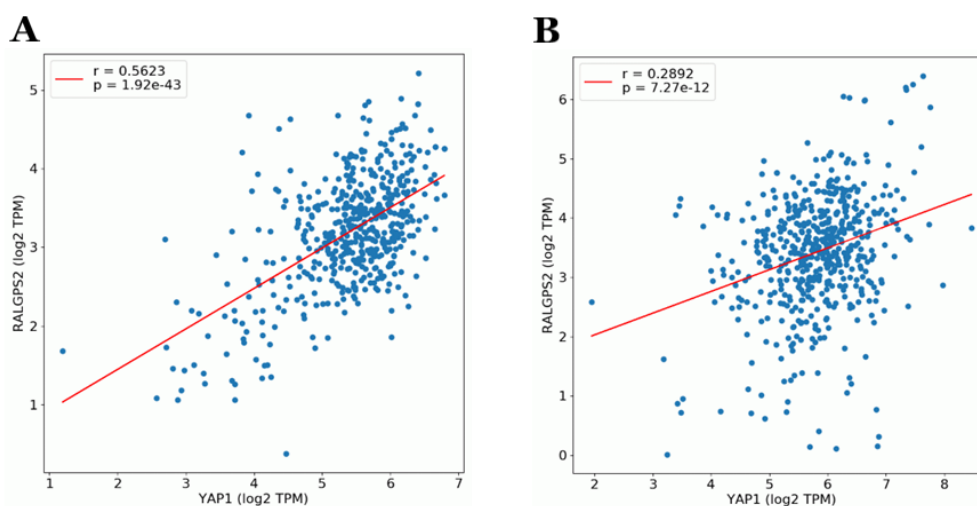


Figura 18 - Correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinomas da próstata (A) e do pulmão (B) com dados da base *OncoDB*[53].

(A) - O grupo de amostras incluía 505 pacientes e o $R=0,5623$. (B) - O valor de $R=0,2892$ diz respeito à análise de 540 pacientes.

Contudo, foi possível verificar que, contrariamente ao que acontece em adenocarcinoma da próstata, não existe correlação relevante entre os níveis de expressão dos dois genes em análise (YAP1 e RALGPS2) em adenocarcinoma do pulmão (considerando um grupo de amostragem de 540 pacientes) pois os valores de R são inferiores a 0,3 ($R=0,2892$).

De facto, a correlação de expressão entre os genes YAP1 e RALGPS2 adquiridos no *OncoDB* [53] foi elevada apenas em adenocarcinoma da próstata quando comparada com correlações para os mesmos genes feitas para outros tipos de cancro, não só o do pulmão (já anteriormente referido), mas também outros tipos de cancro mencionados de forma suplementar em apêndice (Apêndice B1).

Para além disso, estudou-se também a correlação existente entre os genes WWTR1 e RALGPS2 (Figura 19) em adenocarcinoma da próstata e do pulmão. Tendo por base os resultados obtidos verificou-se uma correlação mais fraca entre os genes WWTR1 e RALGPS2 em adenocarcinoma da próstata ($R=0,4249$) do que entre os genes YAP1 e RALGPS2. Para além disso, verificou-se que também não existe correlação entre os genes WWTR1 e RALGPS2 em adenocarcinoma do pulmão ($R=0,2087$) tal como acontece entre os genes YAP1 e RALGPS2. A correlação da expressão entre WWTR1 e RALGPS2 não foi, por isso, posteriormente explorada por nós utilizando bancos de dados diferentes.

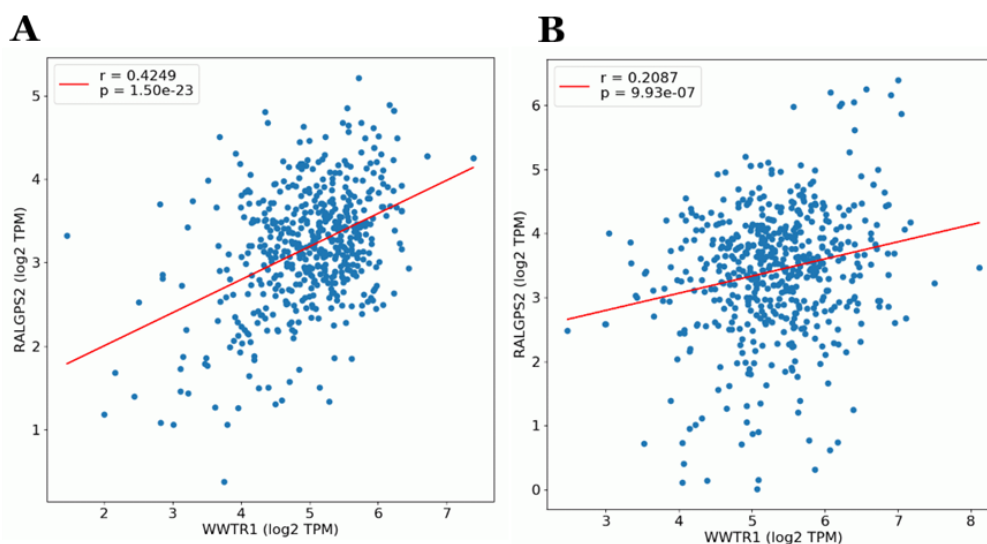


Figura 19 - Correlação de expressão dos genes WWTR1 e RALGPS2 em adenocarcinoma da próstata (A) e em adenocarcinoma do pulmão (B).

Os gráficos foram obtidos com o banco de dados *OncoDB* [53] e representam $n=505$ casos com $R=0,4249$ e $n=540$ casos com $R=0,2087$, respetivamente.

Tendo em conta a descoberta da forte correlação existente entre a expressão de YAP1 e RALGPS2 procedeu-se à validação da mesma analisando a sua expressão em bancos de dados diferentes dos utilizados pelo *OncoDB*. A análise foi efetuada pela Doutora Michele Claire Breton. Os níveis de expressão de YAP1 (Figura 20A) são mais altos em tumores metastáticos do que em tumores primários e em tecido normal, havendo uma maior variabilidade nos níveis de expressão destes dois últimos grupos.

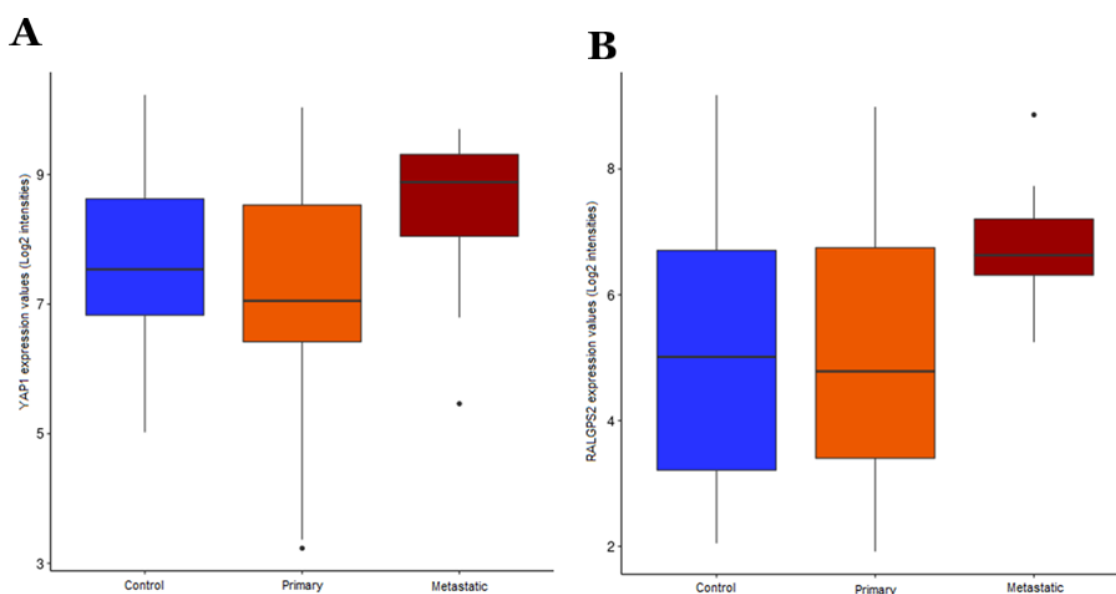


Figura 20 - *Boxplot* dos níveis de expressão de YAP1 (A) e RALGPS2 (B) em adenocarcinomas da próstata. O grupo amostral é formado por tumores primários (n=1327), tumores metastáticos (n=25) e tecido normal (n=549). Os dados estatísticos obtidos para este gráfico podem ser encontrados no apêndice B5.

No caso do gene RALGPS2 (Figura 20B) os níveis de expressão mais variáveis apresentam-se igualmente em tecido normal e em tumores primários, sendo que os tumores metastáticos apresentam elevados níveis de expressão de RALGPS2, mas com valores pouco variáveis.

Posteriormente avaliou-se a normalidade da distribuição dos dados (Apêndice B6) e realizou-se uma correlação de *Spearman*. Por último desenhou-se um gráfico de correlação no qual se separaram os grupos de amostra através de um código de cores. Verificou-se que existe uma correlação positiva forte entre a expressão de YAP1 e RalGPS2 (Figura 21) ($R=0,81$, com um $p<2,2\times 10^{-16}$). Para além disso, é ainda visível que no tecido prostático tumoral ou não tumoral há uma correlação entre os níveis de expressão de YAP1 e RalGPS2 e que a correlação menos expressiva, com declive quase horizontal, se verifica em tumores metastáticos, provavelmente por os tumores

apresentarem uma expressão mais homoganeamente elevada destes genes, sendo que os tumores primários e o tecido normal apresentam correlação semelhante entre si. Isto sugere que existirá uma associação na regulação fisiológica ou papel fisiológico destes genes na próstata.

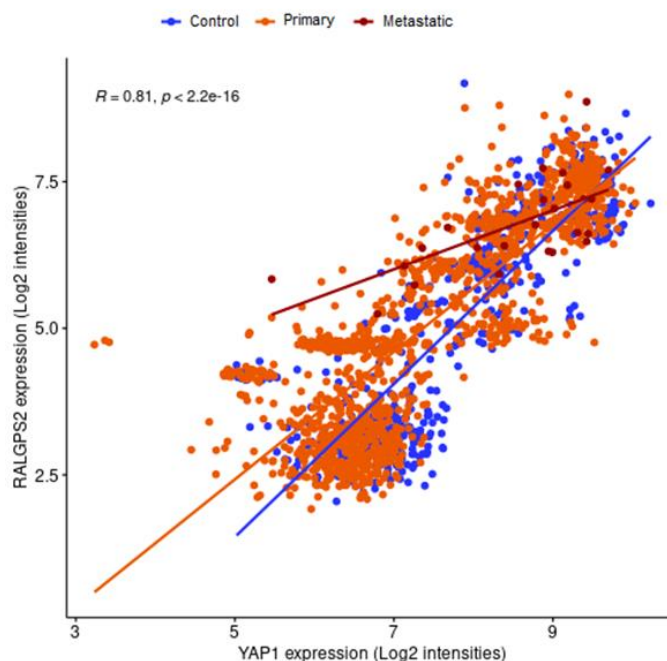


Figura 21 - Correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinoma da próstata.

A análise apresenta um $R=0,81$ que indica a existência de uma correlação muito forte entre os genes YAP1 e RALGPS2.

Desta forma, e tendo em conta a totalidade de resultados anteriormente exposta, verifica-se que existe uma diferença entre adenocarcinoma do pulmão e adenocarcinoma da próstata quer na tendência de expressão de RALGPS2 quer no valor prognóstico de expressão do mesmo gene.

Foi observado anteriormente por Cheng *et al.* que a expressão de YAP1 estava aumentada em adenocarcinomas da próstata avançados, porém, estava ausente em adenocarcinomas em estadios iniciais [54]. Para além disso, os mesmos autores verificaram a perda ou diminuição de YAP1 em tumores neuroendócrinos da próstata, sem alterações nos níveis de WWTR1. Isto fez-nos procurar analisar especificamente este subtipo de tumores da próstata.

De facto, encontraram-se níveis de expressão de YAP1 mais baixos em tumores neuroendócrinos da próstata (pool de diferentes dados selecionados de acordo com o

descrito no apêndice B3) do que em tecido normal (Figura 22A), mas com uma assimetria positiva, tal como acontece em tecido normal. Quanto à expressão do gene RALGPS2 em tumores neuroendócrinos da próstata, observaram-se valores negativamente assimétricos, mas uma mediana semelhante quando comparados os tumores metastáticos ao tecido normal (Figura 22B). No que respeita aos tumores neuroendócrinos metastáticos, os dados não são representativos (n=2), mas curiosamente os níveis de expressão de RALGPS2 foram nestes 2 casos muito elevados quando comparados com a mediana de tumores neuroendócrinos e com tecido normal.

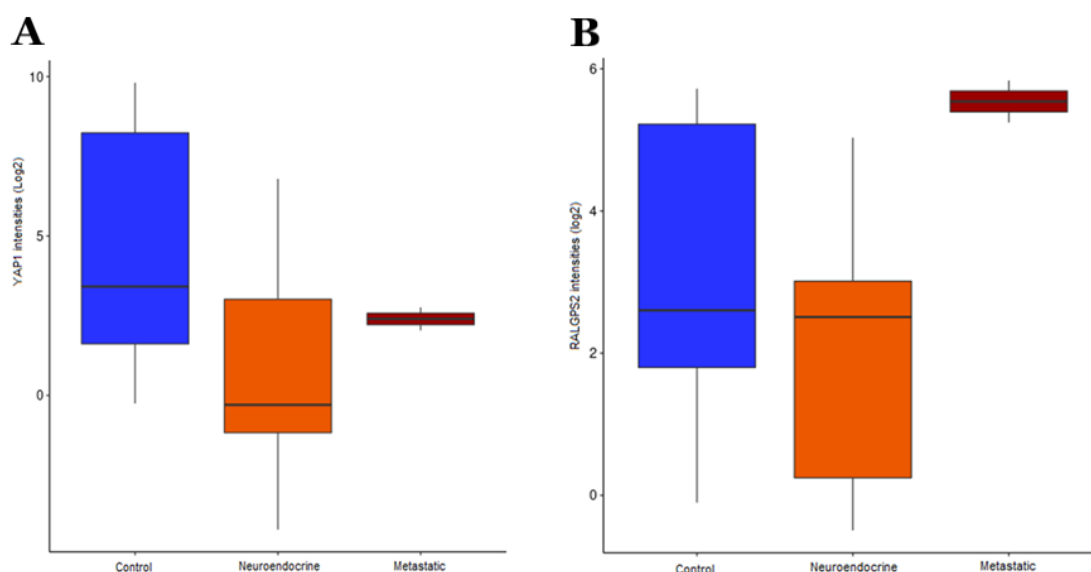


Figura 22 – *Boxplot* dos níveis de expressão de YAP1 (A) e RALGPS2 (B) em tumores da próstata neuroendócrinos.

O grupo amostral é formado por tumores neuroendócrinos (n=22), tumores metastáticos neuroendócrinos (n=2) e em tecido normal (n=21). Os dados estatísticos deste gráfico podem ser encontrados no apêndice B5.

Posteriormente a fazer os *boxplots* para analisar os níveis de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 definiu-se como objetivo avaliar a correlação existente entre os genes em tumores neuroendócrinos da próstata. Para tal efetuou-se uma análise de correlação de *Spearman* que evidenciou a existência de uma correlação positiva forte entre a expressão de YAP1 e RalGPS2 (Figura 23) ($R = 0,73$; $p = 9,6 \times 10^{-8}$), que, à semelhança dos dados de adenocarcinoma da próstata, parece evidente tanto nas amostras tumorais como no controlo. De realçar que os casos de menor expressão de YAP1 e RALGPS2 coincidem, e são todos de casos de amostras tumorais. Assim, é perceptível que na ausência de YAP1 a expressão do gene RALGPS2 também é nula ou muito baixa e que tumores que exprimem YAP1 têm níveis de expressão significativos de RALGPS2.

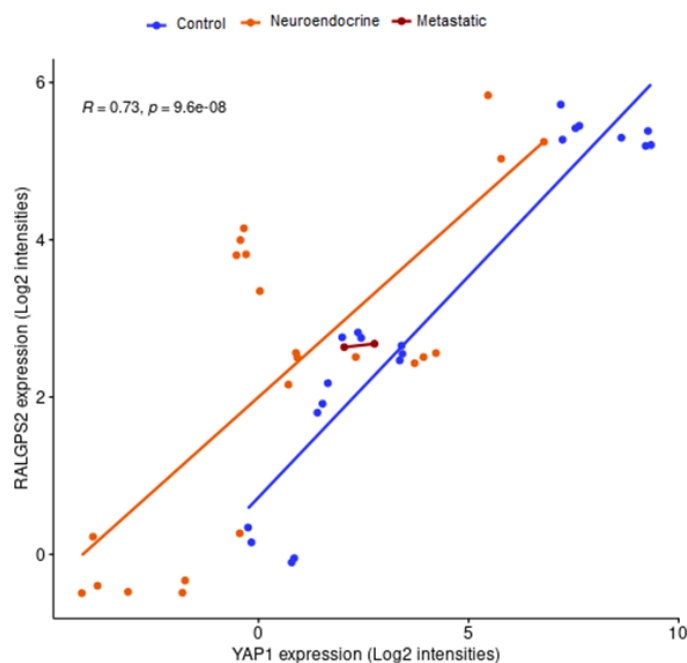


Figura 23 -Correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em tumores da próstata neuroendócrinos.

Assim, é possível concluir que, à semelhança do que acontece em adenocarcinomas da próstata, e próstata de indivíduos saudáveis, há uma correlação muito forte entre a expressão dos genes YAP1 e RALGPS2 também em tumores neuroendócrinos, com a particularidade de que quando a expressão do gene YAP1 é baixa ou nula em tumores neuroendócrinos o mesmo acontece para o gene RALGPS2.

4.8. Análise de sobrevivência para adenocarcinoma da próstata e do pulmão com dados do *OncoDB*

Recentemente, foi demonstrado que um aumento da expressão diferencial de RalGPS2 em adenocarcinoma do pulmão é um fator indicativo de mau prognóstico [3]. Por análise direta dos dados apresentados na base de dados aberta *OncoDB* [53] foi possível fazer gráficos de análise de sobrevivência (*Kaplan-Meier*) tendo em conta o gene de interesse em causa (no caso foram considerados os genes RALGPS2 e YAP1) e o tipo de cancro que se pretendia analisar (tendo-se selecionado neste caso o adenocarcinoma da próstata (Figura 24A). Como termo de comparação foi utilizado o adenocarcinoma do pulmão (Figura 24B).

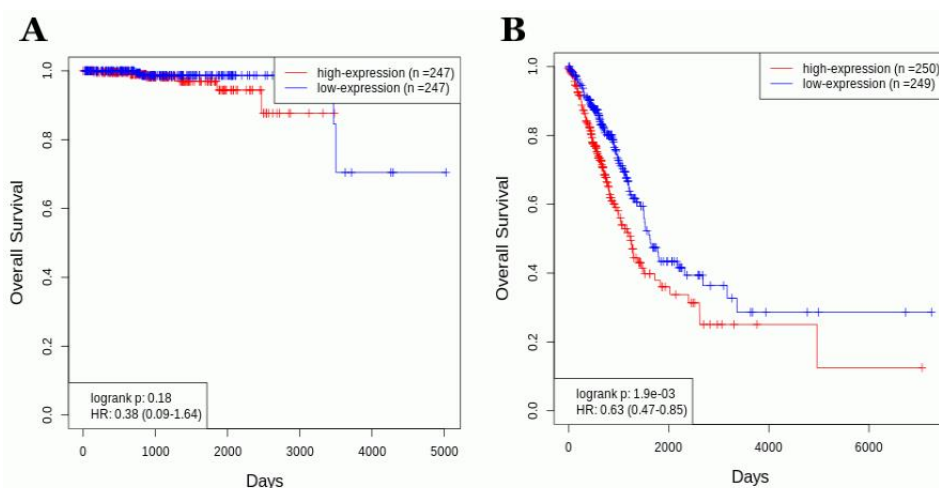


Figura 24 - Análise de sobrevivência tendo em conta a expressão do gene RalGPS2 em adenocarcinomas da próstata (A) e do pulmão (B) com os dados da base de dados *OncoDB* [53].

Uma vez que o *logrank p* em adenocarcinoma do pulmão é $1,9 \times 10^{-3}$ considera-se que há uma diferença significativa estatisticamente, tal como já tinha sido demonstrado por Tan *et al.* [3] porém o mesmo não acontece em adenocarcinoma da próstata. Talvez possa estar relacionado com o facto de a mortalidade deste tipo de cancro ser muito menor, e ser mais difícil obter significado estatístico numa diferença que é pequena.

Por outro lado, a análise de sobrevivência em função dos níveis de expressão do gene YAP1 em adenocarcinoma da próstata (Figura 25A) e do pulmão (Figura 25B) demonstrou não terem valor prognóstico para sobrevivência dos pacientes.

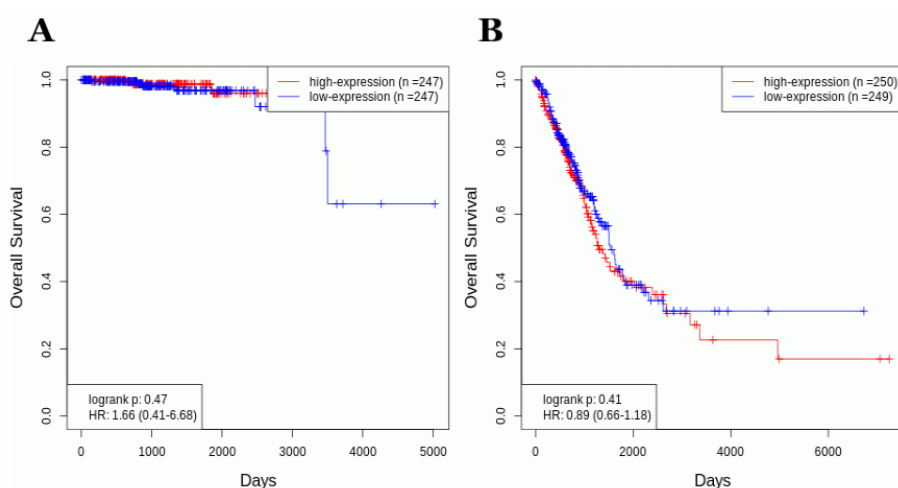


Figura 25 - Análise de sobrevivência tendo em conta a expressão do gene YAP1 em adenocarcinoma da próstata (A) e do pulmão (B) com os dados da base de dados *OncoDB* [53].

A mesma ausência de valor prognóstico foi observada para o gene WWTR1 em ambos os tipos de tumor (Figura 26A e 26B).

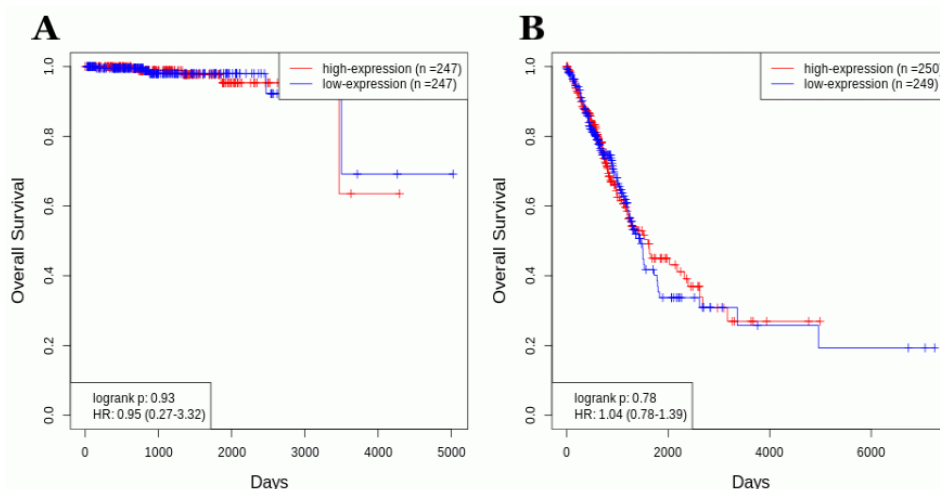


Figura 26 - Análise de sobrevivência tendo em conta a expressão do gene WWTR1 em adenocarcinoma da próstata (A) e do pulmão (B) com os dados da base de dados *OncoDB* [53].

4.9. Análise de um *heatmap* com valores de expressão génica

Tendo em conta a lista de genes que se relacionam com o gene YAP1 (presente na secção “Apêndice” na secção B2) e os genes que intervêm na via *Hippo* construiu-se um *heatmap* que relaciona a média dos valores de expressão dos genes que compõem a via e que se encontram presentes nos 15 bancos de dados com valores de *RNAseq* em adenocarcinoma da próstata que se encontram depositados no PCaDB [55]. Os valores apresentados foram calculados tendo em conta as médias de expressão dos indivíduos cujo *RNAseq* do material biológico foi utilizado e os *clusters* na lateral esquerda foram executados tendo em conta a semelhança de valores de expressão encontrados nos 15 bancos para o mesmo gene.

Por análise do *heatmap* (Figura 27) é possível verificar que a maioria dos genes apresenta valores de expressão próximos dos valores expressos por células saudáveis (daí apresentarem cor branca), porém identificam-se dois grupos de genes cuja expressão é inferior à das células saudáveis, representados a azul ou superior à das células saudáveis, representados a vermelho.

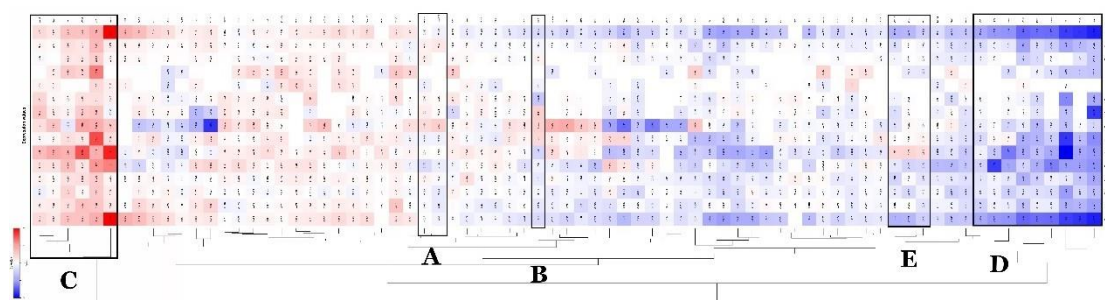


Figura 27 - Heatmap com valores de expressão génica.

As zonas assinaladas no heatmap encontram-se ampliadas no apêndice B7.

Verificou-se que RalGPS2 tem valores médios de expressão diferencial próximos do gene YWHAZ, que é uma 14-3-3, ou seja, é uma proteína que medeia a transdução de sinal por ligação a proteínas contendo fosfoserina, (zona A) e ambos se relacionam com o gene NF2 (também conhecido como MER que faz parte da via *Hippo*). Os valores de expressão de RalGPS2 pouco variáveis em relação ao controlo parecem confirmar os dados obtidos no *boxplot* de expressão de RalGPS2 em adenocarcinomas da próstata, no qual o valor de expressão era muito próximo ao valor de expressão do grupo controlo.

Para além disso, o gene CCN2 (gene anti apoptótico), habitualmente usado como marcador da ativação dos cofatores YAP/TAZ, apresenta valores de expressão elevados (vermelho) apenas em três bancos, PcaDB8, PcaDB9 e PcaDB10, (zona B) contrariamente aos valores de expressão apresentados nos restantes bancos em que o mesmo gene apresenta valores negativos (azul).

É de referir ainda que os genes que apresentam valores médios de expressão mais elevados na generalidade dos bancos são LGL2 e DLG3, que são inibidores da via *Hippo*, LEF1 (uma TCF que provem da via de sinalização WNT), WWC1 (também conhecido como KIBRA), que faz parte da via *Hippo*, e MYC e BIRC5, que são genes anti-apoptóticos, ou seja, pró-proliferação (zona C).

Além disso, os genes que apresentam valores médios de expressão mais baixos na generalidade dos bancos são SMAD3 e TCF7L1 (que são fatores de transcrição), YAP1 e FRMD6 (que fazem parte da via *Hippo*), NKD1, SOX2, CCND2, ID1 e SNAI2 (pertencente à família dos SLUG), que são genes anti apoptóticos, e AJUBA, um gene inibidor da via *Hippo* (zona D). Assim, também o facto de YAP1 apresentar valores de expressão médios mais baixos é concordante com os resultados anteriormente obtidos no *boxplot*.

É ainda de destacar os valores de expressão elevados, contrariamente aos restantes, dos genes WWTR1, TP73 e TEAD2 no banco de dados PcaDB7 (zona E). Verificou-se também a existência de uma semelhança muito elevada no comportamento da maioria dos genes entre o banco de dados PcaDB6 e TCGA-PRAD que não soubemos explicar.

Por último, referir ainda a variabilidade que existe nos valores médios de expressão de diversos genes no banco PcaDB9 uma vez que genes com expressão inferior à das células saudáveis apresentam expressão elevada neste banco e o inverso dos restantes.

No entanto, e apesar do exposto, não foi possível obter conclusões exatas da análise feita uma vez que se trata de uma comparação de valores de expressão médios entre todos os bancos. Assim, no futuro seria necessário fazer uma avaliação da expressão dos genes comparando as amostras em cada banco isoladamente para garantir a homogeneidade da análise.

Capítulo 5

Conclusão

Este estudo teve como objetivo geral explorar a existência de uma possível interação entre RalGPS2 e os cofatores de transcrição YAP/TAZ em cancro da próstata e do pulmão.

Efetuiu-se, portanto, o silenciamento de RalGPS2 com recurso a um pool de siRNA nas linhas PC3, DU145 e A549. Este demonstrou ter efeito na diminuição do crescimento celular na linha PC3, mas com uma diferença pequena em relação ao siRNA usado como controlo negativo (siLUC), porém o silenciamento não teve efeitos tão evidentes nas linhas DU145 e A549 quando comparados os resultados com o siLUC (controlo negativo da transfeção). Contudo, a sequência controlo usada não foi o controlo correto de transfeção para o pool de siRNA usado contra RalGPS2. Também parece ter elevada toxicidade inespecífica, mesmo com uma baixa proporção de agente de transfeção e concentrações baixas (10 e 15 nM de siRNA), o que pode ter mascarado os resultados. Isto mesmo deveria ser confirmado no futuro com sequência controlo alternativas, incluindo um pool de siRNA controlo com modificações químicas equivalentes às presentes no pool siRalGPS2.

Além disso, verificou-se que o crescimento das células na ausência de soro fetal bovino em combinação com o tratamento por siRNA diminui nas células PC3, DU145 e A549 (sugerindo um efeito aditivo da combinação) porém esta combinação não demonstrou o efeito específico para o silenciamento de RalGPS2 nem o efeito sinérgico esperado em nenhuma das linhas.

Avaliou-se também o comportamento das células na combinação de silenciamento e tratamentos com sinvastatina e verificou-se que a combinação dos dois tratamentos na linha DU145 não apresentava diminuição do crescimento acentuada quando comparada com o silenciamento por si só. Tal como aconteceu para a linha anterior, as PC3 também não demonstraram a ocorrência de efeitos sinérgicos havendo evidências apenas de um efeito inespecífico aditivo da combinação. Contrariamente às linhas de cancro da próstata a linha de cancro do pulmão, A549, demonstrou ter um pequeno efeito que aparenta ser sinérgico, o que é indicativo de que a sinvastatina sensibiliza as células para o silenciamento do gene RalGPS2.

Relativamente à distribuição do ciclo celular para a linha DU145 a combinação da ausência de soro com tratamentos de sinvastatina provocaram aumento do número de células na fase G1 e diminuição em S. Relativamente à indução de apoptose verificou-se um efeito sinérgico na mesma linha uma vez que os efeitos da combinação de tratamentos foram mais acentuados do que cada tratamento sozinho.

A análise de transcriptómica realizada demonstrou existirem evidências de uma correlação muito forte entre a expressão de YAP1 e RalGPS2 exclusiva da próstata, nomeadamente em tecido saudável adenocarcinomas e tumores neuroendócrinos. No futuro, seria importante aprofundar os mecanismos que levam a que RalGPS2 e YAP1 estejam correlacionadas em cancro da próstata.

Bibliografia

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/CAAC.21492.
- [2] A. O. Santos, M. C. Parrini, and J. Camonis, “RalGPS2 Is Essential for Survival and Cell Cycle Progression of Lung Cancer Cells Independently of Its Established Substrates Ral GTPases,” *PLoS One*, vol. 11, no. 5, May 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0154840.
- [3] J. Tan, W. Wang, B. Song, Y. Song, and Z. Meng, “Integrative Analysis of Three Novel Competing Endogenous RNA Biomarkers with a Prognostic Value in Lung Adenocarcinoma,” *Biomed Res Int*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/2837906.
- [4] A. C. S. Roque, “RalGPS2 na proliferação e sobrevivência de células tumorais humanas de cancro da próstata,” Universidade da Beira Interior, 2022.
- [5] A. Pocaterra, P. Romani, and S. Dupont, “YAP/TAZ functions and their regulation at a glance,” *J Cell Sci*, vol. 133, no. 2, Jan. 2020, doi: 10.1242/JCS.230425/225043.
- [6] A. M. Lewandowska, M. Rudzki, S. Rudzki, T. Lewandowski, and B. Laskowska, “Environmental risk factors for cancer-review paper,” *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 26, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.26444/aaem/94299.
- [7] M. M. Shen and C. Abate-Shen, “Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges,” *Genes Dev*, vol. 24, no. 18, p. 1967, Sep. 2010, doi: 10.1101/GAD.1965810.
- [8] J. H. T. Bates, K. L. Hamlington, G. Garrison, and C. M. Kinsey, “Prediction of lung cancer risk based on age and smoking history,” *Comput Methods Programs Biomed*, vol. 216, p. 106660, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.CMPB.2022.106660.
- [9] V. A. Katzke, R. Kaaks, and T. Kühn, “Lifestyle and cancer risk,” *Cancer J*, vol. 21, no. 2, pp. 104–110, Mar. 2015, doi: 10.1097/PPO.000000000000101.
- [10] B. L. Betz, C. A. Dixon, H. C. Weigelin, S. M. Knoepp, and M. H. Roh, “The use of stained cytologic direct smears for ALK gene rearrangement analysis of lung adenocarcinoma,” *Cancer Cytopathol*, vol. 121, no. 9, pp. 489–499, Dec. 2013, doi: 10.1002/CNCY.21286.
- [11] A. Hoque, H. Chen, and X. C. Xu, “Statin Induces Apoptosis and Cell Growth Arrest in Prostate Cancer Cells,” *Cancer Epidemiology, Biomarkers &*

- Prevention*, vol. 17, no. 1, pp. 88–94, Jan. 2008, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0531.
- [12] M. M. Shen and C. Abate-Shen, “Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges,” *Genes Dev*, vol. 24, no. 18, p. 1967, Sep. 2010, doi: 10.1101/GAD.1965810.
- [13] H. Lilja, D. Ulmert, and A. J. Vickers, “Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring,” *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 4, pp. 268–278, Apr. 2008, doi: 10.1038/NRC2351.
- [14] B. G. Timms, “Prostate development: a historical perspective,” *Differentiation*, vol. 76, no. 6, pp. 565–577, Jul. 2008, doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x.
- [15] M. M. Shen and C. Abate-Shen, “Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges,” *Genes Dev*, vol. 24, no. 18, p. 1967, Sep. 2010, doi: 10.1101/GAD.1965810.
- [16] Y. Yamada and H. Beltran, “Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer,” *Curr Oncol Rep*, vol. 23, no. 2, p. 15, Jan. 2021, doi: 10.1007/S11912-020-01003-9.
- [17] T. C. Yuan, S. Veeramani, and M. F. Lin, “Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells,” *Endocr Relat Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 531–547, Sep. 2007, doi: 10.1677/ERC-07-0061.
- [18] M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, and L. W. Jones, “Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3),” *Invest Urol*, vol. 17, no. 1, pp. 16–23, Jul. 1979, Accessed: Sep. 29, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/447482/>
- [19] S. Marchiani *et al.*, “Androgen-responsive and -unresponsive prostate cancer cell lines respond differently to stimuli inducing neuroendocrine differentiation,” *Int J Androl*, vol. 33, no. 6, pp. 784–793, Dec. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2605.2009.01030.X.
- [20] J. Dong *et al.*, “Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals,” *Cell*, vol. 130, no. 6, p. 1120, Sep. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.07.019.
- [21] S. Ma, Z. Meng, R. Chen, and K. L. Guan, “The *Hippo* Pathway: Biology and Pathophysiology,” <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111829>, vol. 88, pp. 577–604, Jun. 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-013118-111829.

- [22] J. H. Park, J. E. Shin, and H. W. Park, “The Role of *Hippo* Pathway in Cancer Stem Cell Biology,” *Mol Cells*, vol. 41, no. 2, p. 83, Feb. 2018, doi: 10.14348/MOLCELLS.2018.2242.
- [23] G. Santinon *et al.*, “dNTP metabolism links mechanical cues and YAP/TAZ to cell growth and oncogene-induced senescence,” *EMBO J*, vol. 37, no. 11, p. e97780, Jun. 2018, doi: 10.15252/EMBJ.201797780.
- [24] S. Cheng *et al.*, “The expression of YAP1 is increased in high-grade prostatic adenocarcinoma but is reduced in neuroendocrine prostate cancer,” *Prostate Cancer Prostatic Dis*, vol. 23, no. 4, p. 661, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41391-020-0229-Z.
- [25] H. J. Lee, A. Ewere, M. F. Diaz, and P. L. Wenzel, “TAZ responds to fluid shear stress to regulate the cell cycle,” *Cell Cycle*, vol. 17, no. 2, p. 147, Jan. 2018, doi: 10.1080/15384101.2017.1404209.
- [26] M. J. Weber and D. Gioeli, “Ras signaling in prostate cancer progression,” *J Cell Biochem*, vol. 91, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2004, doi: 10.1002/JCB.10683.
- [27] M. R. Graaf, D. J. Richel, C. J. F. van Noorden, and H. J. Guchelaar, “Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer,” *Cancer Treat Rev*, vol. 30, no. 7, pp. 609–641, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.CTRV.2004.06.010.
- [28] G. Papadopoulos, D. Delakas, L. Nakopoulou, and T. Kassimatis, “Statins and prostate cancer: Molecular and clinical aspects,” *Eur J Cancer*, vol. 47, no. 6, pp. 819–830, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.EJCA.2011.01.005.
- [29] K. Gauthaman, C.-Y. Fong, and A. Bongso, “Statins, Stem Cells, and Cancer,” *J. Cell. Biochem*, vol. 106, pp. 975–983, 2009, doi: 10.1002/jcb.22092.
- [30] U. Sivaprasad, T. Abbas, and A. Dutta, “Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells,” *Mol Cancer Ther*, vol. 5, no. 9, pp. 2310–2316, Sep. 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0175.
- [31] T. J. Murtola, T. Visakorpi, J. Lahtela, H. Syväälä, and T. L. J. Tammela, “Statins and prostate cancer prevention: Where we are now, and future directions,” *Nat Clin Pract Urol*, vol. 5, no. 7, pp. 376–387, 2008, doi: 10.1038/ncpuro1146.
- [32] C. W. Chou *et al.*, “Therapeutic effects of statins against lung adenocarcinoma via p53 mutant-mediated apoptosis,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41598-019-56532-6.
- [33] H. Liu, Z. Wang, Y. Li, W. Li, and Y. Chen, “Simvastatin prevents proliferation and bone metastases of lung adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*,” *Neoplasma*, vol. 60, 2013, doi: 10.4149/neo_2013_032.

- [34] M. Ceriani, L. Amigoni, C. ScandiuZZi, G. Berruti, and E. Martegani, “The PH-PxxP domain of RalGPS2 promotes PC12 cells differentiation acting as a dominant negative for RalA GTPase activation,” *Neurosci Res*, vol. 66, no. 3, pp. 290–298, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.NEURES.2009.11.013.
- [35] M. B. Ramocki, M. A. White, S. F. Konieczny, and E. J. Taparowsky, “A Role for RalGDS and a Novel Ras Effector in the Ras-mediated Inhibition of Skeletal Myogenesis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 28, pp. 17696–17701, Jul. 1998, doi: 10.1074/JBC.273.28.17696.
- [36] M. H. G. Verheijen, R. M. F. Wolthuis, L. H. K. Defize, J. den Hertog, and J. L. Bos, “Interdependent action of RalGEF and Erk in Ras-induced primitive endoderm differentiation of F9 embryonal carcinoma cells,” *Oncogene*, vol. 18, no. 31, pp. 4435–4439, Aug. 1999, doi: 10.1038/SJ.ONC.1202834.
- [37] V. Jullien-Flores *et al.*, “RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis,” *J Cell Sci*, vol. 113 (Pt 16), no. 16, pp. 2837–2844, 2000, doi: 10.1242/JCS.113.16.2837.
- [38] A. Polzin, M. Shipitsin, T. Goi, L. A. Feig, and T. J. Turner, “Ral-GTPase Influences the Regulation of the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles,” *Mol Cell Biol*, vol. 22, no. 6, p. 1714, Mar. 2002, doi: 10.1128/MCB.22.6.1714-1722.2002.
- [39] Y. Ohta, N. Suzuki, S. Nakamura, J. H. Hartwig, and T. P. Stossel, “The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 5, pp. 2122–2128, Mar. 1999, doi: 10.1073/PNAS.96.5.2122/ASSET/89497792-DO78-4D10-A16D-9ADCCE0817E8/ASSETS/GRAPHIC/PQ0494645006.JPEG.
- [40] M. Ceriani, C. ScandiuZZi, L. Amigoni, R. Tisi, G. Berruti, and E. Martegani, “Functional analysis of RalGPS2, a murine guanine nucleotide exchange factor for RalA GTPase,” *Exp Cell Res*, vol. 313, no. 11, pp. 2293–2307, Jul. 2007, doi: 10.1016/J.YEXCR.2007.03.016.
- [41] F. Pontén, K. Jirström, and M. Uhlen, “The Human Protein Atlas—a tool for pathology,” *J Pathol*, vol. 216, no. 4, pp. 387–393, Dec. 2008, doi: 10.1002/PATH.2440.
- [42] “RALGPS2 protein expression summary - The Human Protein Atlas.” <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116191-RALGPS2> (accessed Sep. 29, 2022).
- [43] A. D’Aloia *et al.*, “RalGPS2 is involved in tunneling nanotubes formation in 5637 bladder cancer cells,” *Exp Cell Res*, vol. 362, no. 2, pp. 349–361, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.YEXCR.2017.11.036.

- [44] C. Riccardi and I. Nicoletti, “Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry,” *Nature Protocols* 2006 1:3, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, Nov. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.238.
- [45] J. v. Watson, S. H. Chambers, and P. J. Smith, “A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak,” *Cytometry*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 1987, doi: 10.1002/CYTO.990080101.
- [46] J. I. Heger *et al.*, “Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum,” *Exp Cell Res*, vol. 365, no. 1, pp. 57–65, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.YEXCR.2018.02.017.
- [47] J. van der Valk *et al.*, “Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future,” *ALTEX*, vol. 35, no. 1, pp. 99–118, 2018, doi: 10.14573/ALTEX.1705101.
- [48] S. Bellosta, R. Paoletti, and A. Corsini, “Safety of statins: Focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions,” *Circulation*, vol. 109, no. 23 SUPPL., pp. 50–57, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000131519.15067.1f.
- [49] A. Corsini, S. Bellosta, R. Baetta, R. Fumagalli, R. Paoletti, and F. Bernini, “New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins,” *Pharmacol Ther*, vol. 84, no. 3, pp. 413–428, Dec. 1999, doi: 10.1016/S0163-7258(99)00045-5.
- [50] L. Björkhem-Bergman, J. D. Lindh, and P. Bergman, “What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects?,” *Br J Clin Pharmacol*, vol. 72, no. 1, p. 164, Jul. 2011, doi: 10.1111/J.1365-2125.2011.03907.X.
- [51] F. G. Sousa, “Intranasal administration of Simvastatin for Neuroprotection Development of Micro and Nanoemulsions for Intranasal Delivery of Simvastatin in Ischemic,” Universidade da Beira Interior, 2022.
- [52] J. Lee, I. Lee, C. Park, and W. K. Kang, “Lovastatin-induced RhoA modulation and its effect on senescence in prostate cancer cells,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 339, no. 3, pp. 748–754, Jan. 2006, doi: 10.1016/J.BBRC.2005.11.075.
- [53] G. Tang, M. Cho, and X. Wang, “*OncnoDB*: An interactive online database for analysis of gene expression and viral infection in cancer,” *Nucleic Acids Res*, vol. 50, no. D1, pp. D1334–D1339, Jan. 2022, doi: 10.1093/NAR/GKAB970.
- [54] S. Cheng *et al.*, “The expression of YAP1 is increased in high-grade prostatic adenocarcinoma but is reduced in neuroendocrine prostate cancer,” *Prostate Cancer Prostatic Dis*, vol. 23, no. 4, p. 661, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41391-020-0229-Z.

- [55] R. Li, J. Zhu, W.-D. Zhong, and Z. Jia, “PCaDB - a comprehensive and interactive database for transcriptomes from prostate cancer population cohorts,” *bioRxiv*, p. 2021.06.29.449134, Jan. 2022, doi: 10.1101/2021.06.29.449134.
- [56] S. Cheng and X. Yu, “Bioinformatics analyses of publicly available NEPCa datasets,” *Am J Clin Exp Urol*, vol. 7, no. 5, p. 327, 2019, Accessed: Oct. 05, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC6872473/
- [57] “Home - GEO - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (accessed Oct. 05, 2022).
- [58] “cBioPortal for Cancer Genomics.” <https://www.cbioportal.org/> (accessed Oct. 05, 2022).

Apêndice

A. Ciclo celular

A.1. Distribuição do ciclo celular da linha A549 para a condição ausência de soro

A linha celular A549 na ausência de soro durante 48 h (Figura 28) demonstrou ter elevada toxicidade e provocar elevada apoptose (um grande número de células localiza-se na região Sub-G1), tal como se pode verificar nos dados demonstrados em seguida. Para além disso, na análise quantitativa esta condição apresentava valores de Sub-G1 de aproximadamente 56%, ou seja, superiores a qualquer outra condição anteriormente demonstrada.

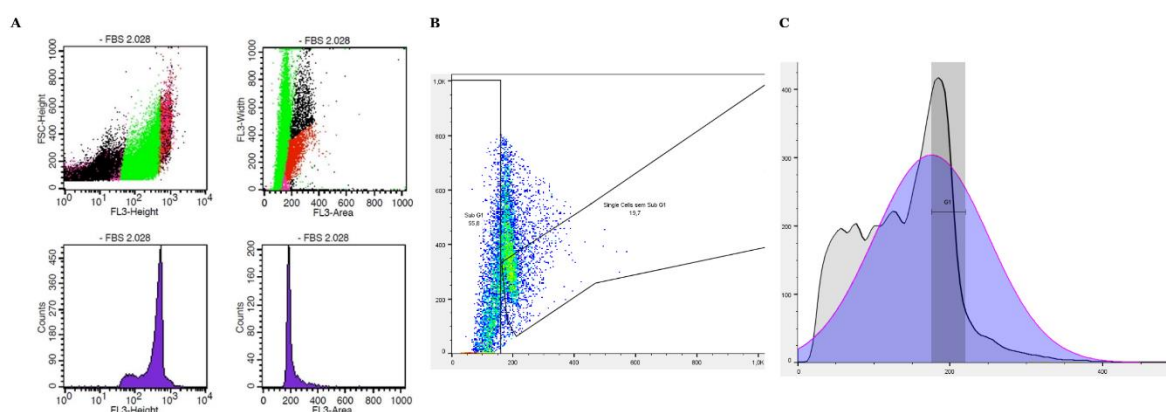


Figura 28 - Ciclo celular da linha A549 com ausência de soro durante 48 h.

(A) - Leitura obtida através do programa BD FACSCalibur. (B) - Análise alternativa dos dados no *software* FlowJo. TM. (C) - Distribuição do ciclo celular das células mantidas em ausência de soro durante 48 h.

A.2. Efeito da remoção de soro durante 24h e 72h e do tratamento com sinvastatina na linha de cancro da próstata DU145

Os resultados do ensaio de citometria de fluxo realizados para a linha DU145 com combinações de sinvastatina nas concentrações de 10 e 30 μM com ausência de soro durante 24 ou 72 h (Figura 29) revelam a existência de diferenças significativas nas fases G1 e S do ciclo celular comparando todos os grupos com o controlo.

As condições ausência de soro e adição de sinvastatina na concentração 10 μM para as 24h em combinação com ausência de FBS e 30 μM para as 72h mostraram ter efeito no aumento do número de células em G1 e diminuição do número de células na fase S do ciclo celular comparando com o controlo. O efeito foi mais pronunciado com 30 μM para as 72h ($p < 0.0001$). No entanto, a combinação de ausência de FBS durante 24 h com sinvastatina 10 μM não demonstrou ter efeito mais pronunciado do que apenas a remoção de soro, o que é sugestivo de um efeito antagonista.

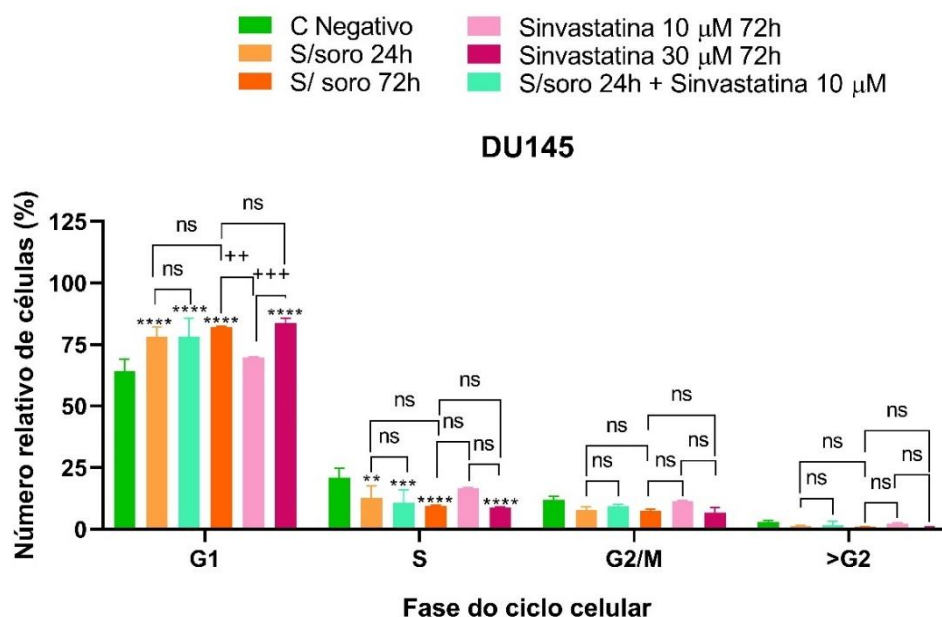


Figura 29 - Ensaio de distribuição do ciclo celular da linha DU145 após tratar com sinvastatina 10 e 30 μM e manter em ausência de soro durante 24 e 72 h.

O grupo de controlo é comum com o gráfico das 48 h. A análise estatística realizada foi *Two-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e + para comparações entre grupos.

No que respeita à indução de apoptose, a remoção de soro não demonstrou ter qualquer efeito e a sinvastatina sozinha induziu apoptose apenas na condição 30 μM . Verifica-se novamente que apenas em concentrações muito altas é que a sinvastatina consegue induzir apoptose na linha DU145 (Figura 30).

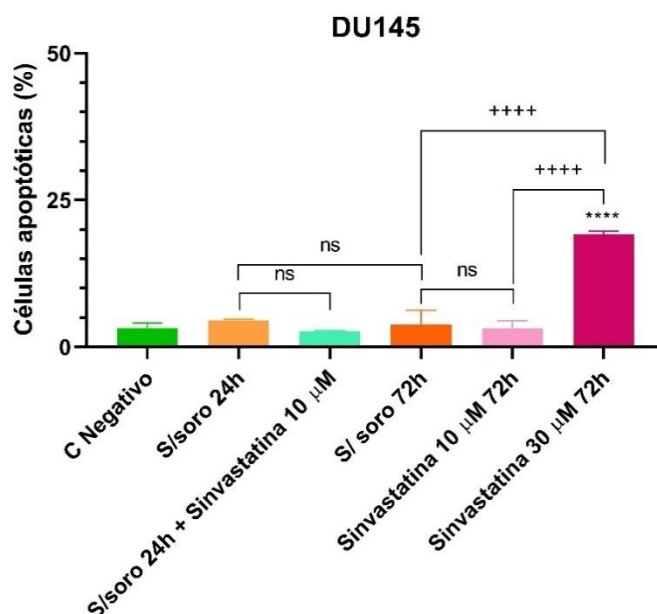


Figura 30 - Análise de Sub-G1 na linha DU145 com sinvastatina 10 e 30 µM em combinação com ausência de soro 24 e 78 h.

O grupo de controlo é comum com o gráfico das 48 h. A análise estatística realizada foi *One-way ANOVA* seguida de um teste de comparações múltiplas de *Tukey* e as diferenças significativas foram assinaladas com * quando comparados os grupos com o controlo e + para comparações entre grupos.

B. Bioinformática

B.1. Gráficos de correlação de diferentes tipos de cancro retirados do *OncoDB*

Por forma a realçar a forte correlação que existe entre os genes YAP1 e RalGPS2, e que parece ser específica do tecido da próstata (controlos, adenocarcinoma e tumores neuroendócrinos primários), demonstram-se de seguida correlações de expressão dos mesmos genes para cancro do pâncreas (com amostras de 178 pacientes), do ovário (com 418 pacientes em estudo), da mama (com 1135 amostras) e feocromocitoma e paraganglioma (para o qual havia 179 amostras). Em todas elas o valor de R é inferior a 0,5, ou seja, correlações sempre mais fracas entre os referidos genes nos tipos de cancro mencionados.

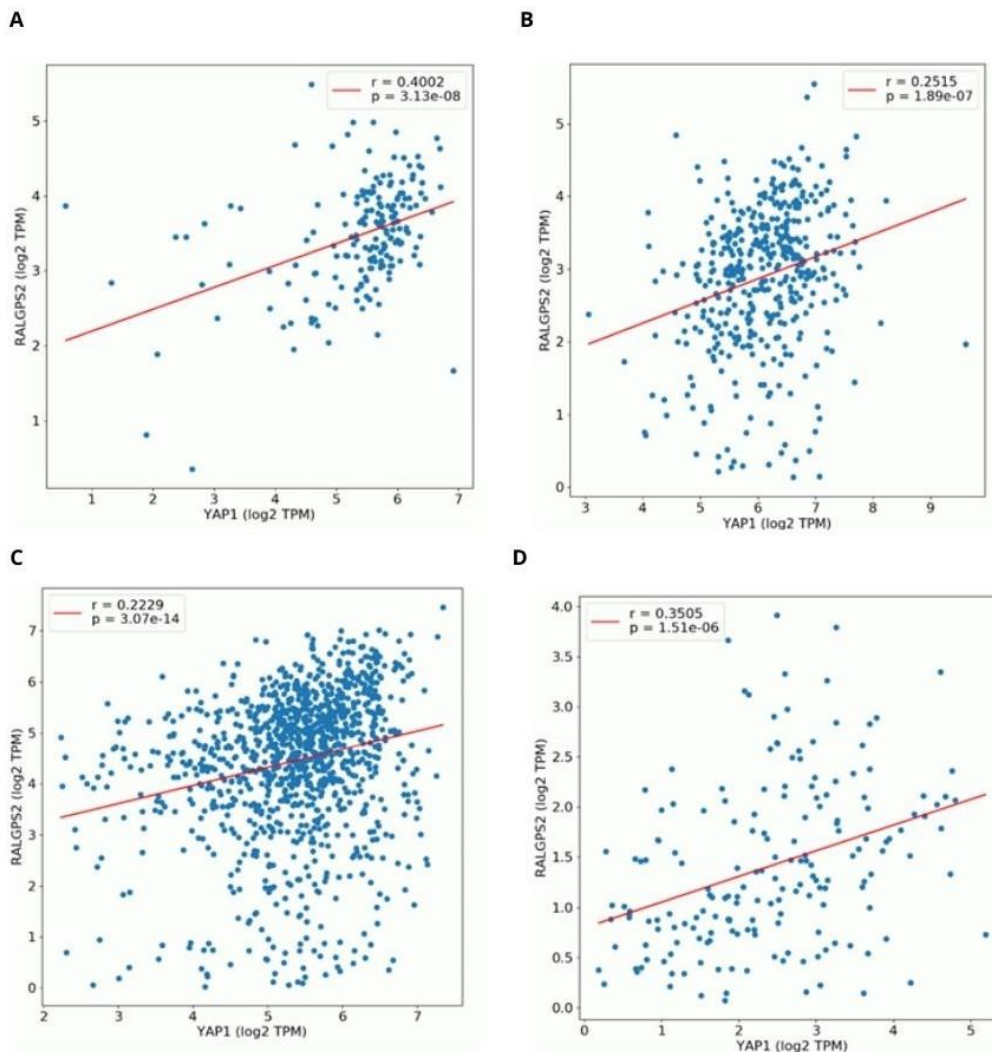


Figura 31 - Gráficos de correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em diferentes tipos de cancro retirados da base de dados aberta *OncnoDB* [53].

(A) - Cancro do Pâncreas (n=178); (B) - Cancro do Ovário (n=418); (C) - Cancro da Mama (n=1135); (D) - Cancro do Feocromocitoma e paraganglioma (n=179).

B.2. Bancos de dados utilizados para fazer o *heatmap* com valores de expressão génica

Para construir o *heatmap* com valores de expressão génica consideraram-se alguns dos genes presentes na via *Hippo* e na lista de genes que se relacionam com o gene YAP1 (Tabela 7).

Tabela 7 - Lista de genes que se relacionam com YAP1.

<i>CORDENONSI_YAP1_CONSERVED_SIGNATURE</i>		<i>YAP1_UP Genes up-regulated in MCF10A cells (breast cancer) over-expressing YAP1 [GeneID=10413] gene.</i>		<i>Genes down-regulated in MCF10A cells (breast cancer) over-expressing YAP1 [GeneID=10413] gene.</i>	
AGFG2	GAS6	ARHGGEF10	MSN	ACOX2	MYO1B
AMOTL2	GGH	BICRA	MYLK	APOBEC2	ORC2
ANKRD1	GLS	C15orf65	NMRK1	C6orf58	PABIR3
ASAP1	HEXB	C8orf48	NRAS	CACNB4	PDIK1L
AXL	HMMR	C8orf58	PRKACG	CBLL2	PIGO
BICC1	ITGB2	CAMK4	PTPMT1	CCDC87	PRCC
BIRC5	ITGB5	CCDC8	RAB40C	CHCHD3	RCC1L
C9	LHFPL6	CDIPT	RFTN1	DOCK11	RFX1
CAVIN2	MARCKS	CDK14	RGCC	FICD	RHBDL1
CCN1	MDFIC	CNP	RHOQ	GOLGA2P5	RNF227
CCN2	NDRG1	COX8A	RPN2	GPR50	SLC17A7
CDC20	PDLIM2	CYP4B1	SAMSN1	GUCY2C	SLC6A5
CDKN2C	PHGDH	DDB2	SEMA3C	HEY1	SLC9A1
CENPF	PMP22	DENND10	SHISA4	IL4R	TAS2R7
COL4A3	SCHIP1	DLX5	SHLD2	IQCF1	TEX101
CRIM1	SERPINE1	DRAM2	SIAE	ITGA2	THNSL1
DAB2	SGK1	FAF2	SNAP23	ITGBL1	TIMP3
DDAH1	SH2D4A	FAM167A	SNX7	KATNB1	TSPY26P
DLC1	SHCBP1	FLOT1	STEEP1	LCA5L	UGT2B4
DUSP1	SLIT2	GTPBP3	TEAD1	LIMD1	VSNL1
DUT	STMN1	KCNK12	WASHC4	LINC00639	WSCD2
ECT2	TGFB2	LLGL1	YWHAZ	LONRF2	XAGE2
EMP2	TGM2	MAML2	ZNHIT6	MOBP	ZBTB39
ETV5	THBS1	MOCS2		MYLIP	
FGF2	TK1				
FLNA	TNNT2				
FSCN1	TNS1				
FSTL1	TOP2A				
GADD45B	TSPAN3				

Para tal, analisaram-se 15 bancos de dados presentes no PCaDB [55] que provêm de artigos publicados (Tabela 8) distintos nos quais se procuraram dados de valores de expressão para os genes seleccionados.

Tabela 8 - Identificação dos bancos de dados que formam o *heatmap* com os valores de expressão génica.

Identificação da base de dados	Nome da base de dados	Título	GEO/ ArrayExpress Accession	Total de amostras
TCGA-PRAD	TCGA-PRAD	<i>Prostate Adenocarcinoma (The Cancer Genome Atlas)</i>		547
Taylor	Taylor	<i>Whole-transcript and exon-level expression data for human primary and metastatic prostate cancer samples and control normal adjacent benign prostate</i>	GSE21034	185
PCaDB1	GSE22260	<i>Comparative transcriptomic analysis of prostate cancer and matched normal tissue using RNA-seq</i>	GSE22260	30
PCaDB3	Cambridge	<i>Prostate cancer stratification using molecular profiles [CamCap ExpressionArray]</i>	GSE70768	199
PCaDB5	GSE79021	<i>Association of Prostate Cancer Risk Variants with Gene Expression in Normal and Tumor Tissue</i>	GSE79021	202
PCaDB4	E-MTAB-6128	<i>Expression array for Multi-omics molecular profiling of primary prostate adenocarcinoma</i>	E-MTAB-6128	141
PCaDB6	GSE35988-GPL6480	<i>The Mutational Landscape of Lethal Castrate Resistant Prostate Cancer</i>	GSE35988	88
PCaDB7	GSE35988-GPL6848	<i>The Mutational Landscape of Lethal Castrate Resistant Prostate Cancer</i>	GSE35988	34
PCaDB8	GSE3325	<i>Integrative Genomic and Proteomic Analysis of Prostate Cancer Reveals Signatures of Metastatic Progression</i>	GSE3325	19
PCaDB9	GSE17951	<i>Gene expression analysis of prostate cancer samples using Affymetrix U133Plus2 array</i>	GSE17951	154
PCaDB10	GSE8218	<i>Gene expression data from prostate cancer samples</i>	GSE8218	148
PCaDB11	E-TABM-26-U133A	<i>Transcription profiling of human prostate tissues obtained from multiple Institutions</i>	E-TABM-26	57
PCaDB13	GSE5132	<i>Molecular Correlate to Gleason Grade in Prostate Adenocarcinoma</i>	GSE5132	31
PCaDB14	GSE29079	<i>Gene expression profiles of 48 normal and 47 prostate tumor tissue samples</i>	GSE29079	95

B.3. Identificação dos 12 genes assinatura de tumores da próstata neuroendócrinos para formar o banco de dados

Com o objetivo de selecionar para a análise apenas amostras com perfil de expressão que indique origem neuroendócrina, foi elaborado um *heatmap* de expressão para cada banco de dados utilizado com os 12 genes assinatura (Tabela 9) de tumores da próstata neuroendócrinos de acordo com o descrito por Cheng *et al.* [56].

Tabela 9 - Identificação dos 12 genes assinatura de tumores da próstata neuroendócrinos

	Gene ID	Nome	Função na célula
Up regulated	CHGA	<u><i>chromogranin A</i></u>	<i>common neuronal markers</i>
	SYP	<u><i>synaptophysin</i></u>	<i>common neuronal markers</i>
	SRRM4	<u><i>serine/arginine repetitive matrix 4</i></u>	<i>mRNA splicing factor</i>
	FOXA2	<u><i>forkhead box A2</i></u>	<i>pioneer transcription factor</i>
	INSM1	<u><i>INSM transcriptional repressor 1</i></u>	<i>transcription repressor</i>
	EZH2	<i>enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>	<i>key component of polycomb repressive complex 2</i>
	ASCL1	<u><i>achaete-scute family bHLH transcription factor 1</i></u>	<i>master neuronal transcription factor</i>
	NCAM1	<u><i>neural cell adhesion molecule 1</i></u>	<i>neural cell adhesion molecule</i>
	SOX2	<u><i>SRY-box transcription factor 2</i></u>	<i>marker of neural stem cells</i>
Down regulated	AR	<u><i>Androgen Receptor</i></u>	<i>controls prostate epithelial cell differentiation</i>
	REST	<u><i>RE1 silencing transcription factor</i></u>	<i>represses the expression of neuronal genes</i>
	SPDEF	<u><i>SAM pointed domain containing ETS transcription factor</i></u>	<i>ETS transcription factor that regulates the differentiation of epithelial cells</i>

Assim, apresenta-se de seguida um exemplo de um *heatmap* de expressão feito nas condições anteriormente mencionadas para um dos bancos de dados no qual é claramente perceptível o agrupamento das amostras com características neuroendócrinas um *cluster* e das amostras com características distintas das neuroendócrinas num *cluster* diferente.

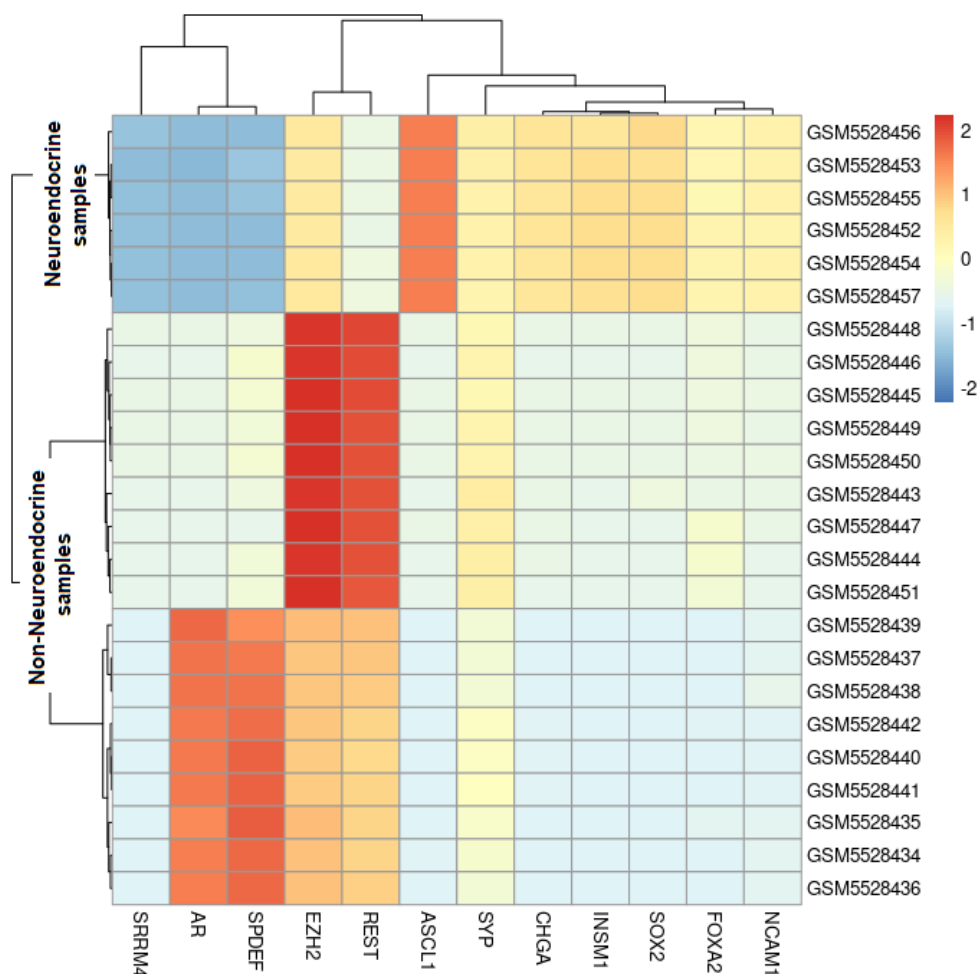


Figura 32 - Exemplo de *heatmap* para seleção das amostras neuroendócrinas.

Na lateral esquerda da figura nota-se a formação de dois grupos distintos que tem por base a expressão dos 12 genes assinatura para tumores da próstata de origem neuroendócrina.

B.4. Métodos utilizados para elaborar os gráficos de correlação e os *boxplots*

Para realizar os gráficos de correlação de expressão entre os genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinoma e em tumores neuroendócrinos da próstata a Doutora Michele Claire Breton construiu novos bancos de dados de adenocarcinoma e de tumores neuroendócrinos da próstata.

Assim, para o banco de dados de adenocarcinoma da próstata foram selecionadas amostras a partir do banco de dados *PCaDB* [55] e do banco *Gene Expression Omnibus* [57]. A totalidade dos dados foi ainda filtrada e selecionaram-se apenas aqueles para os quais se encontrava disponível o resultado de sequenciação de RNA para amostras saudáveis e de tumores primários ou metastáticos para os quais havia valores de expressão génica dos genes YAP1 e RalGPS2 válidos.

Para além disso, dentro destes bancos foi feita uma seleção daqueles que tinham amostras de tumores neuroendócrinos. A esses juntaram-se dados provenientes da plataforma cBioPortal [58]. Para formar este banco os critérios de seleção tidos em conta foram a origem da amostra de tecido ou de células de próstata e o facto de apresentarem o perfil de expressão com assinatura específica deste tipo de tumor descrita por Cheng *et al* [56]. Para o grupo controlo foram consideradas amostras de próstata saudável, tumores benignos, tumores xenográficos de próstata e linhas celulares de próstata sem origem neuroendócrina.

B.5. Dados estatísticos obtidos para os *boxplots* de adenocarcinomas da próstata e tumores neuroendócrinos.

Após efetuar o *boxplot* para adenocarcinoma da próstata foi efetuada uma análise estatística do perfil de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 para os grupos controlo (n=549), tumor primário (n=1327) e tumores metastáticos (n=25) que é demonstrada na tabela 10.

Tabela 100 - Dados estatísticos obtidos para os *boxplots* de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 em adenocarcinoma da próstata.

Tipo de tumor	Grupos	Gene	Estatística básica do perfil de expressão do gene					
			Min.	1º Qu	Mediana	Média	3º Qu	Max
Adenocarcinoma	Controlo: 549	YAP1	5.021	7.535	7.535	8.624	8.624	10.222
		RALGPS2	2.048	3.212	5.012	5.012	6.693	9.176
	Tumor primário: 1327	YAP1	3.233	6.418	7.050	7.050	8.530	10.036
		RALGPS2	1.918	3.401	4.783	4.783	6.748	8.988
	Tumor metastático: 25	YAP1	5.463	8.047	5.463	8.881	9.309	9.701
		RALGPS2	5.245	6.312	5.245	6.630	7.205	8.862

No que respeita ao *boxplot* para tumores neuroendócrinos da próstata foi efetuada uma análise estatística do perfil de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 para os grupos controlo (n=24), neuroendócrino (n=23) e tumores metastáticos (n=2) que é demonstrada na tabela 11.

Tabela 111 - Dados estatísticos obtidos para os *boxplots* de expressão dos genes YAP1 e RalGPS2 em tumores neuroendócrinos da próstata.

Tipo de tumor	Grupos	Gene	Estatística básica do perfil de expressão do gene					
			Min.	1º Qu	Mediana	Média	3º Qu	Max
Tumor neuroendócrino	Controlo: 24	YAP1	-0.252	1.618	3.413	3.413	8.235	9.807
		RalGPS2	-0.488	0.323	4.071	4.071	5.279	5.837
	Neuroendócrino: 23	YAP1	-4.207	-1.170	-0.298	-0.298	3.015	6.796
		RalGPS2	-0.493	1.796	2.430	2.430	2.598	2.821
	Tumor metastático: 2	YAP1	2.039	2.219	2.399	2.399	2.579	2.760
		RalGPS2	2.508	2.521	2.533	2.533	2.546	2.559

Tabela 122 - Amostras de tecidos ou células de próstata selecionadas para formar o banco de dados neuroendócrino após a verificação do perfil de expressão dos 12 genes assinatura através de realização de uma *heatmap* para cada banco de dados.

	Base de dados	Controlo (n=21)	Amostras neuroendócrinas (n=24)
1	Neuroendócrino		WCMC_o_10_N Benign prostate tissue WCMC_o_9_N Benign prostate tissue WCMC_o_8_N Benign prostate tissue WCMC_o_6_N Benign prostate tissue WCMC_o_5_N Benign prostate tissue WCMC_4240_1_N Benign prostate tissue
2	GSE3325	GSM74875 Benign prostate tissue GSM74876 Benign prostate tissue GSM74877 Benign prostate tissue GSM74878 Benign prostate tissue	GSM74888 Metastatic prostate cancer GSM74889 Metastatic prostate cancer
3	GSE30521	GSM756918 Normal prostate tissue GSM756919 Normal prostate tissue GSM756920 Normal prostate tissue GSM756921 Normal prostate tissue	GSM756914 Prostate cancer Gleason5+4
4	GSE33277	GSM855422 Prostate cancer (xeno parent 117) GSM855423 Prostate cancer (xeno parent 79) GSM855424 Xenograph 79 GSM855425 Xenograph 117	GSM855436 Prostate Cancer (small cell) GSM855431 Prostate Cancer (xeno parent 149)
5	GSE41192	GSM1010261 Prostate tumor clinical patient 1005 GSM1010262 Prostate tumor clinical patient 1015 GSM1010263 Prostate tumor clinical patient 927	GSM1040689 Prostate tumor patient derived xenograft LTL-352-G13 GSM1010257 Prostate tumor patient derived xenograft LTL-370 GSM1040688 Prostate tumor patient derived xenograft LTL-331R
6	GSE66187		GSM1616595 LuCaP 49 Pca xenograft tumor GSM1616604 LuCaP 93 Pca xenograft tumor GSM1616611 LuCaP 145.1 Pca xenograft tumor GSM1616612 LuCaP 145.2 Pca xenograft tumor
7	GSE182407	GSM5528439 LNCaP_YAP1_KD_clone1_3 GSM5528437 LNCaP_YAP1_KD_clone1_1 GSM5528438 LNCaP_YAP1_KD_clone1_2 GSM5528442 LNCaP_YAP1_KD_clone2_3 GSM5528440 LNCaP_YAP1_KD_clone1_1 GSM5528441 LNCaP_YAP1_KD_clone2_2 GSM5528435 LNCaP_Control_2 GSM5528434 LNCaP_Control_1 GSM5528436 LNCaP_Control_3	GSM5528455 NCI-H660_YAP1_OE_1 GSM5528456 NCI-H660_YAP1_OE_2 GSM5528454 NCI-H660_Control_3 GSM5528453 NCI-H660_Control_2 GSM5528452 NCI-H660_Control_1 GSM5528457 NCI-H660_YAP1_OE_3

B.6. Avaliação da normalidade da distribuição dos dados para tumores neuroendócrinos da próstata

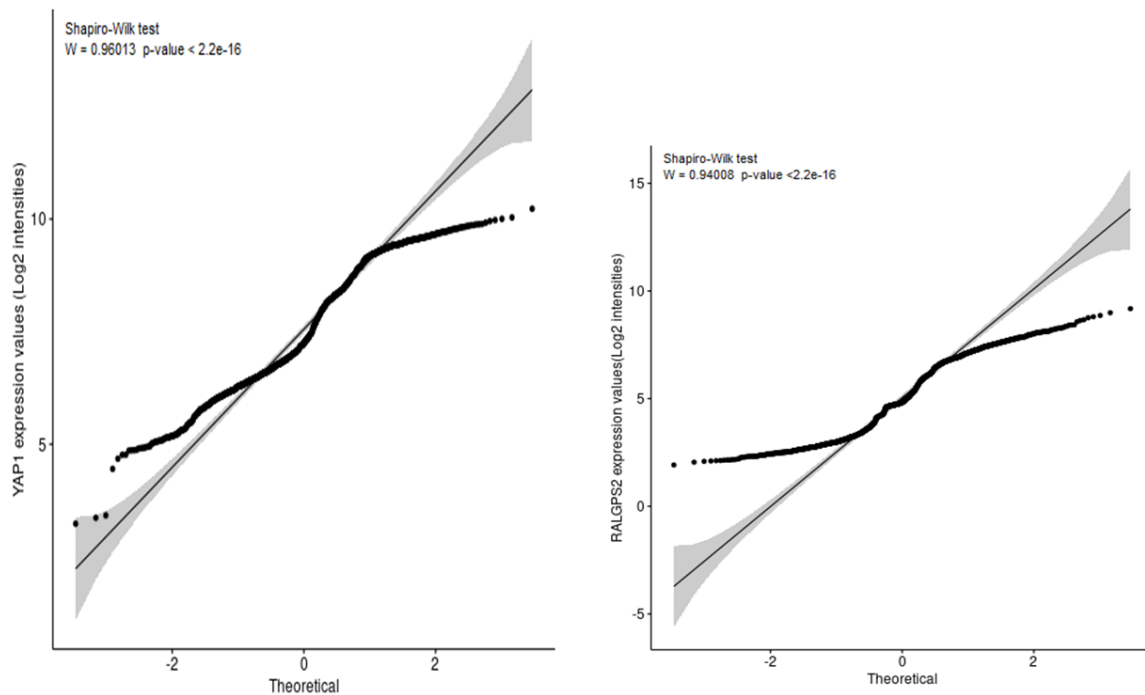
Para a correlação dos níveis de expressão de YAP1 e RalGPS2, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados aplicando o *Shapiro-Wilk normality test*, no programa “R 4.2.1.”.

Tabela 133 - Resultados do *Shapiro-Wilk Test* para os dados de expressão de adenocarcinoma e tumores neuroendócrinos de próstata

Dados	Gene	W	p-value	Sig.
Adenocarcinoma	YAP1	0.96013	<2.2e-16	No
	RalGPS2	0.94008	<2.2e-16	No
Tumor neuroendócrino da próstata	YAP1	0.95859	0.1089	Yes
	RalGPS2	0.91578	0.003052	No

O resultado do teste mostra que, em geral, os dados apresentam uma distribuição não normal, o que rejeita a hipótese inicial.

A



B

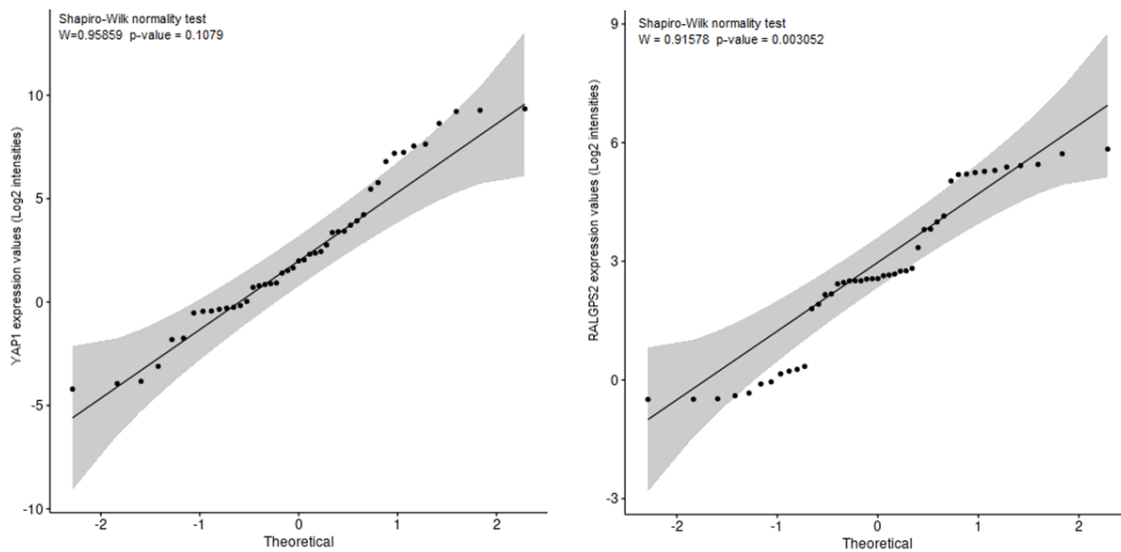


Figura 33 - Representação gráfica do resultado de *Shapiro-Wilk normality test* para os dados dos genes YAP1 e RalGPS2.

(A) - Adenocarcinoma da próstata; (B) - Tumores neuroendócrinos da próstata.

B.7. Ampliação das zonas assinaladas no heatmap

As zonas destacadas no heatmap de expressão (Figura 27) encontram-se abaixo ampliadas.

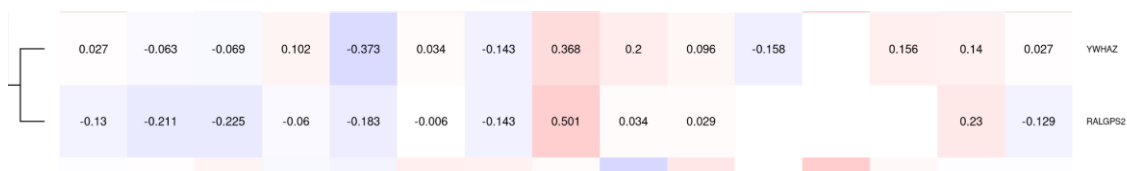


Figura 34 - Ampliação da zona A

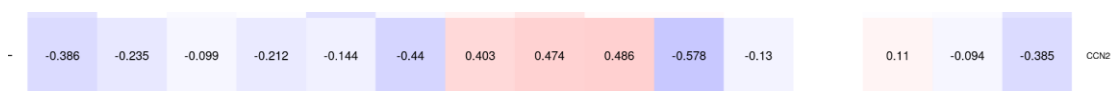


Figura 35 - Ampliação da zona B



Figura 36 - Ampliação da zona C

Avaliação do impacto dos níveis de expressão de RalGPS2 em cancro do pulmão e da próstata



Figura 37 - Ampliação da zona D

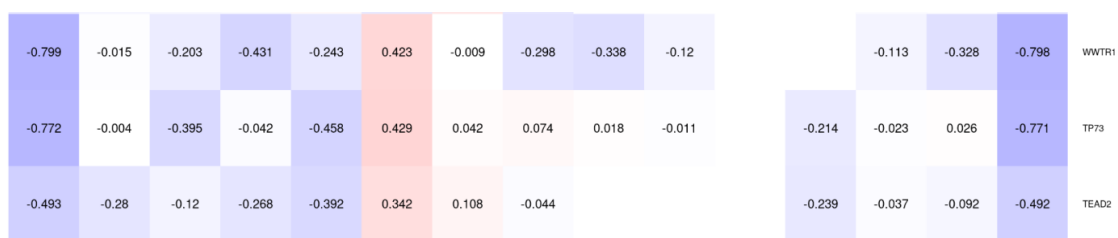


Figura 38 - Ampliação da zona E.