

**RalGPS2 na proliferação e sobrevivência de
células tumorais humanas de cancro da
próstata**
Versão final após defesa

Ana Catarina Santos Roque

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Adriana Oliveira dos Santos
Co-orientadores: Doutora Cátia Alexandra Vicente Vaz
Mestre Sandra Catarina Moreira Rocha

agosto de 2022

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe (a minha melhor amiga), ao meu pai (o meu exemplo de perseverança, força e coragem) e irmão (quem me faz rir, o meu eterno amigo). Sem eles nada disto seria possível. O meu infinito obrigada não chegaria para lhes agradecer.

Agradecimentos

À Professora Doutora Adriana Santos pela disponibilidade constante, ensinamentos valiosos e paciência. O mundo seria diferente se todos os professores assim fossem. À Mestre Sandra Rocha pela ajuda preciosa no trabalho laboratorial, essencial na realização deste trabalho. À Doutora Cátia Vaz, que sempre mostrou disponibilidade para ajudar e pelo contributo dado. A todos os colegas com quem trabalhei e me cruzei durante o mestrado, pela valiosa entreaajuda, e de quem me recordarei sempre.

Agradeço o financiamento obtido para a realização deste trabalho, através da operação Centro-01-0145-FEDER-000019 - C4 - Centro de Competências em Cloud Computing, cofinanciada pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional FEDER) através do Programa Operacional Regional do Centro (Centro 2020), no âmbito do Sistema de Apoio à Investigação Científica e Tecnológica - Programas Integrados de IC&DT, assim como por 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.

Aos amigos que fiz, essenciais em tantos aspetos. Ao Eduardo, por todo o carinho e ajuda constantes. À Carina, pela amizade e boa disposição. À minha tia Lurdes, de quem tenho um exemplo de força. Obrigada.

Resumo

A ativação das GTPases Ral (RalA e RalB), pertencentes a uma subfamília de proteínas Ras, é efetuada por 6 fatores de troca de nucleótidos de guanina específicos de Ral (RalGEFs). RalGPS2 (*Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2*) é um dos membros da família de RalGEFs cuja ativação é independente da sinalização por Ras. Resultados anteriores obtidos em linhas de cancro do pulmão e um ensaio de duplo-híbrido em leveduras (Santos A.O. e Camonis J., não publicado) sugeriram a hipótese de que RalGPS2 teria um papel na regulação dos co-ativadores transcricionais da via Hippo YAP/TAZ. No presente trabalho, essa hipótese foi testada silenciando RalGPS2 em células de cancro da próstata e avaliando o crescimento, a sobrevivência e a expressão de genes induzidos pela ativação de YAP/TAZ.

O silenciamento de RalGPS2 por siRNA foi otimizado em células de cancro da próstata PC-3, sendo o efeito na viabilidade/proliferação celular avaliado pelo ensaio de redução de resazurina aos 5 dias após a transfeção. A percentagem de indução espontânea de apoptose e a distribuição do ciclo celular foram obtidos por citometria de fluxo após marcação das células com iodeto de propídio. A expressão de mRNA dos genes regulados por YAP/TAZ, CTGF e CYR61, assim como de RalGPS2, foi obtida por PCR quantitativo em tempo real. Adicionalmente, foi explorado o efeito do silenciamento de RalGPS2 na expressão de CTGF e CYR61 em condições de estimulação com soro fetal bovino.

O silenciamento de RalGPS2 inibiu o crescimento de PC-3 ($\approx 59\%$) e aumentou a taxa de apoptose espontânea das células. A expressão de mRNA de RalGPS2 diminuiu significativamente tanto aos 3 quanto aos 5 dias após o silenciamento, no entanto, não se detetou a diminuição da expressão dos genes CTGF e CYR61. Em conclusão, o papel de RalGPS2 no controlo da proliferação e sobrevivência de células PC-3 não parece estar associado à ativação de YAP/TAZ induzida pelo soro nesta linha celular.

Palavras-chave

Apoptose; Cancro da próstata; PC-3; Proliferação; RalGPS2; YAP/TAZ

Abstract

The activation of GTPases RalA and RalB, a subfamily of Ras proteins, is done by 6 Ral-specific guanine nucleotide exchange factors (RalGEFs). RalGPS2 (Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2) is one of the RalGEFs family members whose activation is independent from Ras signaling. Previous results obtained by the group in lung cancer cell lines and on a yeast two-hybrid screen (Santos A.O. e Camonis J., not published) raised the hypothesis that RalGPS2 may participate in the regulation of YAP/TAZ (transcriptional co-activators of the Hippo pathway). In the present work, this hypothesis was tested by silencing RalGPS2 in prostate cancer cells and evaluating growth, survival and the expression of genes induced by YAP/TAZ activation.

The siRNA mediated RalGPS2 gene silencing was optimized in PC-3 human prostate cancer cell line, and the effect on the cell proliferation and viability assessed by a resazurin reduction assay 5 days after transfection. The percentage of spontaneous apoptosis induction and cell cycle distribution were obtained by propidium iodide cell staining and flow cytometry. The mRNA expression of two genes regulated by YAP/TAZ, CTGF and CYR61, as well as RalGPS2 mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Additionally, the effect of RalGPS2 gene silencing on the mRNA expression of genes regulated by YAP/TAZ, in conditions of stimulation of activation of these co-transcription activators by fetal bovine serum, was explored.

RalGPS2 silencing caused growth inhibition in PC-3 ($\approx 59\%$), increased the percentage of spontaneous apoptotic cells. RalGPS2 mRNA expression decreased significantly both at 3 and 5 days after silencing, however, no decrease in expression of CTGF and CYR61 genes was detected. In conclusion, the role of RalGPS2 in controlling proliferation and survival of PC-3 cells does not appear to be associated with serum-induced YAP/TAZ activation in this cell line.

Keywords

Apoptosis; PC-3; Proliferation; Prostate cancer; RalGPS2; YAP/TAZ

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Cancro da próstata.....	2
1.1.1. Carcinogénese e desenvolvimento.....	3
1.1.2. Diversidade morfológica e genética.....	6
1.2. Efeitos de Ras e RalGPS2.....	8
1.3. Via de sinalização Hippo.....	10
1.3.1. YAP/TAZ no cancro da próstata.....	12
1.3.2. Regulação da via Hippo.....	13
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e métodos.....	20
3.1. Cultura celular em condições de adesão.....	20
3.2. Ensaio de avaliação do crescimento em condições de adesão a papel de filtro de celulose.....	20
3.3. Avaliação do crescimento celular e otimização das condições experimentais.....	21
3.4. siRNAs para transfeção de células.....	22
3.5. Estabelecimento das condições de transfeção.....	23
3.6. Avaliação da apoptose (população sub-G1) e distribuição do ciclo celular.....	24
3.7. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	25
3.7.1. Reação quantitativa de PCR em tempo real.....	27
3.7.2. Avaliação da estimulação e inibição de YAP/TAZ na expressão de CTGF e CYR61.....	28
3.7.3. Ativação de YAP/TAZ e silenciamento de RalGPS2.....	28
4. Resultados e discussão.....	29
4.1. Resultados de otimização de condições experimentais.....	29
4.1.1. Ensaio de avaliação do crescimento em condições de adesão a papel de filtro de celulose.....	29
4.1.2. Seleção do ensaio de avaliação da viabilidade celular e otimização das condições experimentais.....	30
4.1.3. Otimização da condição de transfeção com siRNA em células PC-3.....	32
4.2. Efeito do silenciamento de RalGPS2 na morfologia celular.....	34
4.3. Validação da eficiência do silenciamento de RalGPS2 através de análise por qPCR.....	35
4.4. Efeito do silenciamento de RalGPS2 na apoptose e distribuição no ciclo celular.....	

.....	36
4.5. Avaliação da ativação de YAP/TAZ após silenciamento de RalGPS2, estimulação com soro ou inibição com sinvastatina.....	38
4.5.1. Efeito do silenciamento de RalGPS2 na expressão de mRNA de YAP/TAZ	38
4.5.2. Estimulação e inibição de YAP/TAZ.....	39
5. Conclusões e perspectivas futuras	43
6. Bibliografia	45

Lista de Figuras

Figura 1 - Desenvolvimento de cancro da próstata a partir de lesões pré-neoplásicas.....	5
Figura 2 - Domínios estruturais de 3 GEFs específicos das RalGTPases e de um RasGEF.	9
Figura 3 - Ativação e inibição da cascata principal mediadora da via de sinalização Hippo.	11
Figura 4 - Diferentes elementos da via de sinalização Hippo e a sua regulação.	14
Figura 5 - Regulação da via de sinalização Hippo pela interação entre lípidos e proteínas mediada pelo ácido fosfatídico.	16
Figura 6 – Reação de qPCR em dois passos.....	26
Figura 7 - Variação do número de células PC-3 e LNCaP ao longo do tempo, durante um período de incubação de 13 dias em condições de ausência de adesão.	30
Figura 8 - Medições de absorvência e fluorescência ao longo do tempo no ensaio de redução da resazurina, após 5 dias de incubação da linha PC-3.	32
Figura 9 - Percentagem de viabilidade celular obtida para cada condição de transfeção com siRNAs (siLuc, siPLK1, siRalGPS2 #231 e <i>pool</i> RalGPS2) aos 5 dias após a transfeção.	33
Figura 10 – Efeitos do silenciamento de RalGPS2 na morfologia de células PC-3 <i>in vitro</i>	34
Figura 11 - Expressão de mRNA de RalGPS2 aos 3 e 5 dias após transfeção com siLuc (controlo negativo), um <i>pool</i> de siRalGPS2 e siRalGPS2 #231 analisada por qPCR.	35
Figura 12 - Distribuição de células apoptóticas no ciclo celular, 5 dias após a transfeção.	36
Figura 13 - Análise da ativação dos cofatores YAP/TAZ através dos níveis de expressão de mRNA de CTGF e CYR61, obtida por qPCR aos 3 e aos 5 dias de incubação após transfeção.	38

Figura 14 - Análise da expressão de mRNA de CTGF e CYR61 por qPCR após privação e estímulo com FBS 10% durante 30 e 60 minutos e tratamento com sinvastatina (10 μ M) em células PC-3.....40

Figura 15 - Análise da expressão de mRNA de CTGF e RalGPS2 por qPCR, após transfeção com siRalGPS2 #231 e privação (24 h) ou estímulo (60 min) com FBS 10% em células PC-3.41

Figura Apêndice 1 69

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Coeficientes de extinção molar para as formas oxidada e reduzida da resazurina [42].	22
Tabela 2 – Sequências alvo de siRNA. As respetivas sequências de siRNA adquiridas à Eurogentec continham <i>overhangs</i> adicionais de DNA (dTdT).	23
Tabela 3 – Condições de síntese de cDNA.	26
Tabela 4 – Sequências de <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> usados na análise por qPCR.....	27

Lista de Acrónimos

AIP	Atrofias inflamatórias proliferativas
CaP	Cancro da próstata
CPCNP	Carcinoma do pulmão de células não pequenas
CPRC	Cancro da próstata resistente à castração
CTGF	Do inglês, <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CYR61	Do inglês, <i>Cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro fetal bovino
HDL	Do inglês, <i>High Density Lipoprotein</i>
LPA	ácido lisofosfatídico, do inglês, <i>lisophosphatidic acid</i>
LATS 1/2	Do inglês, <i>Large tumor suppressor kinase 1 and 2</i>
MST	Do inglês, <i>STE20-like kinases 1 and 2 (MST1 and MST2)</i>
NF2	Do inglês, <i>Neurofibromatosis type 2</i>
NIP	Neoplasias intraepiteliais prostáticas
PA	Ácido fosfatídico, do inglês, <i>phosphatidic acid</i>
RA	Recetor de Androgénios
RalA	Do inglês, <i>Ras-like A</i>
RalB	Do inglês, <i>Ras-like B</i>
RalGEFs	Fatores de troca de nucleótidos de guanina específicos de Ral, do inglês, <i>guanine nucleotide exchange factors of the Ras-like small GTPases</i>
RalGPS	Do inglês, <i>Ral/PH/SH3-binding GEFs</i>
RNA	Do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
SH3	Do inglês, <i>SRC Homology 3 Domain (or SH3 domain)</i>
siRNA	Do inglês, <i>small interfering RNA</i>
S1P	Esfingosina-1-fosfato, do inglês, <i>Sphingosine-1-phosphate</i>
SRC	Do inglês, <i>family of nonreceptor protein tyrosine kinases</i>

TAZ	Ativador Transcricional com domínio PDZ
TEAD 1-4	Do inglês, <i>TEA Domain transcription factors</i>
YAP	Do inglês, <i>Yes-Associated Protein</i>
Yki	Do inglês, <i>Yorkie</i>

Capítulo 1

Introdução

O cancro continua a representar um grave problema de saúde pública, ocupando uma percentagem significativa da mortalidade mundial. De acordo com as estatísticas de cancro GLOBOCAN2020, da Agência Internacional para a Investigação no Cancro, esta patologia foi responsável por aproximadamente 10 milhões de mortes em todo o mundo [1].

Habitualmente, na progressão tumoral estão implicadas várias alterações genéticas. O ganho de expressão dos cofatores de transcrição YAP1 e WWTR1 (YAP/TAZ), conhecidos reguladores do crescimento dos tecidos e das células estaminais, já foi implicado como uma característica da carcinogénese, assim como o seu papel na metastização [2]. YAP/TAZ encontram-se frequentemente ativos durante o crescimento e progressão de vários tumores sólidos: carcinomas do pulmão, colorretal, da mama, pancreáticos, e do fígado assim como em melanomas e gliomas [3]. A inativação de YAP induz, por exemplo, redução da expressão de Skp2 (uma proteína ubiquitina ligase E3; do inglês, *S-Phase Kinase Associated Protein 2*) e causa a acumulação de p21/p27, induzindo quiescência (paragem do ciclo celular em G₀) [4]. A proteína Skp2 promove a proteólise por ubiquitinação de p27, um inibidor de cinases dependente de ciclinas que regula positivamente a transição entre as fases G₁ e S. A sua sobreexpressão parece estar implicada na oncogénese, tendo um papel no cancro da próstata (CaP), uma vez que foi demonstrada relação entre Skp2 e a diminuição dos níveis de p27, regulada por PTEN. Os níveis de expressão de Skp2 parecem estar envolvidos na progressão do CaP. Em células epiteliais (basais e luminais) da próstata, Skp2 apresenta níveis baixos em comparação com lesões pré-malignas de neoplasias intraepiteliais prostáticas e em CaP, onde aumentam consideravelmente. Os níveis desta proteína foram também correlacionados com uma diminuição da probabilidade de sobrevivência após recorrência bioquímica e prostatectomia [4].

RalGPS2 é um fator de troca de nucleótidos de guanina específico das Ral GTPases com expressão constitutiva, mais acentuada a nível cerebral e testicular. Em linhas de carcinoma do pulmão de células não pequenas (CPCNP), o silenciamento de RalGPS2 inibiu fortemente o crescimento celular [5]. Nas células A549 e H1299 RalGPS2 é necessário para a sobrevivência celular e para a transição do ciclo celular de G₀/G₁ para S. Nas mesmas linhas celulares, o silenciamento de RalGPS2 foi associado à

diminuição de Skp2 e ao aumento dos inibidores da proliferação celular p21 e p27. O silenciamento de RalA e/ou RalB (as proteínas efetoras clássicas conhecidas de RalGPS2) não fenocopiou o efeito do silenciamento de RalGPS2 na regulação destes inibidores. Desta forma, o efeito do silenciamento de RalGPS2 é semelhante ao descrito na inativação de YAP/TAZ. Contudo, o possível envolvimento de RalGPS2 na regulação de células estaminais e dos co-ativadores transcripcionais YAP/TAZ é desconhecido. Nesta dissertação, foi testada a hipótese da necessidade de RalGPS2 para a ativação de YAP/TAZ em cancro da próstata.

Nas seguintes subsecções introdutórias é feita uma revisão da literatura acerca do cancro da próstata e desenvolvimento da carcinogénese, associado a lesões precursoras e a ocorrência de diversas alterações moleculares que originam a diversidade morfológica e genética verificada na patologia. É introduzida a proteína Ral como um membro da família de proteínas Ras, frequentemente mutadas e associadas ao desenvolvimento de cancro, e a família de RalGEFs (responsáveis pela ativação de Ral através da troca de GDP por GTP) à qual pertence RalGPS2, que se distingue por não ter um domínio de ligação a Ras e ser portanto, independente desta proteína para a sua atividade. A via de sinalização Hippo e os vários fatores que contribuem para a sua regulação também são abordados, assim como a implicação dos seus cofatores transcripcionais YAP/TAZ no CaP.

1.1. Cancro da próstata

Na estimativa de cancros mais diagnosticados em 2020, o CaP representa 7,3% dos novos casos mundiais (1,41 milhões de casos). Nos homens, englobando todas as idades, foi o segundo cancro com mais diagnósticos (14,3%), sendo uma das causas principais de morte entre homens nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa Ocidental [1]. Atualmente, nos EUA, o CaP é a segunda causa principal de mortalidade causada por cancro. Em Portugal, no ano de 2020, representou 11,2% dos novos casos de cancro diagnosticados. No mesmo ano, foi o segundo cancro com maior incidência a nível mundial (59,6%) a seguir ao cancro da mama (70,8%) [1].

Verifica-se uma correlação entre a incidência e mortalidade por CaP com o avançar da idade, com uma idade de diagnóstico em média aos 66 anos. A incidência é maior em homens afro-americanos, com o dobro da mortalidade em comparação com caucasianos. Difere também entre países, de acordo com o grau de desenvolvimento, sendo maior nos países desenvolvidos. Em comparação com a Ásia, tanto a incidência como a mortalidade são maiores na Europa Ocidental e nos EUA, sendo que existe um

aumento de incidência e mortalidade em homens asiáticos que imigram para os EUA, o que reforça a importância de fatores relacionados ao estilo de vida e ambiente na patologia [6].

Tanto a nível clínico, quanto ao nível de anormalidades moleculares, existe uma elevada heterogeneidade associada ao desenvolvimento de CaP, para o qual contribuem também diversos fatores, em que se inclui a herança de suscetibilidade genética, defeitos genéticos somáticos, a inflamação prostática e o estilo de vida [6].

1.1.1. Carcinogénese e desenvolvimento

A próstata é composta por células basais, neuroendócrinas, luminais e estroma envolvente, composto predominantemente por células musculares lisas e fibroblastos, assim como células responsivas a androgénios. A maioria dos CaP têm origem na periferia da próstata. As células luminas são colunares (e delimitam o lúmen da próstata) e as basais são células alongadas e fazem a separação entre o lúmen e o estroma. Ambas são distinguíveis patologicamente com recurso a marcadores, como é exemplo o nível de recetor de androgénios (RA) [7]. São recorrentemente observados focos de atrofias no epitélio da próstata com origem em células epiteliais proliferativas, nas quais ocorreram erros na diferenciação a células colunares secretoras. Estes focos são importantes e relevantes para o desenvolvimento da carcinogénese tal como outros fatores anteriormente mencionados, onde se incluem o estilo de vida e dieta, mas também mutações que geram perda de função protetora e a resposta à inflamação e a carcinogénese [6].

O desenvolvimento, crescimento e sobrevivência do epitélio da próstata é regulado por androgénios e pela produção de fatores de crescimento no estroma. Numa fase inicial do CaP, ocorre uma desregulação da estimulação das células por fatores de crescimento. Há promoção do crescimento das células dependentes de androgénios sendo que a ativação da proliferação celular ocorre na ausência dos mesmos. O número de recetores para estes fatores aumenta e há diminuição da dependência por androgénios devido a várias alterações somáticas no RA. A sobreexpressão do RA aumenta a sensibilidade aos androgénios circulantes e várias mutações no recetor, alteram a especificidade do ligando, o que permite a sua ativação por anti-androgénios ou por não androgénios (como os estrogénios). Os tumores tornam-se insensíveis à terapia de inibição hormonal (supressão de androgénios, anti-androgénios ou numa combinação dos dois), a linha primária de tratamento, podendo metastizar para diferentes órgãos [6].

Na ausência de mutações no RA, que implicam a diminuição da especificidade do ligando para o recetor e permitem a sua ativação por não androgénios ou anti-androgénios, o CaP pode progredir através da ativação de vias de sinalização de RA independentes de ligandos. A identificação de alterações moleculares chave nas células cancerígenas permite definir o fenótipo celular, importante para a sua deteção, mas também para o diagnóstico e tratamento. Estas alterações podem estar relacionadas com a defesa contra carcinogénios e/ou a vias de sinalização de fatores de crescimento e androgénios [8].

Foram identificados dois genes hereditários de suscetibilidade para o CaP - RNASEL e MSR1 - que codificam proteínas responsáveis pela resposta a infeções, e reforçam a probabilidade de o início da carcinogénese ser a infeção ou inflamação da próstata. Outra ligação entre CaP e inflamação resulta de lesões precursoras, designadas por atrofia inflamatória proliferativa (AIP). Este termo é aplicado a lesões atróficas focais associadas a uma inflamação crónica, frequentemente adjacentes a lesões de neoplasia intraepitelial prostática (NIP), a CaP ou a ambos [6].

As lesões pré-neoplásicas (maioritariamente AIP) ao progredir a neoplasias intra-epiteliais prostáticas (NIP), dão origem a um tumor benigno, que se desenvolve posteriormente até à metastização (Figura 1). As anomalias genómicas somáticas encontradas nas células de NIP são semelhantes às encontradas em AIP. No entanto, enquanto as NIP se caracterizam por uma proliferação anormal do epitélio sem que ocorra invasão para o estroma, nas AIP verifica-se a progressão para invasão para o compartimento luminal, estando as suas lesões focais frequentemente associadas a inflamação crónica [9]. Esta associação a inflamação crónica sugere que as lesões associadas a AIP surgem devido a uma resposta proliferativa das células epiteliais aos oxidantes inflamatórios libertados pelas células inflamatórias, os quais são responsáveis pelos danos celulares e genómicos. Em células de AIP são verificados sinais de *stress* molecular, nomeadamente níveis elevados de GSTA1 (Glutathione S-transferase A1) e de ciclooxigenase-2 (COX-2). A perda de função protetora do gene GSTP1 (que codifica a enzima Glutathione S-Transferase Pi 1) está associada a instabilidade genómica durante a transição entre células de AIP, NIP e de CaP, provavelmente devido à hipermetilação das sequências da ilha CpG de GSTP1, o que conduz ao aumento da vulnerabilidade da próstata a danos genómicos causados por oxidantes inflamatórios e por carcinogénios. Alguns dos genes somáticos alvo destes danos são NKX3.1 (um gene *gatekeeper*), PTEN e RA (que podem modificar a progressão de CaP) [6].

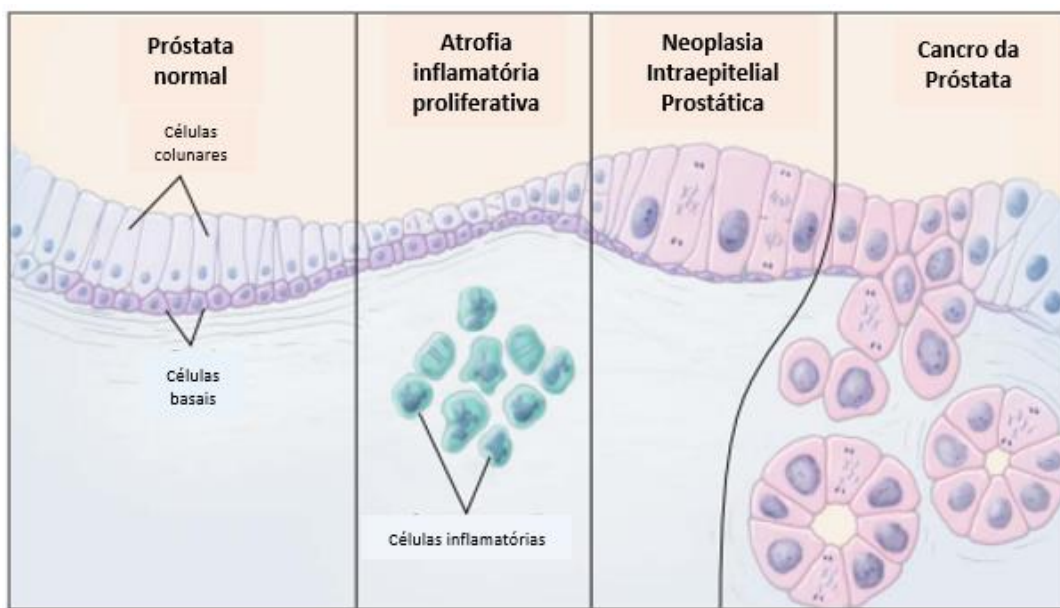


Figura 1 - Desenvolvimento de cancro da próstata a partir de lesões pré-neoplásicas.

Adaptado de [6].

Na classificação do CaP de acordo com a escala de Gleason, é atribuída importância à morfologia única de cada tumor, uma vez que existem diversas variantes a nível morfológico, assim como a nível genético. A grande maioria dos CaP (> 95%), são classificados como adenocarcinomas acinares. Derivam de células secretórias luminiais da próstata, responsáveis pela produção do plasma seminal, e são positivos para o RA. Existem diversas outras variantes raras deste tipo de carcinoma, classificadas histologicamente com diversos subtipos (adenocarcinoma ductal, sarcomatoide, de tipo urotelial e o carcinoma de pequenas células), normalmente associados a pior prognóstico [10]. Esta caracterização é essencial para a classificação do tumor, conduzindo à escolha do tratamento mais adequado. Como exemplo, existe uma correlação positiva entre o grau da escala de Gleason, o estado (ou estadió) tumoral e entre o volume das NIP e o risco de desenvolvimento posterior de carcinogénese [11].

No processo de transformação neoplásica de uma célula, estão envolvidos diversos fatores que desencadeiam alterações em proto-oncogenes, genes supressores tumorais ou em genes com funções diversas a nível celular. Ao interferir com a homeostase celular, as alterações genéticas ou epigenéticas causam uma desregulação dos mecanismos celulares que controlam a morte ou proliferação. Esta desregulação pode desencadear uma ativação exacerbada das funções celulares, pela expressão anormal de proteínas envolvidas em vias de sinalização, mutações, rearranjos, hipometilações e amplificações, ou pela perda de função associada ao silenciamento, hipermetilação, mutações e deleções de genes [11]. O mesmo ocorre no CaP, onde a transformação

neoplásica das células se caracteriza pela inativação de genes supressores tumorais e pela ativação de oncogenes.

As diversas mutações somáticas, deleções, alterações na metilação do DNA, rearranjos cromossómicos, entre outras encontradas nas células deste cancro, resultam de uma presumível acumulação ao longo do tempo, sendo diagnosticadas passado décadas. Verifica-se a perda de expressão de genes envolvidos no controlo de processos celulares como o ciclo celular, a adesão celular, a apoptose e reparação de danos no DNA e a ativação de genes envolvidos na angiogénese, proliferação celular, invasão e metástase [3,8].

1.1.2. Diversidade morfológica e genética

O desenvolvimento lento deste cancro, com uma fase pré-clínica longa, faz aumentar o número de diagnósticos tardios, assim como erros no diagnóstico. Antes que os sintomas se manifestem clinicamente, muitos pacientes morrem de outras causas [12]. Prova disso mesmo é que, quando diagnosticado precocemente, o risco de morte por cancro da próstata a 10 anos é inferior a 1%, mesmo sem qualquer tratamento inicial (apenas vigilância ativa) [13].

A metástase é um dos principais determinantes da morte por cancro estando associada a um mau prognóstico com uma taxa de sobrevivência de apenas 31% [6,14]. Ao contrário do CaP localizado, que tem uma taxa de sobrevivência de 5 anos superior a 99%, o cancro avançado – definido por apresentar metástases por recorrência após uma terapia irreversível (como cirurgia e/ou radiação) ou sem terapia pré-existente – é geralmente considerado incurável [15]. O CaP resistente à castração (CPRC) é um estado de recidiva que surge após várias formas de terapia e que causa morbidade e mortalidade significativas. Normalmente é detetado pela ativação aberrante do RA, e a progressão para este estado promove perturbações em vias de sinalização envolvidas na progressão do ciclo celular e proliferação descontrolada [7].

Uma das teorias mais relevantes acerca da progressão maligna com o surgimento de metástases é a de Rudolf Vichow, a qual defende que a inflamação crónica, assim como a constante ativação dos processos de regeneração de um tecido, são promotores da progressão tumoral. A outra pertence a Theodore Boverie e implica danos nos cromossomas [2]. De facto, com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciação, tem-se verificado o avanço no conhecimento da genética associada ao CaP. *Screenings*

genéticos (fundamentados pela teoria de Boverie) identificaram mutações que contribuem para a carcinogénese, assim como a predominância de diversas vias de sinalização celular, como a de Ras e PI₃K/PTEN/Akt, e das alterações na regulação do ciclo celular e da cromatina [8,9]. Estes achados são importantes para o conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos e o desenvolvimento de terapias mais específicas.

Caracterizado pela sua elevada heterogeneidade e complexidade, no CaP verifica-se um número baixo de anormalidades em genes específicos. Para além de vários genes terem sido implicados na sua progressão, existem variações genéticas entre pacientes que desenvolvem CPRC. As alterações mais comuns são fusões entre promotores regulados por androgénios e fatores de transcrição oncogénicos, como o ERG (do inglês, *ETS-related gene*; associado a reincidência bioquímica após prostatectomia), entre outros membros da família ETS, envolvidos na regulação da proliferação celular e do desenvolvimento embrionário, na angiogénese, inflamação, e apoptose [9,10]. Esta fusão, presente em sensivelmente metade dos casos de CaP, é observada tanto no cancro primário como metastático e está maioritariamente associada a cancros diagnosticados em idade precoce (≤ 50 anos de idade). A mais comum ocorre entre o gene TMPRSS2 (regulado por androgénios; do inglês, *Transmembrane Serine Protease 2*) e o fator de transcrição ERG [16].

Os tumores sólidos são tipicamente compostos por células geneticamente heterogéneas, isto é, com várias alterações genéticas distintas. Representam assim um conjunto de várias populações de células tumorais com características genéticas e fenotípicas únicas. Esta heterogeneidade subclonal é encontrada no CaP. Para além disso, o CaP primário distingue-se de outros tumores sólidos por apresentar focos tumorais diferentes, localizados em múltiplas regiões distintas na próstata, os quais apresentam perfis de mutações independentes, únicos e sem semelhança entre si. Há, portanto, a possibilidade de um paciente apresentar vários tumores distintos. O surgimento destes subclones resulta da diversidade de anormalidades genéticas que ocorrem durante a progressão, determinadas por danos na reparação do DNA e na sinalização via RA, assim como por mutações e/ou deleções de genes [8]. As alterações genéticas, que podem resultar na expressão de proteínas anormais e na disrupção de diversas vias de sinalização regulatórias distintas, promovem o início ou a progressão. Como já referido, embora seja claro que alterações genéticas como a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes, contribuem para o processo, os mecanismos moleculares que contribuem para a carcinogénese não são claros.

1.2. Efetores de Ras e RalGPS2

As proteínas (*small* GTPases) Ras são mutadas muito frequentemente e associadas a vários tipos de cancro humano, representando 16% dos CaP [17]. Entre os membros de uma das subfamílias de Ras, as proteínas Ral (“*Ras-like*”) são um dos parentes mais próximos a Ras. Existem duas isoformas de Ral - RalA (*Ras-like* A) e RalB (*Ras-like* B) - com elevada semelhança entre si, e que atuam na via de sinalização RalGEF-Ral a *downstream* de Ras [18].

A importância do papel da via de sinalização RalGEF-Ral na oncogénese surgiu como consequência da descoberta das suas proteínas efetoras, RalA e RalB, como membros próximos de Ras, assim como pela possibilidade de constituírem alvos terapêuticos [11,12].

Apesar da elevada semelhança nas suas sequências, estas RalGTPases têm diferentes contribuições para a regulação de diversos processos celulares e para a oncogénese [18]. Estudos em diferentes linhas celulares tumorais humanas atribuem, na generalidade, funções de RalA na proliferação independente de ancoragem e de RalB na sobrevivência celular, formação de metástases e invasão. No CaP, vários estudos centram-se na importância da via de sinalização RalGEF-Ral como promotora da metástase óssea, assim como nas proteínas RalA e RalB, associadas à progressão independente de androgénios e invasão da vesícula seminal [17]. Em tumores metastáticos de pacientes com CaP, a expressão aumentada de mRNA de RalA, foi identificada como útil na avaliação do nível de agressividade tumoral [19]. No entanto, a importância das suas funções no crescimento tumoral, bem como os seus efetores não estão claramente definidos.

A ativação das RalGTPases, pela ligação de GTP, é regulada por fatores de troca de nucleótidos de guanina específicos de Ral (RalGEFs). Foram identificados seis RalGEFs em humanos, os quais se dividem em duas famílias diferentes, de acordo com a presença de domínios de ligação às suas proteínas efetoras (Figura 2). Quatro destes RalGEFs apresentam em comum, na sua estrutura, um domínio C-terminal de ligação a Ras (RA). Portanto, são efetores de Ras, assim como das *small* GTPases Rap e R-Ras, e pertencem à família RalGDS (do inglês, *Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator*). Os restantes RalGEFs conhecidos em humanos, RalGPS1 e RalGPS2, distinguem-se por apresentar um domínio de homologia com a pleckstrina (PH, do

inglês, *pleckstrin homology*), em vez de um domínio de ligação a Ras. Desta forma, a ativação de RalGPS1 e de RalGPS2 (RalGEFs com domínio PH e um motivo de ligação ao domínio SH3, do inglês *Ral/PH/SH3-binding GEFs*) é feita de forma independente de Ras [20].

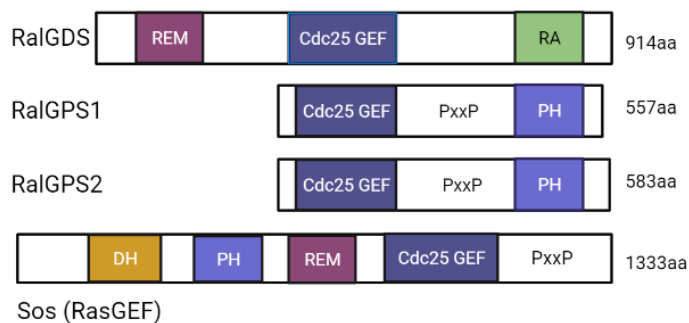


Figura 2 - Domínios estruturais de 3 GEFs específicos das RalGTPases e de um RasGEF.

REM, motivo de troca Ras; Cdc25 GEF, motivo de homologia Cdc25; RA, Ras, domínio de associação a Ras; PH, domínio de homologia de pleckstrin; PxxP, motivo rico em prolina; DH, domínio de homologia a Dbl; GAP, domínio de proteínas ativadoras de GTPase; aa, aminoácidos. Adaptado de [18].

Os estudos feitos até à data focaram-se principalmente na importância das RalGTPases e na sua regulação por RalGEFs de forma dependente de Ras. A evidência limitada acerca dos RalGEFs da família RalGPS indica a sua possível regulação por Grb2 (do inglês, *Growth factor receptor-bound protein 2*) e fosfolípidos, uma vez que o motivo PxxP rico em prolina, localizado na parte central da proteína, permite a ligação a proteínas adaptadoras com domínio SH3, como Grb2 e Nck (do inglês, *non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*). O seu domínio PH mostrou ligar-se preferencialmente a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂; do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*) e ser necessário para a localização de RalGPS2 na membrana celular [10,13].

RalGPS2 tem expressão fisiológica constitutiva, mas mais significativa nos testículos e cérebro [20]. É também expresso em linfócitos B imaturos e de memória. A nível celular tem expressão aumentada em certos tipos de células como os espermatozoides e as células fotorreceptoras de bastonete e de cone [21].

RalGPS2 foi descrito como tendo um papel importante no início da citocinese de células de cancro cervical HeLa [22]. Em células de carcinoma da bexiga, o silenciamento de RalGPS2 inibiu o crescimento celular [23], em concordância com um estudo em linhas de carcinoma do pulmão de células não pequenas (CPCNP), no qual se procedeu ao silenciamento de genes RalGEF em linhas celulares associadas a

diferentes mutações de Ras [5]. RalGPS2 destacou-se de todos os outros RalGEFs dependentes de Ras por o seu silenciamento ter inibido o crescimento da população celular com maior intensidade, em quatro linhas celulares de CPCNP. Verificou-se o seu papel essencial na sobrevivência celular e na transição do ciclo celular de G₁ para S nas linhas H1299 e A549. Nas mesmas linhas celulares, o silenciamento de RalGPS2 foi associado à diminuição de Skp2 e à regulação dos inibidores da proliferação celular p21 e p27. O silenciamento de RalA e/ou RalB não fenocopiaram o efeito do silenciamento de RalGPS2 na regulação destes inibidores e não se verificou a sua influência na ativação de Ral [5].

1.3. Via de sinalização Hippo

A via de sinalização Hippo, tal como as proteínas da sinalização Ral-RalGEF, encontra-se conservada evolutivamente entre espécies, incluindo-se a espécie humana. É a via de sinalização responsável pelo controlo do tamanho de órgãos. A sua ativação resulta numa cascata de fosforilação que, ao sequestrar os seus co-ativadores de transcrição YAP/TAZ no citoplasma, impede a expressão dos genes sob a sua regulação. Desta forma, tem importância no desenvolvimento, mas também na carcinogénese, por se tratar de uma via com funções de controlo no crescimento e de supressão tumoral [24].

A descoberta desta via surgiu através de *screenings* genéticos em *Drosophila melanogaster*, que procuravam identificar genes envolvidos no controlo do crescimento de tecidos. Foram isolados os genes *hippo*, *salvador* e *warts*, por partilharem o mesmo fenótipo de promoção do crescimento celular aberrante. Com as sucessivas identificações dos restantes membros da via de sinalização, foi reconhecido o seu papel importante no controlo do crescimento e da proliferação celular, assim como na regulação da homeostase e regeneração celular e consequentemente, no crescimento de tecidos e de órgãos [25]. A via de sinalização Hippo desempenha também um papel importante no desenvolvimento de células estaminais, estando envolvida na especificação do destino/função das células embrionárias, durante a sua pré-implantação [26].

Em *Drosophila*, o único homólogo dos co-ativadores YAP (do inglês, *Yes-Associated Protein* ou YAP1) e TAZ (Ativador Transcricional com domínio PDZ, ou WWTR1), designado por *Yorkie* (Yki), permitiu identificar o seu papel oncogénico. A fosforilação de Yki pela cinase *Warts* (LATS1/2 em humanos) induz a sua ligação às proteínas 14-3-3 e a sua retenção no citoplasma, o que impede a sua translocação para o núcleo, onde

inicia a transcrição. Yki, tal como YAP/TAZ, é um co-ativador do fator de transcrição da família TEAD – *Scalloped* – que permite a expressão de genes anti-apoptóticos e promotores de proliferação. De forma semelhante, os elementos principais da via homóloga em humanos, compõem uma cascata de cinases serina-treonina que têm como efetores os co-ativadores transcricionais YAP/ TAZ [2].

Fisiologicamente, a via de sinalização Hippo, inibe a atividade conjunta de YAP/TAZ (Figura 3) [27]. Quando a via está ativa, este processo ocorre através de fosforilação, iniciada pelas cinases MST1/2 que ativam o supressor tumoral LATS1/2 por fosforilação. Este, por sua vez, suprime YAP/TAZ também por fosforilação, sendo retidos no citoplasma pela proteína 14-3-3 e posteriormente ubiquitinados e degradados via proteassoma. No núcleo, VGLL4 (do inglês, *Vestigial Like Family Member 4*, ligado a fatores de transcrição da família TEAD (TEAD1-4), encontra-se a inibir a expressão de genes [25].

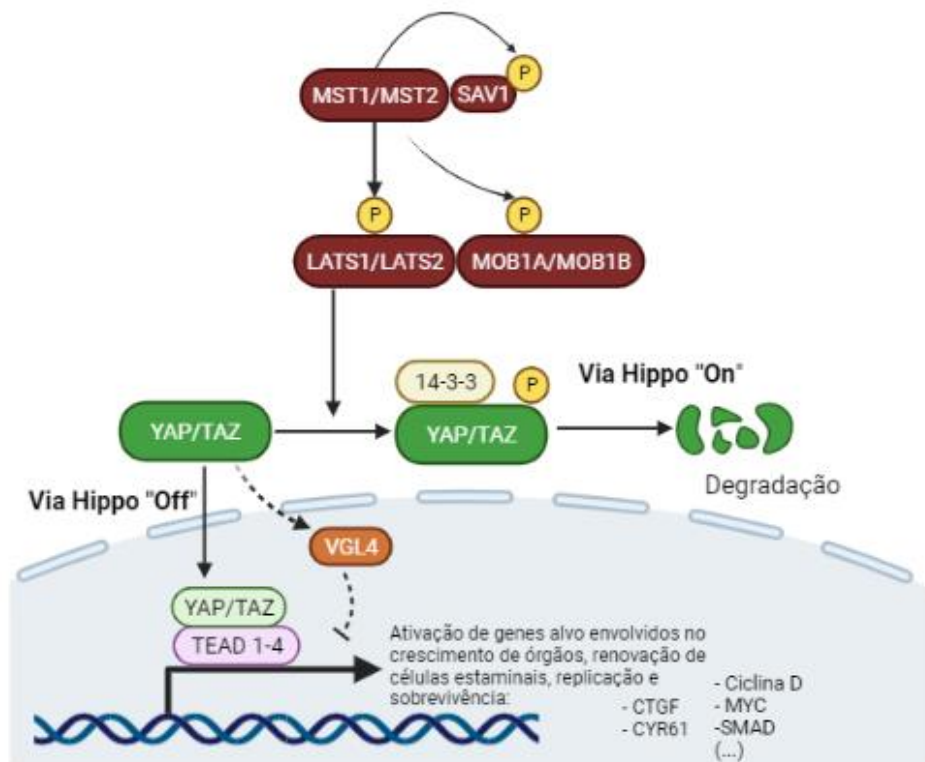


Figura 3 - Ativação e inibição da cascata principal mediadora da via de sinalização Hippo.

Adaptado de [27].

Caso a via se encontre inativa, YAP/TAZ não são fosforilados pelas cinases LATS, e é possível a sua translocação para o núcleo da célula. Uma vez que não apresentam domínios de ligação ao DNA, ligam-se a TEAD1-4 para iniciar a transcrição de genes

envolvidos em vários processos celulares como a proliferação, migração e sobrevivência celular [25].

A inibição da apoptose e promoção da proliferação celular pela desregulação da atividade desta via de sinalização, a qual se encontra aumentada em diversos tipos de cancro, aparenta apresentar a simples solução terapêutica de redução ou inibição de YAP/TAZ. No entanto, não se trata de um alvo terapêutico convencional. A sua complexidade resulta, entre outros fatores, da ausência de atividade catalítica conhecida e da sua regulação por uma rede complexa de sinais intra e extracelulares. Ainda assim, já foram descritos alguns inibidores de moléculas pequenas na tentativa de inibição das interações proteína-proteína, considerados alvos terapêuticos difíceis [27].

1.3.1. YAP/TAZ no cancro da próstata

Durante a progressão do CaP, a regulação de YAP, assim como a interação com outras proteínas, é alterada. A sobreexpressão de YAP em células epiteliais da próstata normais conduz ao aumento da sua migração e à formação de colónias e está envolvido em múltiplas fases da patologia [28]. O mecanismo responsável por induzir a hiperativação de YAP/TAZ nas fases iniciais do CaP, bem como no desenvolvimento de CPRC ainda não foi descrito. No entanto, já foram identificados vários componentes-chave importantes a considerar na desregulação desta via de sinalização no CaP.

O RA é o recetor de transcrição nuclear responsável pela ativação da transcrição do gene alvo PSA (do inglês, *Prostate Specific Antigen*). A ligação do RA à dihidrotestosterona permite a sua dissociação e translocação para o núcleo da célula, sendo indispensável na regulação da sinalização entre as células epiteliais da próstata e o estroma. A desregulação desta sinalização, causada por mutações, amplificações e/ou sobreexpressão, conduz à iniciação e ao desenvolvimento de CPRC, o qual já foi associado à ativação de YAP/TAZ [29].

O RA foi identificado como um dos cofatores transicionais de YAP, localizado na região promotora do gene de PSA. Nas linhas celulares PC-3 e LNCaP, verificou-se a desregulação da expressão e localização das proteínas YAP (fosforiladas ou não) e o *knockdown* do gene YAP mostrou diminuir a proliferação e migração celular e conduzir à supressão de genes alvo do RA [28].

Em condições fisiológicas normais, o RA forma um complexo com a enzima EZH2 e a DNA metiltransferase 3, na região promotora de YAP, suprimindo a sua transcrição. No

entanto, foi mostrado que, após inibição farmacológica do RA, existe uma ativação da expressão do gene YAP, que promove a expressão dos fatores de transcrição Nanog e SOX2 (do inglês, *SRY-Box Transcription Factor 2*), envolvidos na autorrenovação de células estaminais embrionárias, e conseqüentemente a regressão de células do CaP a células estaminais/progenitoras. Há assim uma associação entre a inibição de YAP e a prevenção de recorrência de CaP após terapias de privação de androgénios. YAP, regulado de forma negativa pelo RA, tem influência no desenvolvimento de CPRC [30].

As células estaminais presentes no microambiente tumoral da próstata podem também ser reguladas por um mecanismo que envolve a atividade da fosfodiesterase 5 (PDE5), indutora da ativação das cinases LATS/MST da via Hippo e da degradação de TAZ no citoplasma. A inibição de TAZ ou de PDE5 mostraram ser eficientes na redução de marcadores associados a células estaminais [31].

1.3.2. Regulação da via Hippo

A via Hippo é regulada por múltiplos estímulos, os quais compõem uma rede de sinais envolvidos noutros processos celulares como a morfologia, adesão e polaridade celular não havendo, portanto, um recetor ou um uma molécula de sinalização específicos para a sua regulação.

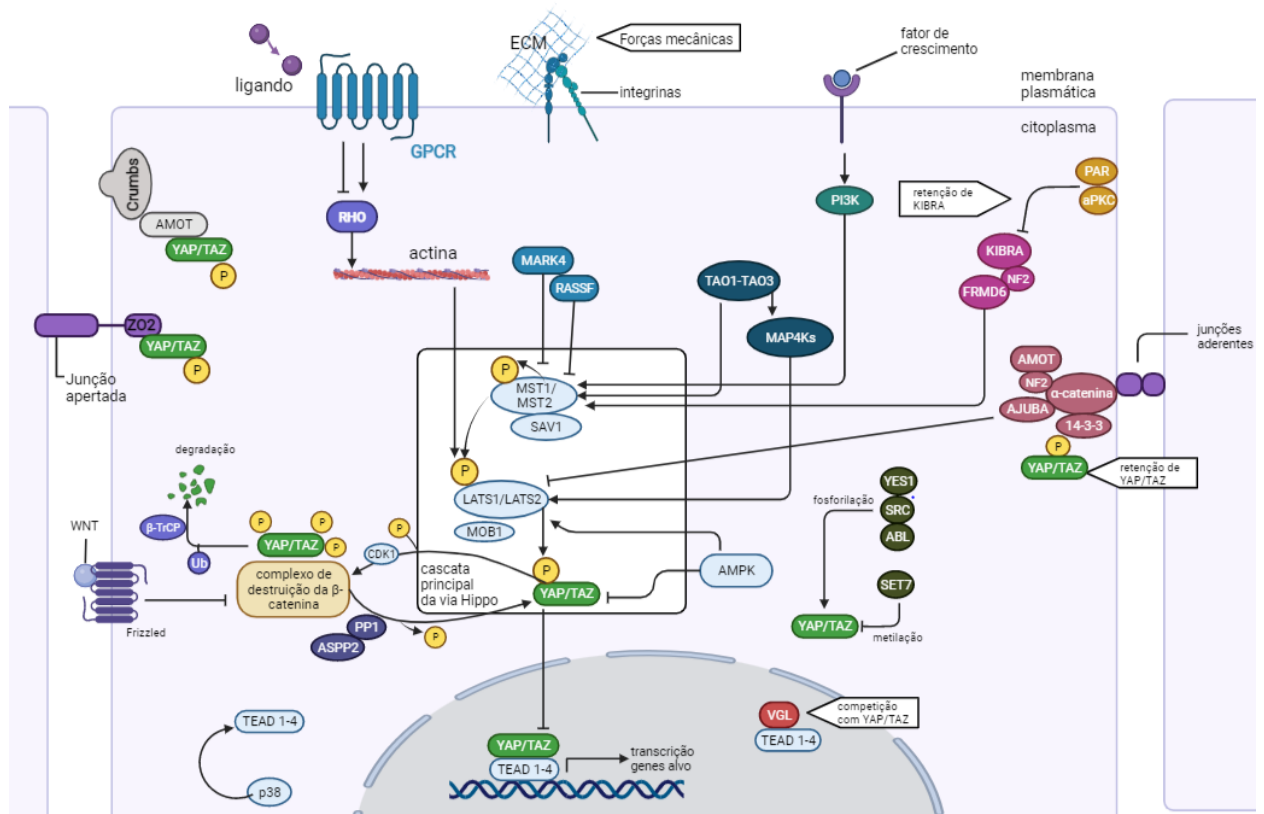


Figura 4 - Diferentes elementos da via de sinalização Hippo e a sua regulação.

Adaptado de [32].

Funciona assim como um sensor que responde ao comprometimento da integridade celular por vários *stresses*, como o contacto intercelular, alterações no microambiente circundante ou na adesão à matriz extracelular e a disponibilidade de nutrientes [32].

Têm vindo a ser identificados vários mecanismos de regulação independentes das cinases da via de sinalização principal, abrindo novos caminhos para possíveis inibidores terapêuticos. Ainda assim, as implicações das funções de YAP/TAZ em mecanismos celulares e metabólicos são em grande parte ainda desconhecidas.

As junções intercelulares, nas quais se incluem as junções de oclusão e as aderentes, são utilizadas pelas células epiteliais para adesão entre si e estabelecem a polaridade apico-basal através da divisão da membrana plasmática nos domínios apical e basolateral [34]. Em densidades celulares elevadas, os contactos estabelecidos entre as células transmitem sinais inibitórios ao crescimento, os quais são transmitidos pela via Hippo. Este é um dos mecanismos principais pelo qual a via de sinalização regula o crescimento de tecidos e órgãos, restringindo o crescimento e proliferação celular, apresentando-se também como essencial no desenvolvimento embrionário. Com o aumento das junções aderentes e das junções apertadas entre células confluentes, há ativação das cinases LATS e consequente supressão de YAP/TAZ [25].

Os complexos de proteínas envolvidas na polaridade apico-basal da célula estabelecem um contacto direto com a cascata de cinases principal desta via de sinalização, tendo sido identificados como reguladores *upstream* na via. Incluem-se as proteínas da família angiomotina (AMOT), a integrina SRC (do inglês, *family of nonreceptor protein tyrosine kinases*), a E-caderina (interage com o complexo formado entre 14-3-3 e YAP/TAZ através da proteína α -catenina), os *scaffolds* proteicos AJUBA/TRIP6/LIMD1 (regulam LATS), e proteínas como NF2 (proteína do citoesqueleto neurofibromina) a qual é reconhecida como supressor tumoral uma vez que consegue ativar LATS_{1/2} [2]. Em específico, é dada especial relevância à proteína de junções celulares apertadas angiomotina e à proteína α -catenina. Estas duas proteínas são reconhecidas pelo seu importante papel regulatório, como mediadoras entre a adesão celular e a regulação de YAP uma vez que podem ligar-se diretamente ao cofator transcricional e alterar a sua localização, bem como a fosforilação dos seus resíduos de Ser127 [28]. A α -catenina, como componente das junções aderentes, é especialmente reconhecida como responsável e crítica para o fornecimento de informações de adesão de células vizinhas [26].

As alterações na morfologia da célula (no citoesqueleto de actomiosina) causadas por diferentes sinais mecânicos provenientes do meio envolvente, são sinalizadas através de integrinas em contacto com a matriz extracelular e induzem a translocação de YAP/TAZ para o núcleo, por um mecanismo desconhecido. A rigidez da matriz extracelular pode regular YAP/TAZ através do rearranjo de Rho GTPase e do citoesqueleto, independentemente das cinases da cascata principal da via Hippo. Uma vez que o citoesqueleto pode responder a e integrar estes sinais, os filamentos de actina (F-actina) têm um papel importante na adaptação das células a estes (fisiologicamente ou na tumorigénese), podendo resultar na sua proliferação, apoptose ou diferenciação e migração. Em *Drosophila*, a polimerização de F-actina induz o aumento do crescimento de órgãos através da ativação de Yki (homólogo de YAP/TAZ) [33].

A via Hippo pode também ser regulada por sinais provenientes de uma *crosstalk* com outras vias de sinalização, onde se inclui a via PI3K. Alguns fatores de crescimento, como os lípidos ácido lisofosfatídico (LPA, do inglês, *lysophosphatidic acid*) e esfingosina-1-fosfato (S1P) e hormonas (glucagon, adrenalina, a trombina), sinalizam através de recetores acoplados a proteínas G (GPCRs, do inglês, *G protein-coupled receptor*) e induzem YAP/TAZ através da F-actina [27].

O soro fetal bovino (FBS) é o suplemento mais utilizado para a cultura de células eucarióticas *in vitro*, sendo uma fonte essencial de nutrientes como fatores de crescimento, hormonas, hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos e lípidos.

Um estudo focado na análise de componentes lipídicos presentes no FBS identificou o lípido de sinalização esfingosina-1-fosfato (S1P) como um ativador de YAP. No soro, S1P encontra-se em grande parte (65%) ligado a lipoproteínas, principalmente a lipoproteínas de elevada densidade (HDL, do inglês, *High Density Lipoprotein*), e regula funções celulares como a proliferação, diferenciação e a migração. S1P ao desfosforilar os resíduos de Ser127 de YAP, regula a sua transcrição nuclear e ativação, induzindo a expressão de CTGF e CYR61. O decréscimo da concentração de FBS mostrou induzir dramaticamente a retenção citoplasmática de YAP e a fosforilação de Ser127, de forma independente das cinases MTS1/2 e LATS1/2 em células renais embrionárias humanas HEK293A [34].

O ácido lisofosfatídico é, tal como S1P, um lípido regulador da atividade de YAP presente no soro e também um componente celular derivado primariamente de fosfolípidos da membrana, que atua através da ligação a recetores acoplados a proteínas G e de sinalização por RhoGTPases [35], que respondem não só a estímulos

mecânicos indutores de alterações no citoesqueleto de actina, como a *stress* energético, e a componentes lipídicos e intermediários lipídicos da via do mevalonato. Induzem também a atividade da fosfolipase A, que converte o ácido fosfatídico (PA) em LPA.

Os lípidos S1P e LPA apresentam níveis elevados em vários tipos de cancro. No CaP, foram identificados seis recetores de LPA (LPA1-6) que podem acoplar-se a diferentes proteínas G e ativar várias cascatas de sinalização responsáveis pela migração (Rho/Rock e PI3K/Rac), proliferação e sobrevivência (Ras/MAPK e PI3K/Akt). Pode ainda ativar a sinalização via fosfolipase C e assim induzir a produção de Ca^{2+} através do segundo mensageiro inositol trifosfato (IP_3) e a ativação da proteína cinase C por DAG. Em células neoplásicas de CaP PC-3 e DU-145 (insensíveis a androgénios), foi identificada uma expressão mais elevada do recetor LPA1, o qual pode induzir qualquer uma das vias de sinalização mencionadas [36].

Normalmente, a inativação de YAP inicia-se pelas cinases LATS 1/2, que podem ser ativadas por MST1/2 (ou pelas cinases MAP4K e TAOK). Na membrana plasmática, LATS 1/2 formam um complexo com NF2 e a proteína adaptadora MOB1. MOB1 é necessária para a ativação de NF2 que, por sua vez, facilita a translocação de LATS para a membrana, onde ocorre a sua fosforilação e ativação, que permite a retenção de YAP/TAZ no citoplasma (Figura 5). O facto de a via de sinalização Hippo ser controlada principalmente por regulação negativa pelas cinases MST1/2 e LATS 1/2 torna difícil a sua inibição farmacológica.

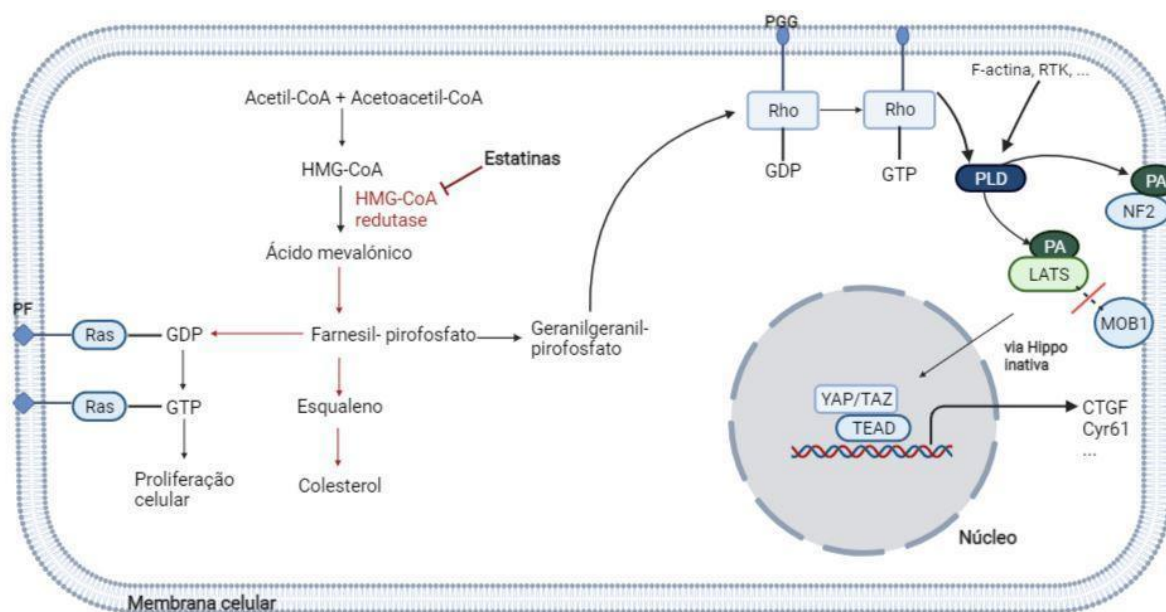


Figura 5 - Regulação da via de sinalização Hippo pela interação entre lípidos e proteínas mediada pelo ácido fosfatídico. Adaptado de [37] e [38].

No entanto, o PA, quando presente, interage com LATS e NF2 a *upstream* na via Hippo, e impede a formação do complexo entre LATS e MOB1, assim como a translocação de LATS mediada por NF2. A fosforilação de YAP não ocorre, permitindo que ative a transcrição genética (Figura 5) [37].

O efeito da estimulação com FBS já foi testado em PC-3, tendo-se avaliado o efeito na expressão de genes com possível influência na via de sinalização Hippo, não mostrando ter influência na via de sinalização regulada por proteínas AMOT, localizadas na junções apicais de células epiteliais, quando avaliadas as suas funções na promoção de tumorigénese pela expressão de YAP/TAZ [39]. Noutro estudo na mesma linha celular, o soro mostrou induzir a invasão e promover a formação de canais microvasculares por células metastáticas ou células tumorais agressivas. O processo foi descrito pela ativação de EphA2 (um recetor de proteínas da família efrina-A presentes em células adjacentes) e o aumento da twist/VE-caderina, com consequente ativação da via de sinalização PI3K/Akt. Esta sinalização dependente de contacto intercelular resultou num aumento da colagenase MMP-2, responsável pela quebra da matriz extracelular e da membrana basal, assim como de LAMC2 (proteína mediadora de adesão celular; do inglês, *Laminin subunit gamma-2*) conduzindo, em conjunto, ao processo de metástase e invasão de PC-3 [40].

Como referido anteriormente, a via do mevalonato é uma via metabólica cujos intermediários estão envolvidos na regulação de YAP/TAZ. A inibição da enzima responsável pela etapa limitante da reação de produção de colesterol desta via, a HMG-CoA redutase, por uma classe de fármacos designados por estatinas, influencia localização e a ativação de YAP/TAZ (Figura 5) [37,38].

O espetro de ações das estatinas não se limita à redução dos níveis de colesterol, razão pela qual constituem a linha primária e secundária de prevenção de doenças cardiovasculares, tendo vários outros efeitos independentes (pleiotrópicos), relacionados com a inibição da síntese de isoprenóides (ou terpenóides). Ao inibir a enzima HMG-CoA redutase, que catalisa a conversão de HMCoA em ácido mevalónico, as estatinas promovem a inibição de YAP/TAZ em múltiplas linhas celulares (de cancro da mama, dos ovários, adenocarcinoma pancreático, CPCNP, entre outros)[38].

Da via de síntese do colesterol, resulta a síntese dos terpenóides - pirofosfato de geranylgeranyl (PGG) e pirofosfato de farnesil (PF) – através de processos designados por geranylgeranilação e farnesilação, respetivamente. O PGG e o PF conseguem ligar-se a GTP e associar-se a moléculas de sinalização intracelular na membrana celular

(Figura 5). O PGG liga-se à Rac e/ou a RhoGTPases, associadas à formação de espécies reativas de oxigénio e à ativação da via pró-inflamatória e o PF liga-se à proteína Ras, com funções na proliferação celular [37]. A translocação da proteína Ras para a membrana está dependente da farnesilação de Rho e Rac é dependente da geranylgeranilação.

A inibição da ativação de RhoGTPases por PGG, impede a ativação da fosfolipase D, responsável pela produção de PA e assim não ocorre a ativação de YAP. Desta forma, as estatinas conseguem inibir a ativação da via Hippo numa sinalização dependente do lípido PA (Figura 6).

Capítulo 2

Objetivos

Este trabalho focou-se na avaliação da hipótese de RalGPS2 ser necessário à ativação de YAP/TAZ na linha celular de CaP PC-3. Para tal, foram usadas várias abordagens experimentais de modo a:

- Estabelecer condições de avaliação do crescimento celular em suspensão/esferóides segundo a técnica de adesão a papel de filtro de celulose (descrita como forma de promover o enriquecimento em células estaminais).
- Otimizar as condições de transfeção celular com siRNA.
- Avaliar o efeito do silenciamento de RALGPS2 no crescimento celular.
- Avaliar o efeito do silenciamento de RALGPS2 na indução espontânea de apoptose e na distribuição do ciclo celular.
- Avaliar o nível de ativação dos cofatores de transcrição YAP/TAZ após silenciamento de RALGPS2 (por avaliação dos níveis de mRNA de 2 genes sob a sua regulação: CTGF e CYR61).

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1. Cultura celular em condições de adesão

As linhas celulares PC-3 (carcinoma da próstata; ATCC: CRL-174) e LNCaP (adenocarcinoma da próstata, grau IV; ATCC: CRL-3471) foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, com L-Glutamina e vermelho de fenol; BioWest, França) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado por calor, 10 mM de HEPES, 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 1 mM de piruvato de sódio e 1% penicilina/estreptomicina (Merck, Alemanha).

As células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO_2 e mantidas em condições de crescimento exponencial, sendo subcultivadas assim que atingissem uma confluência de aproximadamente 80%, importante para manter a integridade das linhas celulares, e também de forma a garantir a quantidade de células suficientes para cultivar e realizar os ensaios necessários.

No procedimento de subcultura, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x [NaCl 137 mM (8,007 g/L), KCl 2,7 mM (0,201 g/L), Na_2HPO_4 10 mM (1,42 g/L) e KH_2PO_4 2,0 mM (0,272 g/L)] e colocadas em suspensão recorrendo-se ao uso de uma solução de tripsina (125 mg/L), EDTA (1 mM) e glucose (0,1%) em PBS (1 x) a pH 7,4, sendo posteriormente diluídas em meio fresco.

3.2. Ensaio de avaliação do crescimento em condições de adesão a papel de filtro de celulose

Para avaliação do crescimento em suspensão/esferóides, foi aplicada uma técnica de adesão a papel de filtro de celulose [41]. As linhas PC-3 e LNCaP foram semeadas em placas de 35 mm revestidas com agarose (1,5%) (*Fisher Scientific*, EUA) e com um disco de papel de filtro qualitativo esterilizado, a uma densidade de 800000 células/mL num volume de 1,6 mL de meio RPMI completo.

Após os tempos de incubação de 2, 4, 6, 8, 10 e 13 dias, o disco de papel de filtro foi removido para uma nova placa de cultura de 35 mm, procedendo-se à lavagem com PBS 1x, e à adição de 1 mL de tripsina-EDTA-glucose de forma a fazer soltar as células

em adesão. Após incubação durante 15 minutos a 37 °C, foi adicionado meio de cultura RPMI completo para inativação da ação da tripsina. A suspensão celular foi transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada a 250 × g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 100 µL de meio completo, sendo contadas a células viáveis com igual volume de corante azul de tripano (i.e., *trypan blue*), em câmara de Neubauer, no microscópio invertido. O cálculo da densidade celular foi feito através da média do total de células viáveis nos oito quadrantes da câmara, aplicando-se a equação apresentada abaixo.

$$n^{\circ} \text{ células/mL} = \text{média de células viáveis} \times 2 \times 10^4 \text{ (Eq. 1)}$$

3.3. Avaliação do crescimento celular e otimização das condições experimentais

Para avaliar o crescimento celular das células em cultura ao longo de vários dias recorreu-se ao ensaio de redução da resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide). As células viáveis e, portanto, com metabolismo ativo, têm a capacidade de reduzir a resazurina, através das enzimas desidrogenases. Forma-se a resorufina (um composto que apresenta fluorescência) quantificável por fluorimetria (excitação a 540-570 nm; emissão a 580-610 nm) e também por espectrofotometria (absorvência máxima a 570 nm). Em células viáveis ocorre um aumento de fluorescência e alteração na absorvência (uma vez que a resazurina tem um máximo de absorvência a 600 nm). Foi importante garantir a inexistência de contaminação, uma vez que poderia resultar em falsos-positivos, assim como tentar proteger a solução de resazurina da luz para garantir que a percentagem de redução fosse apenas alterada pelas células.

A resazurina (sal de sódio, Alfa Aesar) foi pesada (30 mg) e diluída em PBS 1x (50 mL) com agitação magnética e protegida da luz durante aproximadamente 15 minutos. Procedeu-se à sua filtração através de um filtro de seringa de acetato de celulose (0,22 µm) e armazenamento a -20 °C em alíquotas, protegidas da luz direta. Para aferir a concentração da solução *stock*, preparou-se uma amostra diluída (100x) em PBS e mediu-se a absorvência a 570 e 600 nm. Através dos respetivos coeficientes de extinção molar, foi calculada a concentração de resazurina oxidada e a percentagem de resazurina reduzida, aplicando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de redução} = \frac{\varepsilon_{OX_{600 \text{ nm}}} \times A_{570 \text{ nm}_{tx}} - \varepsilon_{OX_{570 \text{ nm}}} \times A_{600 \text{ nm}_{tx}}}{\varepsilon_{RED_{570 \text{ nm}}} \times A_{600 \text{ nm}_{t0}} - \varepsilon_{RED_{600 \text{ nm}}} \times A_{600 \text{ nm}_{t0}}}$$

Eq. 2

Onde, ϵ é o coeficiente de extinção molar da resazurina; A é a absorvência medida; t_0 indica o tempo da primeira medição; t_x indica tempo da medição final, x .

Tabela 1 – Coeficientes de extinção molar para as formas oxidada e reduzida da resazurina [42].

Comprimento de onda	ϵ resazurina reduzida (ϵ_{RED})	ϵ resazurina oxidada (ϵ_{OX})
570 nm	155677	80586
600 nm	14652	117216

Utilizou-se a solução tampão de bicarbonato *Krebs-Ringer* (KRB, do Inglês *Krebs-Ringer Bicarbonate* (1,5 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,83 mM Na_2HPO_4 , 4,56 mM KCl, 119,78 mM NaCl, 1,67 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mM NaHCO_3 , 10 mM D-Glucose anidra, solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1M)) para diluição da solução *stock* de resazurina a 50 μM . Antes de cada utilização nos ensaios de viabilidade, foi adicionada às células a solução de resazurina após remoção do meio de cultura, com incubação a 37 °C. Após incubação foi lida a fluorescência (excitação 544 nm, emissão 590 nm, *cut off* 590 nm) ou a absorvência (570 nm e 600 nm).

Através dos coeficientes de extinção molar para as formas oxidadas e reduzidas de resazurina (Tabela 1) obtiveram-se as percentagens de redução da resazurina ao longo do tempo.

Para validar a distribuição homogênea das células nos poços das placas *multiwell* foram inicialmente semeadas placas que não foram tratadas, com avaliação da variabilidade (desvio padrão) de crescimento celular ao longo da placa (e por linhas e colunas) até esta reduzir com o treino do operador. Foi considerada homogeneidade suficiente quando os vários conjuntos de replicados, conforme o desenho experimental a usar nas experiências com transfeção, não eram significativamente diferentes entre si.

3.4. siRNAs para transfeção de células

Os siRNAs foram obtidos na forma de duplexos hibridizados e dessalinizados, secos. Foi usada como controlo negativo uma sequência contra o gene da Luciferasa (siLuc), inexistente nas células usadas. Como controlo positivo foi usada uma sequência contra o gene PLK1 (siPLK1). Este gene codifica uma proteína serina/treonina cinase cuja expressão é elevada durante a mitose, sendo um regulador importante do ciclo celular, e que está envolvida em vários tipos de cancro. O seu silenciamento tem um forte impacto no crescimento celular. Para o *knockdown* do gene da proteína RalGPS2 em

estudo foi usada uma sequência específica (siRalGPS2 #231) e um *pool* de siRalGPS2 (ON-TARGET plus Human RALGPS2 (55103) siRNA - SMART *pool*) (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências alvo de siRNA. As respetivas sequências de siRNA adquiridas à Eurogentec continham *overhangs* adicionais de DNA (dTdT).

Designação	Sequência alvo (sense)	Origem
siLuc	5'- CGUACGCGGAAUACUUCGA -3'	Eurogentec
siPLK1	5'- CGGGCAAGAUUGUGCCUAA -3'	Eurogentec
siRalGPS2 #231	5'- GAUUCAGCAUACCCAUCAA -3'	Eurogentec
pool siRalGPS2	ON-TARGET plus Human RALGPS2 (55103) siRNA - SMART <i>pool</i>	Dharmacon

As concentrações das soluções *stock* após reconstituição do siRNA em água livre de RNases foram confirmadas através da medição da absorvência por espectrofotometria UV a 260 nm. As diluições subsequentes foram feitas em tampão siRNA pH 7,5, preparado por diluição do tampão 5x (300 mM KCl, 30 mM HEPES, 1.0 mM MgCl₂.6H₂O) em água isenta de RNases (tratada com 0,1% de Dietilpirocarbonato (DEPC; Thermofisher Scientific, EUA) e autoclavada) e alíquotadas para minimizar a repetição de ciclos de congelamento/descongelamento.

3.5. Estabelecimento das condições de transfeção

Para otimização dos ensaios de transfeção da linha PC-3, as células foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade otimizada para esta linha, de 1000 células/poço num volume final de 64 µL de meio RPMI completo, de forma a obter-se confluência aos 5 dias de incubação após a transfeção.

A transfeção foi efetuada após um dia de incubação. Os siRNAs (10 nM/poço) foram entregues às células na forma de lipoplexos preparados com o reagente comercial de transfeção Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) em meio Opti-MEM (Gibco), a uma concentração final otimizada. Foram adicionados 16 µL de lipoplexos siRNA:Lipofectamina RNAiMAX a cada poço. Os lipoplexos foram incubados com o siRNA durante aproximadamente 5 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente adicionados às células. Foram estabelecidas condições teste de 6 replicados para cada condição de transfeção, tendo sido testadas sete condições diferentes, as quais diferiam essencialmente na razão lipofectamina: siRNA e na concentração de siRNA por poço. O procedimento foi executado de forma diferente das instruções indicadas pelo fabricante, com o propósito de haver toxicidade mínima associada à transfeção

(diferença entre células não tratadas e tratadas com a sequência de controlo negativo, i.e., siLuc) e um efeito máximo do controlo positivo (siPLK1).

Às 48 h após a transfeção, foi adicionado 120 μ L de meio de cultura fresco a cada poço. Após 5 dias do momento da transfeção, foi avaliada a viabilidade celular através do ensaio de redução de resazurina. O meio foi substituído por 200 μ L de tampão KRB (suplementada com D-glucose 10 mM) contendo resazurina a 50 μ M. As células foram incubadas durante um período de 2 a 4 h, a 37 °C e 5% CO₂. A fluorescência foi lida em intervalos de tempo de 1 h num leitor de placas, nos comprimentos de onda de 544 nm (excitação) e 590 nm (emissão) e os resultados expressos em termos da percentagem do sinal de fluorescência de células não tratadas após subtração do sinal de *background*.

A seleção das condições ideais de transfeção foi feita de acordo com o seguinte critério: maximização da redução de resazurina pelas células tratadas com siLuc (siRNA controlo negativo), preferencialmente superior a 75%, e minimização da redução de resazurina pelas células tratadas com siPLK1 (controlo positivo).

3.6. Avaliação da apoptose (população sub-G1) e distribuição do ciclo celular

De forma semelhante à transfeção efetuada na otimização das condições de transfeção descrita na secção anterior, as células foram semeadas em placas de cultura de 35 mm (Orange) a uma densidade de 24000 células/placa (em 1,6 mL de meio RPMI completo). A transfeção foi efetuada ~24 h após, com 400 μ L de lipoplexos siRNA:Lipofectamina RNAiMAX por cada placa, o correspondente a 20 pmol de siRNA. Após 48 h, foi adicionado 1 mL de meio de cultura completo fresco a cada placa. Ao 5º dia de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos para tubos de centrifuga de 15 mL devidamente identificados e feita uma lavagem com PBS 1x. As células foram tripsinizadas com solução de tripsina-EDTA-glucose, como anteriormente descrito, e adicionadas ao respetivo tubo. Após repetição da lavagem do poço com PBS 1x, os tubos foram centrifugados a 300 \times g por 5 minutos. As células foram ressuspensas em PBS 1x, fixadas e permeabilizadas em 0,5 mL de etanol 70% (v/v) previamente arrefecido a -20 °C e adicionado em fio lento com recurso ao vórtex, e os tubos foram armazenados a -20 °C.

Previamente à da realização da análise por citometria, foi adicionado 5 mL de PBS 1x, para diluição do etanol, e a suspensão centrifugada a 400 \times g por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi novamente ressuspensado em 0,4 mL de PBS 1x e

adicionados 0,5 mL de tampão de extração de DNA (0,2 M de NaHPO₄ e 0,004% (v/v) de Triton X-100). Após incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos, e centrifugação a 400 × *g* durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspense em 0,3 mL de solução de marcação de DNA (20 µg/mL de iodeto de propídeo e 10 µg/ml de RNase livre de DNase em PBS (Ribonuclease A de pâncreas bovino (Merck, Alemanha; R4875).

As células foram incubadas, protegidas da luz, durante pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente e analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences) com recurso a um laser de 488 nm para excitação do iodeto de propídeo. Foi medida a fluorescência no canal apropriado (FL3) assim como a dispersão frontal e lateral (FSC, *forward scatter*, e SSC, *side scatter*), recolhendo-se no mínimo 20000 eventos. Para obtenção de resultados fez-se um ajuste de parâmetros no citómetro, ajustando-se o canal de FSC, SSC e FL3-*height* em escala logarítmica, bem como FL3-*area* e FL3-*width* em escala linear, e utilizadas estas calibrações para a recolha das amostras.

3.7. Extração de RNA e síntese de cDNA

As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 250 × *g* durante 5 minutos. O *pellet* de células foi ressuspense em PBS 1x, e transferido para um tubo *ependorf* estéril. Após nova centrifugação a 250 × *g* durante 5 minutos, adicionou-se 100 µL de reagente TRIzol (Invitrogen, Portugal) a cada tubo para extração de RNA. As amostras foram congeladas a - 80 °C até à etapa seguinte. As amostras foram descongeladas e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Na *hotte*, foi adicionado 20 µL de clorofórmio a cada amostra com agitação em vórtex durante aproximadamente 15 segundos. Após incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos, formando-se três fases visíveis: uma aquosa contendo o RNA, a interfase contendo DNA e uma fase orgânica composta por proteínas. Recolheu-se a fase aquosa de cada amostra para novos tubos *ependorf* estéreis previamente identificados. Adicionou-se 50 µL de isopropanol a cada tubo sendo depois invertidos três vezes para misturar. As amostras foram incubadas novamente à temperatura ambiente durante 10 minutos, e de seguida centrifugadas a 14000 rpm e 4 °C durante 10 minutos. Após remoção do sobrenadante, adicionou-se 100 µL de etanol frio a 75% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 9500 rpm, a 4 °C, durante 5 minutos. Estes dois últimos passos foram repetidos, o etanol removido, e o *pellet* de RNA seco ao ar. Uma vez seco, foi ressuspense em 20 µL de água isenta de RNases e armazenado a -80 °C até à sua quantificação.

A integridade do RNA (0,5 µg) foi adquirida por eletroforese num gel de agarose a 1% por marcação com o corante de ácidos nucleicos SYBR Green (ThermoFisher Scientific, Espanha). A quantificação e avaliação da pureza foi feita por medição das absorvências a 260 nm (e 280 nm) no espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop (*Implen NanoPhotometer UV/Vis spectrophotometer*) com a tampa de fator 50, em 2 µL de amostra.

A partir de 1 µg de RNA, foi feita a transcrição reversa de RNA, em dois passos (Figura 6) de cada amostra a cDNA, com recurso ao NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (Nzytech, Lisboa, Portugal). Foram utilizados 10 µL de 2x Master Mix, 2 µL de Enzyme Mix e completado o volume de 20 µL com água isenta de RNases.

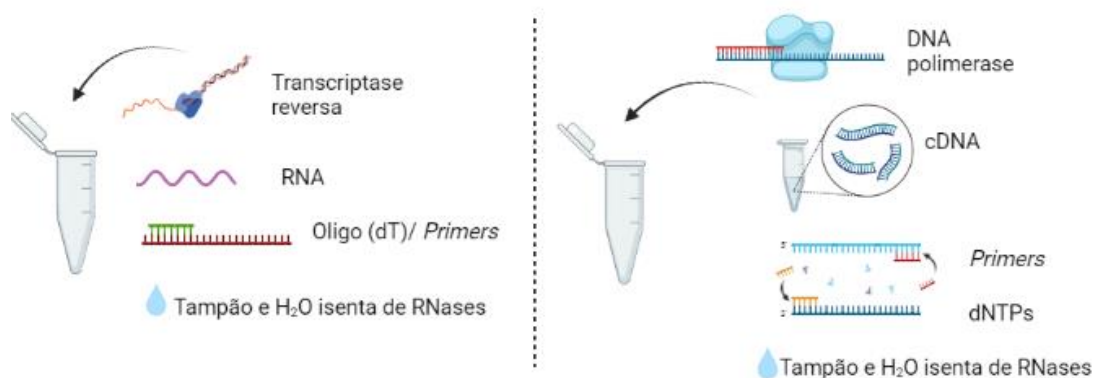


Figura 6 – Reação de qPCR em dois passos.

Os componentes da reação foram colocados em tubos de microcentrifuga e a síntese iniciada no termociclador T100™ (Bio-Rad Laboratories) de acordo com o programa de temperaturas indicado na tabela 3. Após 45 minutos de reação, foi adicionado 1 µL de RNase H (*E. coli*) a cada amostra.

Tabela 3 – Condições de síntese de cDNA.

A síntese do cDNA ocorre na etapa 2 pela transcriptase reversa a 50 °C. Na etapa 4 é adicionada manualmente a RNase H, que degrada o RNA durante o passo seguinte (etapa 5).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	25	10
2	50	30
3	85	5
4	37	∞
5	37	20
6	4	∞

3.7.1. Reação quantitativa de PCR em tempo real (qPCR)

As seqüências de *primers* usados nas reações de PCR (Tabela 4) foram primeiramente diluídas em água livre de RNases para uma concentração de 100 pmol/μL. Posteriormente foi feita uma segunda diluição (20 vezes) para obter uma solução stock de trabalho de 5 pmol/μL (5 μL solução *stock primer* + 95 μL H₂O).

Tabela 4 – Seqüências de *primers forward* e *reverse* usados na análise por qPCR.

Primers	Seqüência	Origem
Beta-2-microglobulina	5' ATG AGT ATG CCT GCC GTG TG 3' 5' CAA ACC TCC ATG ATG CTG CTTAC 3'	STAB VIDA
H_RALGPS2_for1855 H_RALGPS2_rev2084	5' TGG CTG ATG ACC CTG AAC AT 3' 5' GGT CCT CAT GCT CAC GTA GA 3'	STAB VIDA
H_CTGF_for87 H_CTGF_rev1029	5' CCA ATG ACA ACG CCT CCT G 3' 5' TGG TGC AGC CAG AAA GCT C 3'	STAB VIDA
H_CYR61_for871 H_CYR61_rev1013	5' AGC CTC GCA TCC TAT ACA ACC 3' 5' TTC TTT CAC AAG GCG GCA CTC 3'	STAB VIDA

As reações de qPCR foram efetuadas no termociclador CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories), usando 1,2 μL (5 pmol/μL) de cada um dos *primers*, 10 μL de SYBR Green PCR Master Mix 1x, 6,6 μL de água isenta de RNases e 1 μL de cDNA, resultando num volume final de 20 μL por poço. A temperatura de *melting* usada foi de 60 °C. Para normalizar a expressão dos genes em estudo, foram usados *primers* para a detecção do gene *housekeeping* beta-2-microglobulina.

A reação de qPCR foi efetuada após desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 10 segundos, a temperatura de *annealing* a 56 °C durante 30 segundos e a polimerização a 72 °C por 20 segundos. A especificidade das reações foi verificada pela análise das curvas de *melting*, sendo as amostras analisadas em duplicado ou triplicado.

Foi testada a eficiência dos *primers* usados, com diluições sucessivas de 0,5 e 25x, em água DEPC. A expressão de cada mRNA foi calculada de acordo com o modelo matemático de Pfaffl [43], através da fórmula: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

3.7.2. Avaliação da estimulação e inibição de YAP/TAZ na expressão de CTGF e CYR61

De forma a verificar se seria possível detetar a inibição e/ou ativação de YAP/TAZ em células PC-3, foi testada a sua estimulação com FBS 10% e a sua inibição com sinvastatina.

A cultura celular de PC-3 foi feita como descrito na secção 3.2. No primeiro dia de incubação, foi adicionado 0,4 mL de meio completo por placa. No ensaio de ativação por FBS, ao terceiro dia, foi adicionado mais 1 mL por placa de meio completo. Ao quinto dia, 12 h antes do fim do tempo de incubação, o meio completo foi removido. Foi feita uma lavagem com PBS 1x (1 mL/placa) e posteriormente adicionados 3 mL de meio sem FBS por placa. No final do tempo de incubação, o meio de cada placa foi removido, repetindo-se o procedimento de lavagem com PBS 1x. As placas de controlo negativo permaneceram em meio sem soro e as restantes foram estimuladas com soro, tendo-se adicionado 3 mL/placa de meio completo (com 10% FBS) durante 30 e 60 minutos, respetivamente.

Para o ensaio de inibição de YAP/TAZ, 48 h antes do fim do tempo de incubação, o meio das células foi removido e substituído por 3 mL de meio completo com uma solução de sinvastatina (10 μ M), preparada a partir de um stock 20 mg/g em dimetilsulfóxido (DMSO). Às placas de controlo negativo foi adicionado 3 mL de meio com a mesma percentagem de DMSO.

Ao quinto dia, as células foram tripsinizadas do modo habitual, anteriormente descrito, e centrifugadas a $250 \times g$ durante 5 minutos. Seguiu-se o procedimento de extração de RNA e quantificação por qPCR descrito na secção 3.7.1.

3.7.3. Ativação de YAP/TAZ e silenciamento de RalGPS2

As células foram semeadas de acordo com o procedimento descrito em 3.6. Após 1 dia de incubação foi feita transfeção com siLuc e com siRalGPS2. Como anteriormente descrito, as células foram privadas de soro 12h antes do fim do tempo de incubação. Posteriormente, o meio completo foi removido, foi feita uma lavagem com PBS 1x, e adicionados 3 mL de meio completo por placa, com FBS 10%, durante 60 minutos. As placas correspondentes aos controlos negativos foram mantidas em meio sem FBS até ao fim do tempo de incubação. As amostras foram preparadas para extração de RNA e para análise posterior por qPCR como descrito na secção 3.7.

Capítulo 4

Resultados e discussão

4.1. Resultados de otimização de condições experimentais

4.1.1. Ensaio de avaliação do crescimento em condições de adesão a papel de filtro de celulose

Inicialmente foi testada a possibilidade de avaliar o crescimento de células PC-3 e LNCaP em condições de suspensão/esferóides segundo a técnica de adesão a papel de filtro de celulose. A capacidade de formação de esferóides em baixas condições de adesão é comumente utilizada para identificar a capacidade de autorrenovação das células tumorais. Esta característica, apresentada por possíveis células estaminais cancerígenas, permite-lhes manter a viabilidade de tumores sólidos [41].

As células estaminais cancerígenas são um subgrupo de células tumorais com características vantajosas de células estaminais, que lhes conferem a capacidade de iniciação e a metástase de tumores para órgãos distantes. Geralmente, apenas uma pequena percentagem de células cancerígenas apresenta este potencial, no entanto, representam um alvo terapêutico interessante em vários tipos de cancro, incluindo o CaP, no qual são recorrentes as metástases ósseas e em nódulos linfáticos [41].

As células das linhas PC-3 e LNCaP, quando colocadas a crescer na ausência de adesão ao plástico, em substrato de agarose 1,5% e em contacto com papel de filtro de celulose, na presença de soro (em meio completo), apresentaram uma taxa de sobrevivência, após 2 dias, de cerca 1,2% (PC-3) e 4,4% (LNCaP). A partir do 2^o dia mantiveram um número variável, mas baixo, de células viáveis durante pelo menos duas semanas (Figura 7).

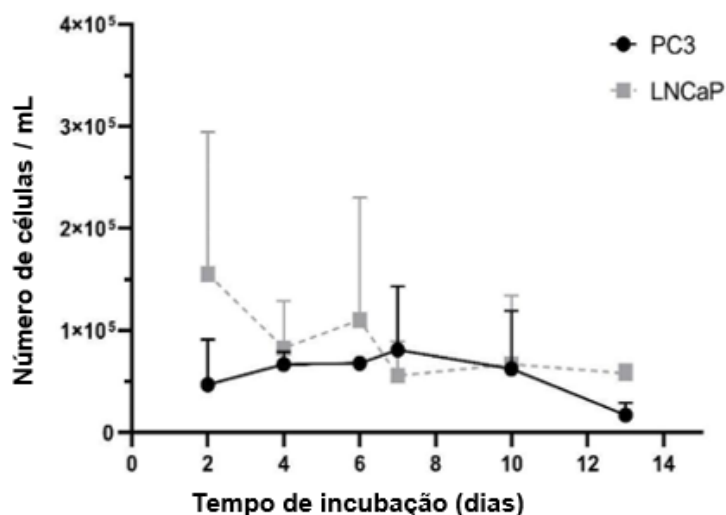


Figura 7 - Variação do número de células PC-3 e LNCaP ao longo do tempo, durante um período de incubação de 13 dias em condições de ausência de adesão.

Este ensaio permite demonstrar que sob condições de cultura normais (linhas celulares semeadas em meio completo), uma pequena percentagem de células tumorais de CaP, quer da linha PC-3 quer da linha LNCaP, apresentam a característica de potenciais células estaminais cancerígenas de capacidade de crescimento e sobrevivência sob condições de baixa adesão durante o período de incubação testado de 13 dias. Contudo, verificou-se alguma dificuldade em avaliar a viabilidade celular através do ensaio de redução de resazurina com este método. Adicionalmente, foi difícil ter resultados reprodutíveis, pelo que se decidiu não continuar a realização de ensaios com recurso à técnica de crescimento celular nestas condições.

4.1.2. Seleção do ensaio de avaliação da viabilidade celular e otimização das condições experimentais

Foi feita uma comparação entre as técnicas de redução do MTT e redução da resazurina na análise da viabilidade celular. O ensaio de MTT é um dos ensaios comumente usados como indicador de viabilidade celular, baseando-se na redução do sal de tetrazólio (de cor amarela) por desidrogenases mitocondriais de células viáveis, a formazano (de cor azul), um composto insolúvel em água. Os cristais de formazano são depois normalmente dissolvidos através de um solvente orgânico (DMSO) o que representa um passo adicional comparando com o ensaio de redução da resazurina. Adicionalmente, obteve-se um elevado número de cristais, dificultando as medições de absorvência, que eram superiores a 2, sendo necessárias diluições posteriores, para respeitar os limites de medição de acordo com a lei de Lambert-Beer, acrescentando

morosidade ao processo. Foi, portanto, selecionado o ensaio de resazurina por apresentar mais vantagens, incluindo a obtenção de resultados de forma mais rápida, segura e eficiente. Permitiu ainda fazer leituras a vários tempos e escolher o tempo de incubação mais adequado.

Foi testada inicialmente a confluência celular obtida na ausência de transfeção, de forma a confirmar a homogeneidade da distribuição de células por poço em cada placa de 96 poços, e o número de células a semear. A densidade e homogeneidade da distribuição celular da linha PC-3 foram otimizadas com sucesso para obtenção de subconfluência celular após 5 dias de cultura após a transfeção (6 dias a partir da distribuição em placa), na tentativa de testar o efeito do silenciamento causado pela transfeção durante este período de tempo. Com a linha LNCaP verificou-se uma maior dificuldade em obter resultados consistentes, pelo que se usou subsequentemente apenas a linha PC-3.

Para otimizar o tempo de incubação com a resazurina analisou-se a variação da percentagem de resazurina reduzida ao longo do tempo (por absorvência, Figura 8.a). Alternadamente, foi avaliada a fluorescência, conforme apresentado na Figura 8.b). A percentagem da forma reduzida de resazurina, calculada através das medições de absorvência, aumentou ao longo do tempo (Figura 8.a), como esperado, indicando a redução da resazurina pelas células viáveis ao longo do tempo de incubação. Também a fluorescência mostrou um aumento linear (Figura 8.b). Contudo, a concentração de resazurina total (soma das formas oxidada e reduzida) diminuiu ligeiramente ao longo do tempo (Figura 8.a), indicando que devemos usar tempos de incubação que não ultrapassem cerca de 35% de resazurina reduzida. O coeficiente de variação relativo às medições de absorvência e de fluorescência, também foi diminuindo ao longo do tempo (Figura 8.c) indicando a obtenção de resultados mais fiáveis com tempos de incubação maiores, e com a medição de fluorescência comparativamente à medição de absorvência. Adicionalmente, a existência de linearidade da fluorescência em relação à percentagem de resazurina reduzida (Figura 8.d) indica a fiabilidade do método de medição por fluorescência na obtenção da percentagem de resazurina reduzida pelas células PC-3 (desde que não ultrapassando as 17500 unidades relativas de fluorescência).

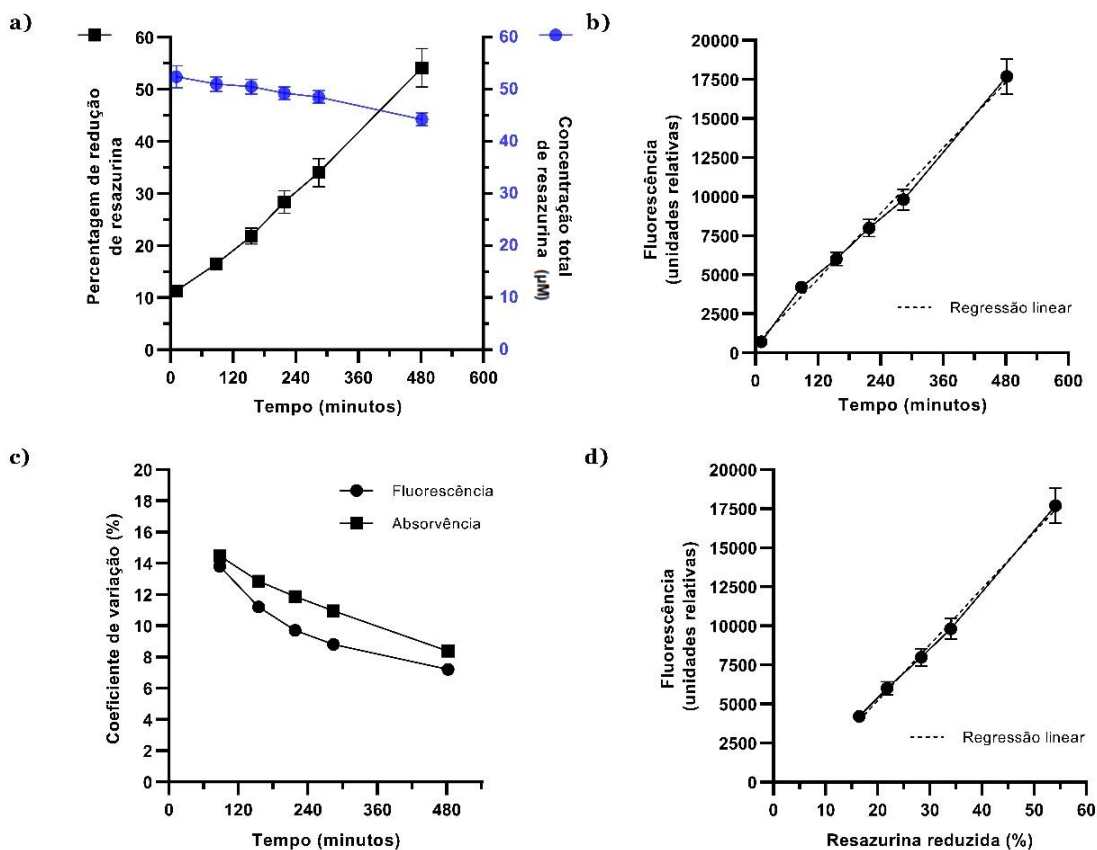


Figura 8 - Medições de absorvência e fluorescência ao longo do tempo no ensaio de redução da resazurina, após 6 dias de incubação da linha PC-3, na ausência de transfeção.

a) Variação da forma reduzida de resazurina (%) e da concentração de resazurina total ($[Resazurina\ total] (\mu M) = [Res\ red] + [Res\ Ox]$) ao longo do tempo. b) Variação da fluorescência, com subtração do branco, em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU). c) Coeficientes de variância correspondentes às medições de absorvência e de fluorescência. d) Regressão linear de RFU em relação à percentagem de resazurina reduzida.

4.1.3. Otimização da condição de transfeção com siRNA em células PC-3

O estudo do silenciamento iniciou-se pela seleção da condição de transfeção de siRNA mais adequada para a linha celular PC-3. Esta corresponderia à condição de transfeção que apresentasse o mínimo de toxicidade inespecífica originada pelo reagente de transfeção e efeitos inespecíficos do siRNA. Esta característica foi verificada pela transfeção com siRNA contra o gene da Luciferase (siLuc), usado como controlo negativo, uma vez que este gene alvo não está presente em células humanas. Nas transfeções com siLuc foi dada preferência às condições testadas que apresentassem

uma redução de resazurina pelas células viáveis superior a 75%. De modo a investigar a eficiência da transfeção, foi utilizado siRNA contra o gene de PLK1 como controlo positivo, pretendendo-se obter uma minimização da redução da resazurina pelas células transfetadas.

As diferentes condições testadas diferiram na concentração de siRNA e no volume de reagente de lipofectamina utilizado para 10 pmol (i.e. 0,01 nM) de siRNA (Figura 9). Foi selecionada a condição de transfeção 10 nM siRNA e uma razão de 1,5 μ L de lipofectamina para 10 pmol de siRNA, por apresentar de forma consistente as características espectáveis durante a otimização da transfeção, nomeadamente uma percentagem de viabilidade celular próxima ou superior a 80% em células transfetadas com siLuc, e de cerca de 20% para siPLK1 assim como o maior efeito na viabilidade celular observável após transfeção com siRalGPS2, observando-se uma redução marcada do crescimento celular, de aproximadamente 59% (siRalGPS2 #231), relativamente ao controlo de transfeção (siLuc).

O silenciamento do gene de RalGPS2 foi testado inicialmente apenas com a sequência de siRalGP2 #231 em diferentes condições e posteriormente com um *pool* de siRalGPS2 com a condição escolhida (Figura 9).

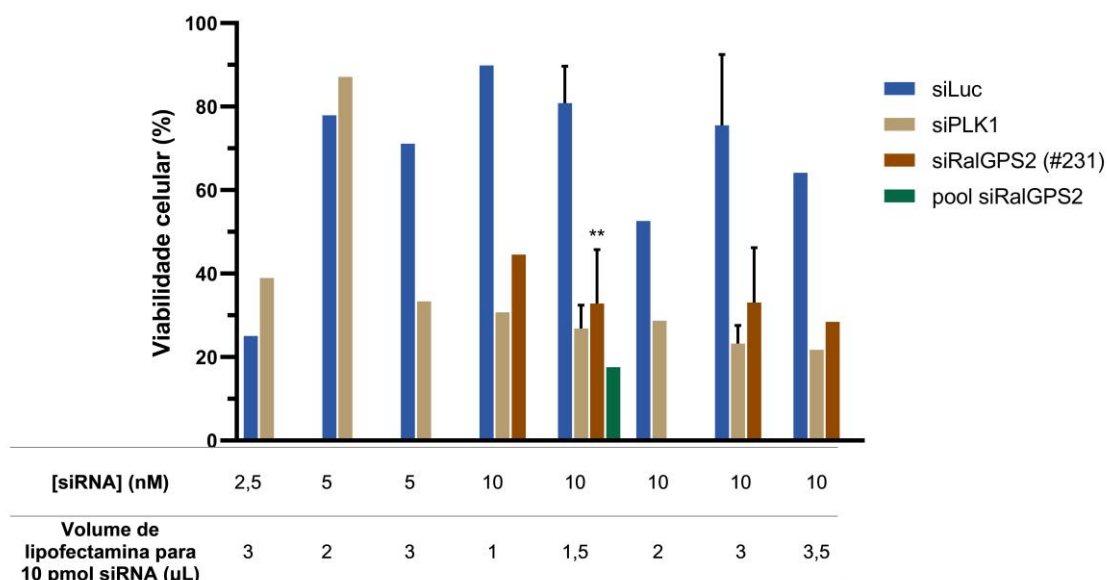


Figura 9 - Percentagem de viabilidade celular obtida para cada condição de transfeção com siRNAs (siLuc, siPLK1, siRalGPS2 #231 e *pool* RalGPS2) aos 5 dias após a transfeção.

A viabilidade celular foi avaliada em PC-3 e normalizada relativamente a células não tratadas. Os dados correspondem a média \pm desvio padrão, n = 1 a 3 ensaios independentes realizados em dias diferentes, em sextuplicado para cada condição testada. O efeito entre as médias foi estatisticamente comparado com o controlo negativo siLuc por teste t, com um nível de significância de 0.05, **p \leq 0.01.

4.2. Efeito do silenciamento de RalGPS2 na morfologia celular

Foi possível observar uma alteração morfológica induzida pela transfecção de siRalGPS2, assim como uma redução no crescimento celular aos 3 e 5 dias após a transfecção (Figura 10). Nas células de controlo negativo, mantidas em condições de incubação favoráveis ao seu crescimento, observa-se a morfologia normal desta linha celular, classificada por morfologia epitelial. As células têm dimensões regulares, uma forma poligonal e atingem uma confluência máxima ao quinto dia de incubação. As células transfetadas com siRalGPS2 #231 e com a *pool* de siRalGPS2 apresentam uma forma claramente distinta dos controlos, observando-se também diferenças entre o efeito da sequência única e a *pool* de siRNAs. Enquanto as células transfetadas com siRalGPS2 (#231) aparentam uma morfologia caracteristicamente apoptótica, com defeitos visíveis a nível da membrana citoplasmática assim como diminuição da confluência, as células transfetadas com um *pool* de sequências de siRalGPS2 sofreram também diminuição de viabilidade, observando-se um alongamento dos corpos celulares.

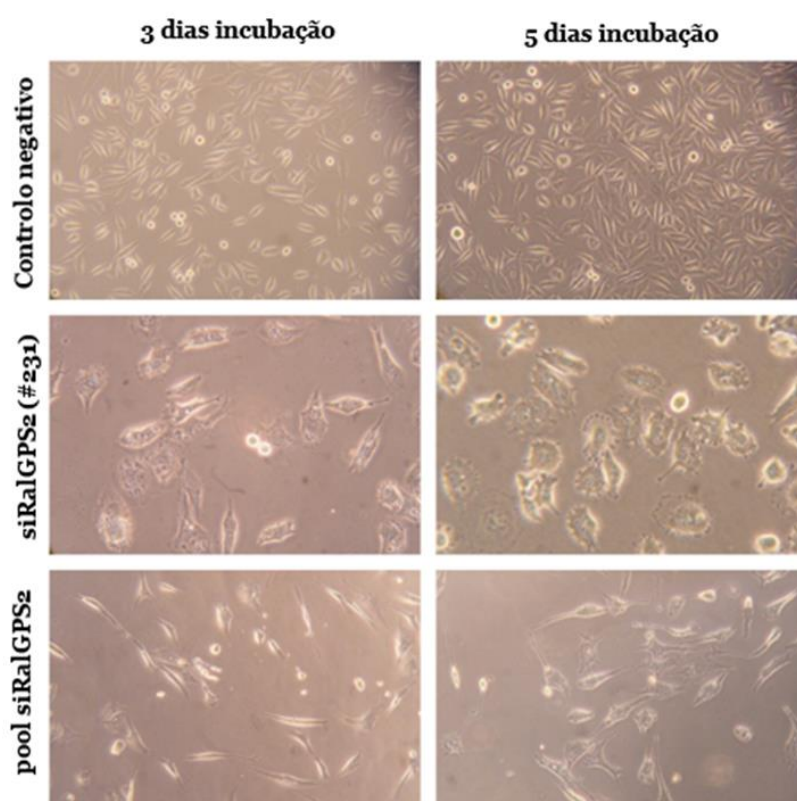


Figura 10 – Efeitos do silenciamento de RalGPS2 na morfologia de células PC-3 *in vitro*. São mostrados diferentes tempos de incubação (3 e 5 dias após a transfecção): controlo negativo 10x; siRalGPS2 (#231) 20x; *pool* siRalGPS2 10x.

São frequentemente observadas diferenças na morfologia das células durante a morte celular programada, as quais podem não apresentar uma morfologia típica de apoptose (como diminuição de tamanho, *ruffling* da membrana designado por *budding* e condensação da cromatina), o que se pode dever ao tipo de célula ou ao estímulo induzido [42]. Contudo, poderão haver também efeitos *off target* destas sequências de siRNA, que podem ter contribuído para as diferenças morfológicas observadas.

4.3. Validação da eficiência do silenciamento de RalGPS2 através de análise por qPCR

De forma a validar a eficiência do silenciamento dos siRNAs contra o gene de RalGPS2, foi analisada a expressão de mRNA de RalGPS2 por qPCR aos 3 e aos 5 dias de incubação após transfeção. Os resultados demonstram a eficiência da transfeção no *knockdown* do nível de expressão do gene de RalGPS2, observando-se uma diminuição da expressão de mRNA acentuada nos dois tempos de incubação testados. No entanto esta diminuição é ligeiramente mais significativa após transfeção com a *pool* de siRalGPS2. Na transfeção com siRalGPS2 #231, verifica-se uma eficácia do silenciamento mais notória e significativa aos 5 dias de incubação após a transfeção.

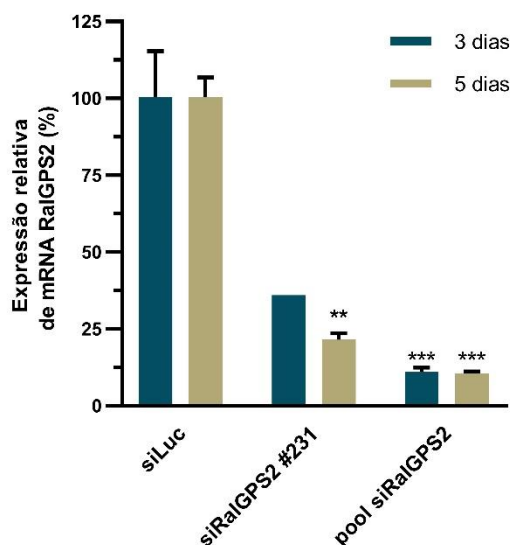


Figura 11 - Expressão de mRNA de RalGPS2 aos 3 e 5 dias após transfeção com siLuc (controlo negativo), um *pool* de siRalGPS2 e siRalGPS2 #231 analisada por qPCR.

Os dados estão representados como média \pm desvio padrão de n=2 ou n=1 replicados, correspondentes a medições de um dia em replicados de 2 poços. O efeito foi estatisticamente comparado com o controlo negativo siLuc por *Two-way* ANOVA (****p < 0.0001, **p < 0.01).

4.4. Efeito do silenciamento de RalGPS2 na apoptose e distribuição no ciclo celular

A indução espontânea de apoptose e o efeito na distribuição no ciclo celular após transfeção foram testados por marcação celular com iodeto de propídeo via citometria de fluxo. Este ensaio seguiu as instruções de um protocolo já existente otimizado para uso em células aderentes [44].

O iodeto de propídeo é um composto emissor de fluorescência usado na marcação nuclear de células, que permite detetar o nível de DNA ou RNA em cada célula através da sua ligação estequiométrica aos ácidos nucleicos.

Quando em apoptose, as células sofrem alterações morfológicas e bioquímicas. Numa fase inicial, ocorre a ativação de caspases, as quais clivam substratos proteicos do citoesqueleto e núcleo e ativam DNases, resultando numa clivagem do DNA e na formação de fragmentos de DNA degradados. O DNA não degradado permanece no núcleo, enquanto o degradado pode ser extraído por apresentar menor peso molecular (observável, por exemplo, por eletroforese em gel de agarose) [44].

A realização deste ensaio de fluorescência por citometria de fluxo permite distinguir as células apoptóticas (numa fase em que já tenha havido clivagem do DNA) por observação do aumento no número de eventos hipodiplóides (região sub-G1). Nos resultados obtidos, apresentados no gráfico da Figura 12, observou-se o aumento mais significativo de apoptose em células transfetadas com a sequência única de RalGPS2 (RalGPS2 #231) em comparação com o número relativo de células apoptóticas obtido após transfeção com o controlo siLuc (gráfico A).

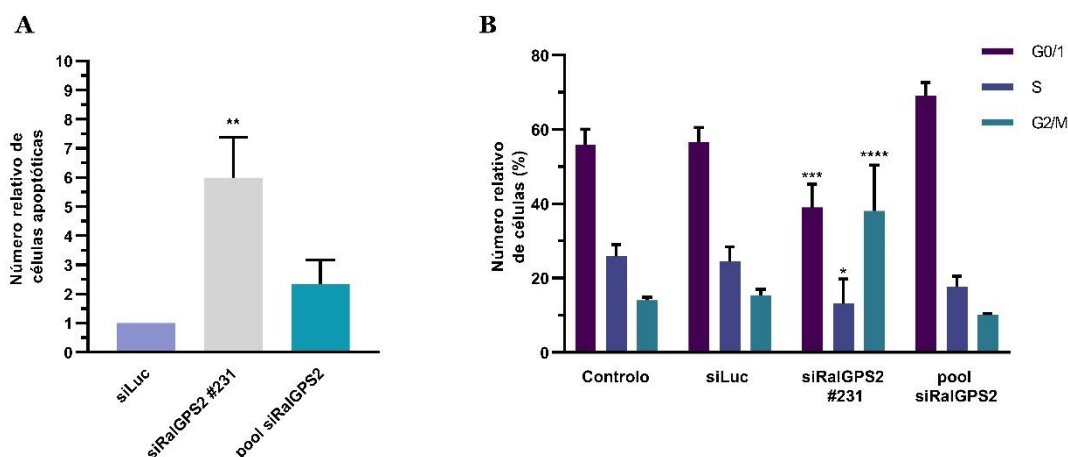


Figura 12 - Distribuição de células apoptóticas no ciclo celular, 5 dias após a transfeção.

O efeito foi estatisticamente comparado com o controlo negativo siLuc por *Two-way* ANOVA (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$; os dados correspondem a 2 ensaios independentes, tendo cada transfeção sido feita em duplicado). O gráfico A corresponde ao número relativo de células apoptóticas (população Sub-G1) após silenciamento de RalGPS2, relativo ao grupo silenciado com siLuc. O gráfico B indica qual a distribuição no ciclo celular das células não apoptóticas.

Podemos ainda analisar a sua distribuição pelas fases do ciclo celular. Nas células transfetadas com siRalGPS2 #231, há uma diferença significativa da percentagem de células nas fases do ciclo celular, com maior relevância no aumento de células nas fases G2/M e diminuição na fase Go/G1, relativamente às transfetadas com siLuc. Nas células transfetadas com *pool* de siRalGPS2, não se observou uma diferença significativa, isto é, não foi possível confirmar os efeitos do silenciamento de RalGPS2 na distribuição do ciclo celular, comparativamente aos efeitos obtidos com a sequência única de siRNA (#231). Este resultado obtido pode ser, possivelmente devido a efeitos *off target*. Seria importante otimizar as condições de marcação das células mortas ou apoptóticas para repetir a análise do ciclo celular uma vez que houve dificuldade em distinguir e definir as regiões pertencentes às fases S e G2/M. Devido à degradação do DNA que ocorre na apoptose, existe maior dificuldade em distinguir o número de eventos celulares pertencentes a cada uma das fases, havendo uma “fusão” do sinal da fase S com a G2/M e vice-versa. Poderia ser utilizado um marcador de apoptose adicional, como por exemplo para deteção da atividade de caspases, de forma a poder haver uma melhoria da capacidade de distinção das diferentes fases nas células verdadeiramente não apoptóticas.

Em trabalhos anteriores o silenciamento de RalGPS2 provocou defeitos da citocinese em células HeLa de cancro cervical [22], o que poderia explicar aqui o aumento em G2/M. Contudo, o efeito observado em células de adenocarcinoma do pulmão (A549 e H1299) foi de paragem em Go/G1 [5]. O diferente nível de silenciamento também pode ser um fator com influência no fenótipo observado. A clarificação deste assunto, requer, portanto, investigação futura.

4.5. Avaliação da ativação de YAP / TAZ após silenciamento de RalGPS2, estimulação com soro ou inibição com sinvastatina

4.5.1. Efeito do silenciamento de RalGPS2 na expressão de mRNA de YAP/TAZ

De forma a verificar a hipótese de que o silenciamento de RalGPS2 induz alteração da expressão de YAP/TAZ, foi avaliado o seu efeito na expressão de mRNA dos genes a *downstream* na via de sinalização Hippo, CTGF e CYR61, de cuja transcrição e tradução resultam proteínas da matriz celular envolvidas na regulação do crescimento tumoral.

Como mostrado na Figura 11, a análise dos níveis de expressão em células PC-3 após 3 e 5 dias da transfeção com siRalGPS2 indica uma menor percentagem média de expressão de mRNA de RalGPS2 aos 5 dias após o silenciamento, em comparação com 3 dias de incubação.

Foram avaliados os mesmos tempos de incubação no ensaio de análise da expressão dos dois genes regulados por YAP/TAZ.

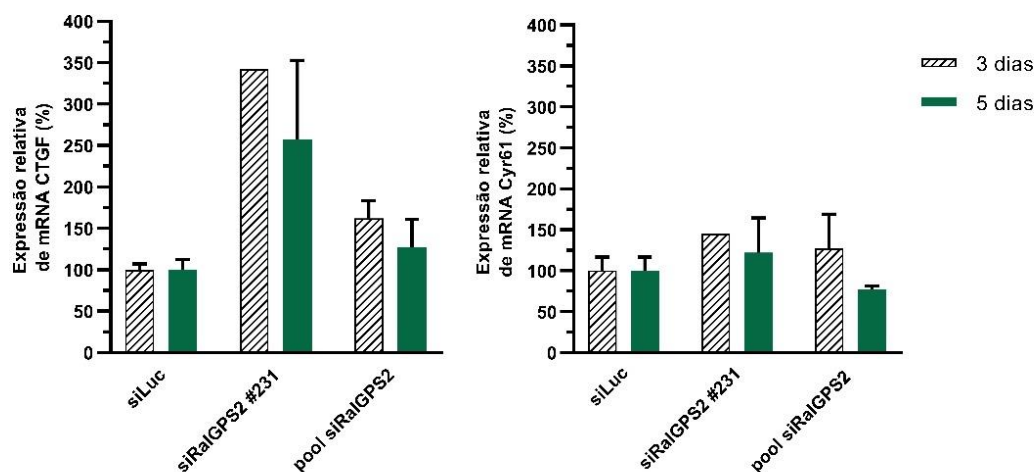


Figura 13 - Análise da ativação dos cofatores YAP/TAZ através dos níveis de expressão de mRNA de CTGF e CYR61, obtida por qPCR aos 3 e aos 5 dias de incubação após transfeção.

Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de $n=2$ duplicados ($n = 1$ para siRalGPS2 #231 aos 3 dias de incubação) de um ensaio independente. O efeito foi estatisticamente comparado com o controlo negativo siLuc por *Two-way* ANOVA, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre as médias com um nível de significância de 0.05.

Os níveis de expressão de CTGF e CYR61, analisados por qPCR, em células PC-3 após a transfeção com os respetivos siRNAs, como mostra a Figura 13, indicam que o silenciamento de siRalGPS2 não aparentou diminuir significativamente a sua expressão, relativamente ao controlo negativo siLuc.

Embora não tenha sido obtida significância estatística para entre as médias dos níveis de expressão, verifica-se a existência de um aumento na expressão de mRNA de CTGF, mais notável após transfeção com a sequência #231 de siRalGPS2 quando em comparação com os resultados obtidos após transfeção com a *pool* de siRalGPS2. O aumento de expressão de mRNA de CYR61 aparenta ser menos evidente após o silenciamento.

4.5.2. Estimulação e inibição de YAP/TAZ

Como já mencionado, a transdução do sinal na via de sinalização Hippo é regulada por uma cascata de cinases principal na qual a proteína adaptadora SAV1 auxilia a ação das cinases MST1/2 na fosforilação da cinase LATS 1/2 responsável pela sua ativação. YAP e TAZ são constituídos por motivos HXRXXS (Ser127 em YAP e Ser89 em TAZ) que, ao ser fosforilados por LATS 1/2, conduzem à inibição dos co-ativadores transcricionais YAP e TAZ e ao seu sequestro no citoplasma, onde permanecem ligados à proteína 14-3-3 [35].

Um estudo em células renais embrionárias humanas (HEK293A) verificou a influência da diminuição da concentração de FBS na fosforilação de Ser127 em YAP, e na sua consequente retenção citoplasmática [35]. A adição de FBS em células confluentes sobrepôs-se à inibição de YAP originada pelo contacto intercelular: os autores do estudo observaram a desfosforilação e ativação de YAP bem como a ocorrência da sua translocação para o núcleo da célula. Esta ativação revelou-se independente do silenciamento das cinases *upstream*. Foi identificado o componente lipídico ativo no soro, S1P como o principal indutor de YAP, entre outros lípidos presentes no soro, já anteriormente indicados como ativadores da expressão de CTGF e CYR61. S1P é um lípido de sinalização que pode ligar-se a lipoproteínas como HDL no soro, e regula a proliferação, migração e diferenciação celulares. O mecanismo de ativação de YAP foi associado à sinalização via GPCRs e RhoGTPases.

A influência da estimulação com FBS na expressão de genes com possível efeito na via de sinalização Hippo já foi testada em PC-3. Foi investigada a possível influência das proteínas da família angiotomina no crescimento celular após estimulação com soro. O

efeito foi independente da estimulação pelos fatores presentes no soro [38]. Desta forma, procedeu-se à avaliação dos níveis de expressão de CTGF e Cyr61 em células PC-3, privadas de soro durante 12h e posteriormente estimuladas durante 30 e 60 minutos com FBS 10% (Figura 14).

Os resultados indicam que a estimulação com FBS 10% parece ativar a atividade transcricional de YAP, verificando-se apenas um aumento significativo da expressão do gene alvo Cyr61 após 30 minutos de estimulação, em relação ao controlo sem estímulo. Contudo, não se verificou significância estatística neste ensaio e portanto, a repetição do ensaio seria necessária, dada a variabilidade obtida, para obtenção de resultados mais significativos. Ainda assim, estes resultados demonstram que é possível detetar a ativação transiente dos níveis de expressão de CTGF e Cyr61 em células PC-3, que são por defeito relativamente baixos em células cultivadas com soro.

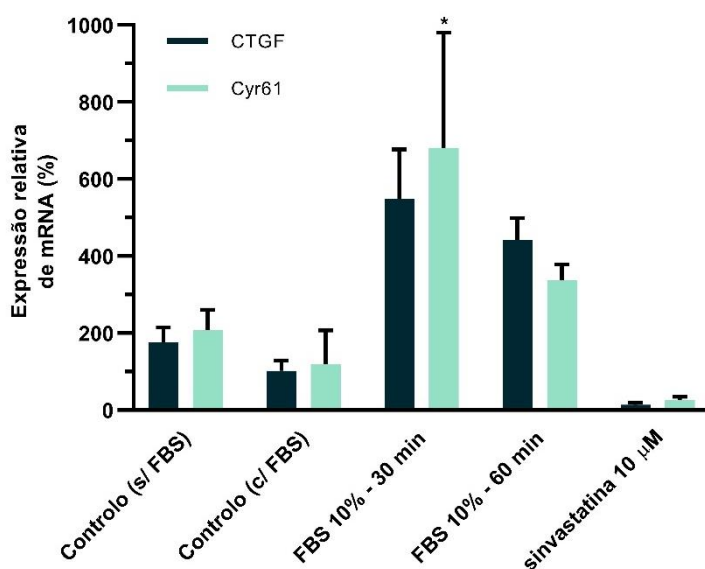


Figura 14 - Análise da expressão de mRNA de CTGF e Cyr61 por qPCR após privação e estímulo com FBS 10% durante 30 e 60 minutos e tratamento com sinvastatina (10 µM) em células PC-3.

Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão de um ensaio independente e n=2 amostras quantificadas em triplicado. O efeito foi estatisticamente comparado por *Two-way* ANOVA (***p < 0.0001; **p < 0.01 relativamente ao controlo).

Já quanto à possibilidade de detetar a redução da expressão destes genes, com relativamente baixos níveis de expressão constitutiva, foi usado o tratamento com sinvastatina para o comprovar.

As estatinas representam uma classe de fármacos inibidores da enzima HMG-CoA redutase, a qual catalisa a produção de ácido mevalónico, numa etapa limitante da síntese de colesterol na via de sinalização do mevalonato. Num estudo de avaliação do

efeito de estatinas na inibição da atividade transcricional de YAP/TAZ em linhas celulares de cancro humano, a sinvastatina, assim como a cerivastatina, causaram a sua inibição, marcada pela diminuição da expressão de CTGF e CYR61 [38].

No presente estudo, foi testado o mesmo efeito de inibição da transcrição em PC-3, recorrendo-se a uma solução de sinvastatina (10 μ M) diluída em meio de cultura. Os resultados mostraram a sua eficácia nesta linha celular de CaP, verificando-se uma diminuição da expressão de mRNA de CTGF e CYR61, relativamente ao controlo com soro (Figura 14), que necessitaria, contudo, de mais repetições para se alcançar significado estatístico.

Uma vez que foi possível verificar o efeito esperado de inibição na linha celular PC-3, procedeu-se ao silenciamento de RalGPS2 com privação de soro 12h antes do fim do tempo de incubação e posterior estimulação com FBS 10% durante 60 minutos. Os resultados, da análise posterior da expressão relativa de mRNA de CTGF e de RalGPS2 são apresentados na Figura 15. Nas amostras estimuladas com soro, embora o silenciamento de RalGPS2 tenha sido apenas parcialmente eficaz, verifica-se o aumento da expressão de CTGF relativamente a células controlo não estimuladas, não diferente do observado em células controlo submetidas ao mesmo estímulo, embora devido à elevada variabilidade e à dimensão do ensaio (falta de repetições), não seja significativo estatisticamente.

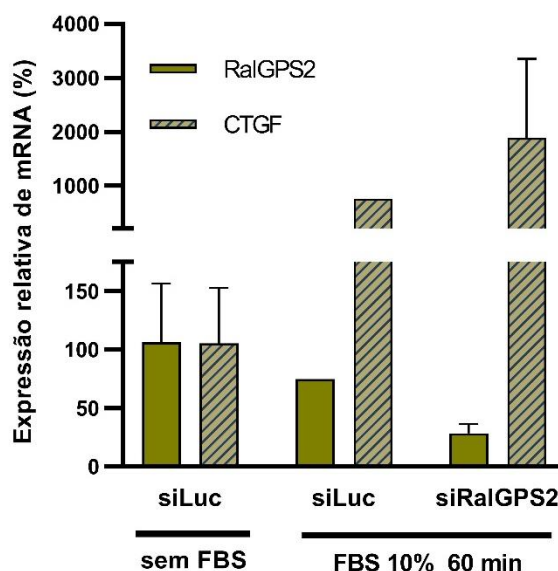


Figura 15 - Análise da expressão de mRNA de CTGF e RalGPS2 por qPCR, após transfeção com siRalGPS2 #231 e privação (24 h) ou estímulo (60 min) com FBS 10% em células PC-3.

O efeito foi estatisticamente comparado por *Two-way* ANOVA. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de um ensaio independente e n=2 ou n=1 amostras quantificadas em triplicado.

Conclui-se que o estímulo da via de sinalização por FBS, tem tendência para induzir a atividade transcricional de YAP/TAZ, embora não tenha sido possível concluí-lo com significância. A inibição de RalGPS2 não parece ter resultado em extensão suficiente, não sendo possível concluir acerca do seu papel na diminuição da transcrição dos genes alvo de YAP/TAZ. Contudo, o conjunto dos resultados obtidos parece indicar que RalGPS2 não é necessária para a ativação dos cofatores YAP/TAZ, quer constitutiva, quer sob estímulo de FBS, em células PC-3.

Capítulo 5

Conclusões e perspetivas futuras

No presente trabalho pretendeu-se avaliar a hipótese do possível envolvimento de RalGPS2 na regulação da via de sinalização Hippo. Não tendo sido possível validar condições de crescimento de esferoides da presença de soro adequadas, procedeu-se ao silenciamento do gene de RalGPS2 por siRNA apenas em células cultivadas em condições de aderência, recorrendo-se a uma sequência de siRNA usada em trabalhos anteriores e a um *pool* de siRNAs contra RalGPS2. Este silenciamento revelou ter um efeito na redução do crescimento celular de PC-3, indicado pela diminuição da percentagem de células viáveis capazes de reduzir a forma oxidada (não fluorescente) da resazurina a resorfurina, em cerca de 59% relativamente às células transfetadas com um controlo negativo (siRNA contra o gene da luciferase, não presente em células humanas).

A análise da expressão de mRNA de RalGPS2 por qPCR, indicou a eficácia do silenciamento, tendo diminuído significativamente quer aos 3 quer aos 5 dias de incubação após a transfeção. O efeito de diminuição do crescimento celular induzido pelo silenciamento causou a apoptose espontânea das células transfetadas, tal como mostrado pelo ensaio de citometria de fluxo com marcação do conteúdo nuclear fragmentado por iodeto de propídio. Este ensaio permitiu ainda analisar a percentagem relativa de células nas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados não foram conclusivos, uma vez que indicaram a indução de paragens em G2/M ou G0/G1 (tendência sem significado estatístico devido ao baixo número de repetições) ou G2/M, dependendo da sequência com que foi realizada a transfeção (siRalGPS2 #231 ou *pool* de siRalGPS2), supondo-se a possível existência de efeitos *off target*.

Foi também possível observar os efeitos do silenciamento na alteração da morfologia das células ao microscópio. Para além da redução do número de células, foi possível verificar defeitos na membrana, característicos de apoptose.

Ao contrário do expectável, o silenciamento não mostrou reduzir os níveis de expressão de mRNA de dois genes regulados pelos co-ativadores transcricionais YAP/TAZ da via de sinalização Hippo. A expressão de CTGF e de CYR61 foi avaliada em condições de estímulo por FBS e de inibição por sinvastatina, as quais tiveram o efeito esperado de

aumento e diminuição da expressão, ao contrário do silenciamento, o qual não revelou estar associado à diminuição da atividade de YAP/TAZ. Procedeu-se ainda ao silenciamento de RalGPS2 em condições de estímulo por FBS de modo a perceber se teria influência na expressão de mRNA de CTGF. Novamente, não foi observada diminuição da expressão verificando-se, contudo, que o silenciamento não foi totalmente eficaz.

Embora o silenciamento de RalGPS2 não tenha mostrado estar associado à inativação dos co-ativadores de transcrição YAP/TAZ, havendo dificuldade também na reprodutibilidade do nível de silenciamento, a observação de redução do crescimento celular por indução de apoptose e aparente paragem no ciclo celular indicam o papel relevante, e fracamente explorado, deste fator de troca de nucleótidos de guanina. No futuro, seria importante avaliar e estudar a sua influência noutras linhas celulares de CaP de forma a confirmar estas descobertas.

Bibliografia

- [1] F. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] B. J. Thompson, “YAP/TAZ: Drivers of Tumor Growth, Metastasis, and Resistance to Therapy,” *Bioessays*, vol. 42, no. 5, p. e1900162, 2020, doi: 10.1002/bies.201900162.
- [3] S. Schubbert, K. Shannon, and G. Bollag, “Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 295–308, 2007, doi: 10.1038/nrc2109.
- [4] J. W. Yang, G., Ayala, G., De Marzo, A., Tian, W., Frolov, A., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., & Harper, “Elevated Skp2 protein expression in human prostate cancer: association with loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and PTEN and with reduced recurrence-free survival,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 3419–3426, 2002, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12429629/>.
- [5] 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, p. e0154840, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0154840.
- [6] W. B. I. William G. Nelson, Angelo M. De Marzo, “Mechanisms of Disease Prostate Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 4, pp. 366–381, 2003, doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMra021562>.
- [7] R. Schrecengost and K. E. Knudsen, “Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer,” *Semin. Oncol.*, vol. 40, no. 3, pp. 244–258, 2013, doi: 10.1053/j.seminoncol.2013.04.001.
- [8] S. Haffner, M. C., Zwart, W., Roudier, M. P., True, L. D., Nelson, W. G., Epstein, J. I., De Marzo, A. M., Nelson, P. S., & Yegnasubramanian, “Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer,” *Nat. Rev. Urol.*, vol. 18, no. 2, pp. 79–92, 2021, doi: <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00400-w>.
- [9] M. A. Rubin and A. M. De Marzo, “Molecular genetics of human prostate cancer,” *Mod. Pathol.*, vol. 17, no. 3, pp. 380–388, 2004, doi: 10.1038/modpathol.3800051.
- [10] R. V. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, “The 2016 WHO

- Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours,” *Eur. Urol.*, vol. 70, no. 1, pp. 106–119, 2016, doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028.
- [11] J. A. Joshua, A. M., Evans, A., Van der Kwast, T., Zielenska, M., Meeker, A. K., Chinnaiyan, A., & Squire, “Prostatic preneoplasia and beyond,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1785, no. 2, pp. 156–181, 2008, doi: 10.1016/j.bbcan.2007.12.001.
- [12] G. P. Bell KJ, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, “Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies,” *Int. J. Cancer*, vol. 137, no. 7, pp. 1749–1757, 2015, doi: 10.1002/ijc.29538.
- [13] de B. J. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, Drake CG, “Prostate cancer,” *Lancet*, vol. 387, no. 10013, pp. 70–82, 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61947-4.
- [14] P. Rawla, “Epidemiology of prostate cancer,” *World J. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 63–89, 2019, doi: <https://doi.org/10.14740/wjon1191>.
- [15] N. Swami, U., McFarland, T. R., Nussenzveig, R., & Agarwal, “Advanced Prostate Cancer: Treatment Advances and Future Directions,” *Trends in Cancer*, vol. 6, no. 8, pp. 702–715, 2020, doi: 10.1016/j.trecan.2020.04.010.
- [16] K. C. Huang, M. Dolph, B. Donnelly, and T. A. Bismar, “ERG expression is associated with increased risk of biochemical relapse following radical prostatectomy in early onset prostate cancer,” *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 16, no. 11, pp. 973–979, 2014, doi: 10.1007/s12094-014-1182-x.
- [17] C. J. Neel, N. F., Martin, T. D., Stratford, J. K., Zand, T. P., Reiner, D. J., & Der, “The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery,” *Genes Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 275–287, 2011, doi: 10.1177/1947601911407329.
- [18] H. H. Shirakawa R, “Ral GTPases: crucial mediators of exocytosis and tumourigenesis,” *J. Biochem.*, vol. 157, no. 5, pp. 285–299, 2015, doi: 10.1093/jb/mvv029.
- [19] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2020,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, 2020, doi: 10.3322/caac.21590.
- [20] M. E. Ceriani M, Scandiuzzi C, Amigoni L, Tisi R, Berruti G, “Functional analysis of RalGPS2, a murine guanine nucleotide exchange factor for RalA GTPase,” *Exp. Cell Res.*, vol. 313, no. 11, pp. 2293–2307, 2007, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.016.
- [21] The Human Protein Atlas, “RALGPS2,” 2021. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116191-RALGPS2>.

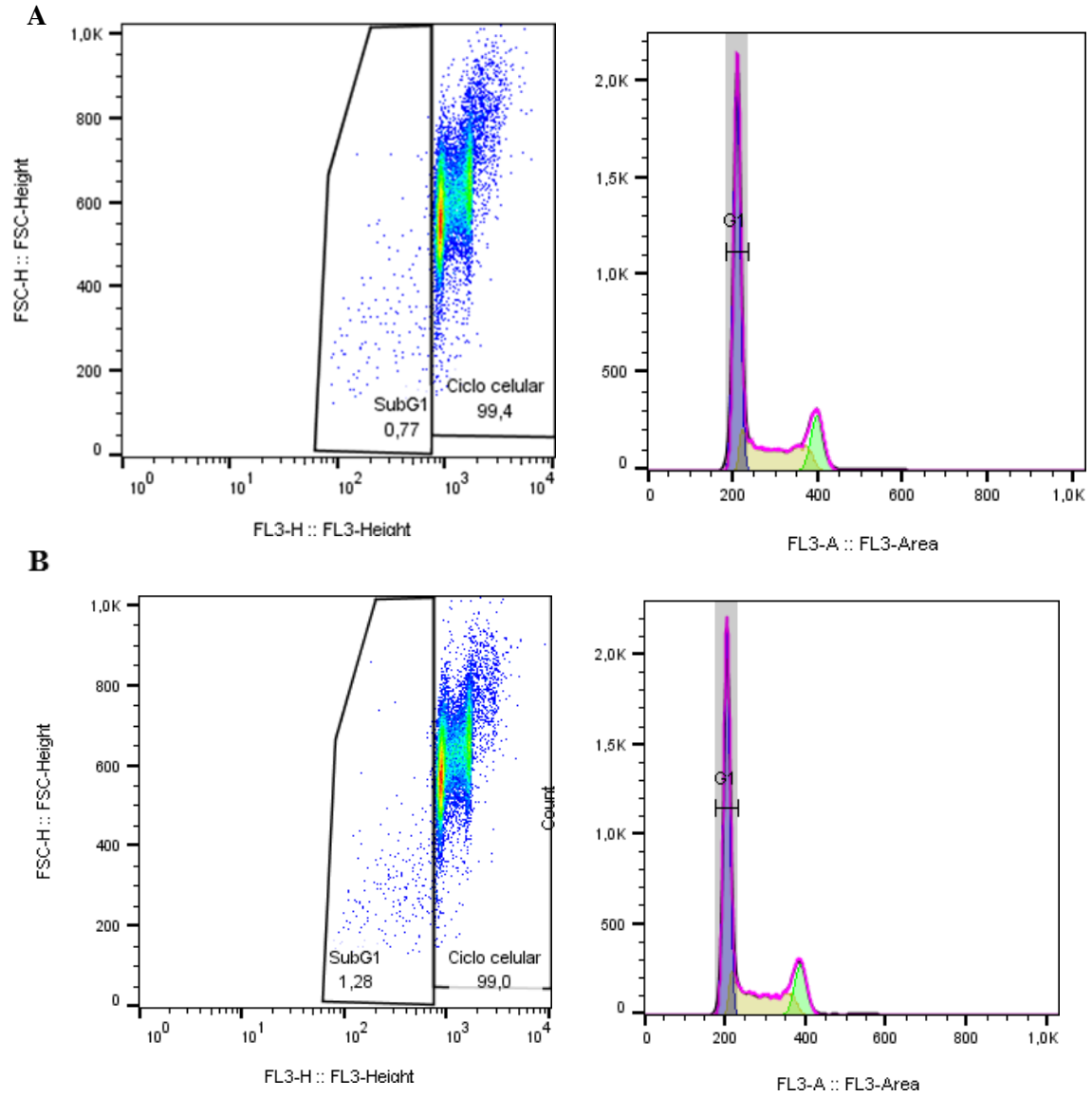
- [22] J. Cascone, I. Selimoglu, R. Ozdemir, C., Del Nery, E., Yeaman, C., White, M., & Camonis, “Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs,” *EMBO J.*, vol. 27, no. 18, pp. 2375–2387, 2008, doi: 10.1038/emboj.2008.166.
- [23] A. D’Aloia *et al.*, “RalGPS2 is involved in tunneling nanotubes formation in 5637 bladder cancer cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 362, no. 2, pp. 349–361, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.036>.
- [24] M. Kango-Singh and A. Singh, “Regulation of organ size: insights from the Drosophila Hippo signaling pathway,” *Dev. Dyn.*, vol. 238, no. 7, pp. 1627–1637, 2009, doi: 10.1002/dvdy.21996.
- [25] Z. Meng, T. Moroishi, and K. L. Guan, “Mechanisms of Hippo pathway regulation,” *Genes Dev.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–17, 2016, doi: 10.1101/gad.274027.115.
- [26] J. Mo, H. W. Park, and K. Guan, “The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer,” *EMBO Rep.*, vol. 15, no. 6, pp. 642–656, 2014, doi: 10.15252/embr.201438638.
- [27] R. Johnson and G. Halder, “The two faces of Hippo: Targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 1, pp. 63–79, 2014, doi: <https://doi.org/10.1038/nrd4161>.
- [28] F. K. Collak, U. Demir, and F. Sagir, “YAP1 Is Involved in Tumorigenic Properties of Prostate Cancer Cells,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 26, no. 2, pp. 867–876, 2020, doi: 10.1007/s12253-019-00634-z.
- [29] Salem and Hansen, “The Hippo Pathway in Prostate Cancer,” *Cells*, vol. 8, no. 4, p. 370, 2019, doi: 10.3390/cells8040370.
- [30] N. Jiang *et al.*, “YAP1 regulates prostate cancer stem cell-like characteristics to promote castration resistant growth,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 70, pp. 115054–115067, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.23014.
- [31] N. Liu *et al.*, “Phosphodiesterase 5/protein kinase G signal governs stemness of prostate cancer stem cells through Hippo pathway,” *Cancer Lett.*, vol. 378, no. 1, pp. 38–50, 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.010.
- [32] I. M. Moya and G. Halder, “Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, no. 4, pp. 211–226, 2019, doi: 10.1038/s41580-018-0086-y.
- [33] F. X. Yu and K. L. Guan, “The Hippo pathway: Regulators and regulations,” *Genes Dev.*, vol. 27, no. 4, pp. 355–371, 2013, doi: 10.1101/gad.210773.112.
- [34] E. Miller *et al.*, “Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP,” *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 8, pp. 955–962, 2012,

doi: 10.1016/j.chembiol.2012.07.005.

- [35] F. X. Yu *et al.*, “Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling,” *Cell*, vol. 150, no. 4, pp. 780–791, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.037.
- [36] P. Y. Wu, Y. C. Lin, Y. L. Huang, W. M. Chen, C. C. Chen, and H. Lee, “Mechanisms of Lysophosphatidic Acid-Mediated Lymphangiogenesis in Prostate Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 11, p. 413, 2018, doi: 10.3390/cancers10110413.
- [37] W. W. Han H, Qi R, Zhou JJ, Ta AP, Yang B, Nakaoka HJ, Seo G, Guan KL, Luo R, “Regulation of the Hippo pathway by phosphatidic acid-mediated lipid-protein interaction,” *Mol Cell*, vol. 72, no. 2, pp. 328–340.e8, 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.038. Regulation.
- [38] G. Sorrentino *et al.*, “Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 4, pp. 357–366, 2014, doi: 10.1038/ncb2936.
- [39] H. Zeng *et al.*, “Angiotensin regulates prostate cancer cell proliferation by signaling through the Hippo-YAP pathway,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 6, pp. 10145–10160, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14358.
- [40] C. Yeo, H. J. Lee, and E. O. Lee, “Serum promotes vasculogenic mimicry through the EphA2/VE-cadherin/AKT pathway in PC-3 human prostate cancer cells,” *Life Sci.*, vol. 221, pp. 267–273, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.043.
- [41] J. J. Fu *et al.*, “Spontaneous formation of tumor spheroid on a hydrophilic filter paper for cancer stem cell enrichment,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 174, no. November 2018, pp. 426–434, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.038.
- [42] S. A. Lee, Acumen Research Laboratories Pte Ltd, Singapore, and A. Jain, Tip Biosystems Pte Ltd, “MEASURING CELL-VIABILITY BY RESAZURIN (ALAMARBLUE) ASSAY USING PHOTOPETTE CELL,” 2017. [Online]. Available: https://tipbiosystems.com/wp-content/uploads/2020/05/AN016-Cell-Viability-using-Resazurin-Dye_2017_05_29.pdf.
- [43] P. MW, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, p. e45, 2001, doi: 10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x.
- [44] C. Riccardi and I. Nicoletti, “Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.238.

Apêndice

Resultados exemplificativos dos obtidos no ensaio de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio.



[continua na página seguinte]

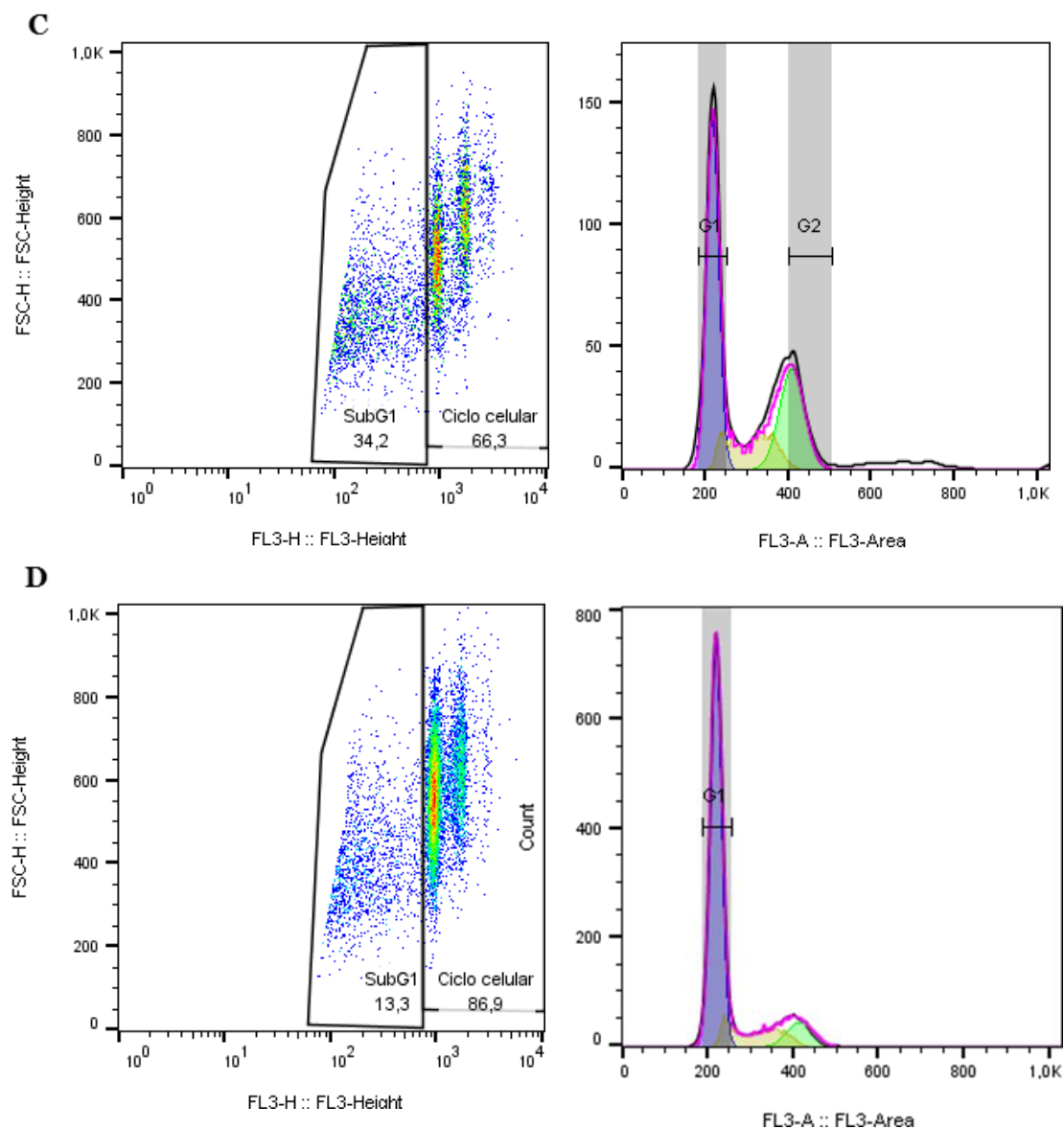


Figura Apêndice 1 - Análise de células apoptóticas após transfeção com os respetivos siRNAs. A. Controlo negativo, B. siLuc, C. siRalGPS2 #231 e D. *pool* de siRalGPS2. Nos gráficos da esquerda é possível distinguir os eventos pertencentes à região Sub-G₁, correspondentes às células apoptóticas, através do sinal de fluorescência (FL₃) e FCS (*forward scatter*). Esta análise foi feita depois de excluir eventos que não eram singletos, e excluindo os eventos considerados *debris* na aquisição. Está também identificada a área utilizada para a análise da distribuição no ciclo celular. À direita está representada a análise de distribuição do número de células em cada fase do ciclo celular (fase G₁ - roxo; fase S - amarelo; fase G₂ - verde).