

**ALEXANDRA DIOGO BENTO**

# **O PAPEL DE TRIB2 NA AUTOFAGIA**



Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2023

**ALEXANDRA DIOGO BENTO**

# **O PAPEL DE TRIB2 NA AUTOFAGIA**

**Mestrado em Oncobiologia:**

Mecanismos Moleculares do Cancro

**Trabalho desenvolvido pela supervisão de:**

Professora Doutora Bibiana Ferreira

Professor Doutor Wolfgang Link



Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2023

# **O PAPEL DE TRIB2 NA AUTOFAGIA**

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

Alexandra Diogo Bento

Copyright © 2023 Alexandra Diogo Bento

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Bibiana Ferreira por me ter recebido e orientado da melhor forma possível. Pelos conselhos pessoais, pela compreensão e por me ter levantado quando me senti perdida. Agradeço ao Professor Doutor Wolfgang Link por todo o apoio e disponibilidade que demonstrou ao longo deste percurso. Aos meus colegas de laboratório, Inês Grenho, Bruno Santos, Ana Luísa e Cristiana Mourato, por todo o conhecimento transmitido, pela cooperação e palavras amigas.

Este percurso foi feito com muita força de vontade, resiliência e empenho, três fatores que me foram transmitidos pela Gisela Serrão, que me acompanhou ao longo de todo o percurso desde o primeiro ao último dia. Gisela, agradeço-te por me teres transmitido todo o teu conhecimento e técnica laboratorial. Foste o meu maior apoio em todos os segundos neste projeto, passámos juntas por momentos muito difíceis, duros, foram muitas horas afim na esperança de tudo dar certo. És a prova de que o trabalho se torna mais leve quando temos amizade e companheirismo. Nunca me vou esquecer dos teus ensinamentos, tal como dos momentos de gargalhadas, cantorias de pimba, almoços sem assunto nenhum, jantares no carro e claro, aqueles momentos de choro que tivemos (que foram necessários também). Espero que guardes todas as minhas piadas e expressões no coração e que no futuro te valorizes mais. Nunca te esqueças que és uma excelente investigadora!

Quero agradecer também aos meus amigos do ABC-RI: Giulia, Rafaela, Tomás, Anna, José Miguel, Mónica, Cristina e Gil pelas palavras de incentivo que me deram. Ao Gonçalo Pinheiro, quero lhe agradecer pelos momentos de debate científico, almoços de risos e alguns momentos de desabafos. Ensinou-me a ser crítica e a olhar para a ciência com outros olhos, demonstrando o grande investigador que é e sempre será.

Aos meus amigos algarvios que estavam sempre prontos para um café, onde a ciência não lhes interessava, mas faziam aquele esforço de me ouvir a falar sobre autofagia e TRIB2, vezes e vezes sem conta: João Veiga, Guilherme Antunes, Henrique Gomes, Mariana Lima, Marta Costa, Catarina Melo, Gonçalo Fonseca, Beatriz Rodrigues e Érica Almeida. Obrigada por perceberem que as vezes é necessário abdicar da vida social para nos focarmos no caminho! Aos meus amigos de longa data que estão longe, mas sempre presentes, um grande obrigado!

Agradeço ao João Costa por todo o carinho que me transmitiu ao longo deste percurso, pela paciência e apoio incondicional.

Agradeço também à Rita Marques, à Marisa Nunes e a Sílvia Eugénio por estarem sempre lá para mim e por me ajudarem nas adversidades.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio transmitido à distância.

Agradeço à minha mãe e padraсто por não serem só os melhores pais do mundo, como os meus melhores amigos, pela força que me transmitiram, por todo o esforço que fizeram para estar onde estou. Obrigada por todos os valores, por compreenderem todas as situações e mais alguma e por correrem o mundo por mim. Por todas as chamadas à distância, pelas palavras carinhosas e por toda a força transmitida. Agradeço-vos por nunca me deixarem desistir em nenhum momento. É preciso insistir, mas nunca desistir. Aos meus irmãos: Íris, Iara e Kévim que são uma inspiração para mim, por me demonstrarem que há sempre um lado positivo, que somos os quatro diferentes, mas unidos e resilientes em todas as circunstâncias. Obrigada por serem um porto de abrigo e me fazerem rir quando os dias são negros. Esteja onde estiver, estarão sempre comigo!

Por fim, quero dedicar esta tese às minhas avós: Odete e Marquinhas e ao meu avô Henrique Diogo. Obrigada por tudo o que fizeram por mim, por nunca me deixarem só, por me tornarem no que sou. Tenho a certeza que estaríamos a celebrar com muitas gargalhadas. Com muito carinho, isto é para vocês.

## Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo. As células cancerígenas beneficiam de processos celulares como a autofagia para sobreviver a condições de stress no seu microambiente, como privação de nutrientes, baixos níveis de energia e hipóxia. Em vários tipos de tumor a via de PI3K/AKT está hiperactiva, o que permite que a cinase mTOR, regulador da proliferação celular, apoptose e regulador negativo da autofagia, esteja ativo. Na quimioterapia convencional são utilizados inibidores de mTOR e PI3K/AKT, que consequentemente ativam a autofagia, o que resulta na sobrevivência das células cancerígenas e resistência aos tratamentos. A proteína TRIB2 é uma pseudocinase descrita como um oncogene que favorece a ativação da via de PI3K/AKT. É um membro da família TRIBBLES que inclui TRIB1 e TRIB3. Previamente foi publicado por diferentes grupos de investigação que a sobreexpressão de TRIB3 parece ter em vários contextos tumorais uma ação oposta à exercida por TRIB2, conferindo características de gene supressor de tumor. No contexto autofágico, TRIB3 parece suprimir a indução da autofagia conferindo às células acumulação de fatores promotores de tumor. Tendo em conta estes dados, propusemos estudar o papel de TRIB2 no processo autofágico.

Sabendo que TRIB2 e TRIB3 parecem exercer em determinadas circunstâncias papéis antagónicos, a nossa hipótese é que tumores com elevados níveis de TRIB2 levariam a um aumento no fluxo autofágico.

Os nossos dados demonstraram que células com sobreexpressão de TRIB2 apresentam níveis reduzidos de expressão de genes autofágicos. A análise de autofagossomas e autolisossomas por microscopia confocal permitiu concluir que a dinâmica do fluxo autofágico é menor em células que sobreexpressam TRIB2. Quando analisámos o impacto da presença de TRIB2, quando a autofagia está bloqueada, verificaram-se níveis elevados de morte celular, o que indica que células com TRIB2 são mais vulneráveis ao bloqueio da autofagia. Assim, concluímos que a nossa hipótese é refutada e que TRIB2 inibe o fluxo autofágico. O nosso estudo contribui para o conhecimento de TRIB2 na autofagia, e vem reforçar a importância deste biomarcador tumoral na terapêutica de tumores com elevados níveis de TRIB2. No entanto é necessário explorar o mecanismo pelo qual a proteína TRIB2 inibe a autofagia. Em suma, pacientes com elevados níveis de TRIB2 podem beneficiar de compostos que inibam diretamente a via de PI3K/AKT e o fluxo autofágico.

**Palavras-chave:** TRIB2, autofagia, marcadores autofágicos, mTOR.

## **Abstract**

Cancer is one of the main causes of death in the world. Cancer cells benefit from cellular processes such as autophagy to survive stressful conditions in their microenvironment, such as nutrient deprivation, low energy levels, and hypoxia. In several tumor types, the PI3K/AKT pathway is hyperactivated, which allows the mTOR kinase, a major regulator of cell proliferation, apoptosis, and negative regulator of autophagy, to be active. In conventional chemotherapy, mTOR and PI3K/AKT inhibitors are used, which consequently activate autophagy, resulting in cancer cell survival and resistance to treatments. The TRIB2 protein is a pseudokinase described as an oncogene that contributes to PI3K/AKT pathway activation. It is a member of the TRIBLES family, which also includes TRIB1 and TRIB3. Previously, different research groups reported that TRIB3 overexpression appears to have the opposite effect of TRIB2 in several tumor contexts, conferring tumor suppressor gene characteristics. TRIB3 appears to suppress autophagy induction in the autophagic context by allowing cells to accumulate tumor-promoting factors. Taking these data together, we proposed to study the role of TRIB2 in the autophagic process.

It has been proposed that TRIB2 and TRIB3 may have antagonistic roles under certain circumstances, our hypothesis is that tumors with high levels of TRIB2 would lead to an increase in autophagic flux.

Our data demonstrated that cells overexpressing TRIB2 have reduced levels of autophagic gene expression. Analysis of autophagosomes and autolysosomes by confocal microscopy allowed us to conclude that autophagic flux dynamics are lower in cells overexpressing TRIB2. When we analyzed the impact of TRIB2 presence when autophagy is blocked, high levels of cell death were observed, indicating that cells with more TRIB2 are more vulnerable to autophagy blockage. However, we conclude that our hypothesis is refuted and that TRIB2 inhibits autophagic flux. Our study contributes to the knowledge of TRIB2 in autophagy and reinforces the importance of this tumor biomarker in the therapy of tumors with high levels of TRIB2. However, it is necessary to explore the mechanism by which the TRIB2 protein inhibits autophagy. In summary, patients with high levels of TRIB2 may benefit from compounds that directly inhibit the PI3K/AKT pathway and autophagic flux.

**Keywords:** TRIB2, autophagy, autophagic markers, mTOR.

# Índice

Agradecimentos.....	iii
Abstract .....	v
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1.Cancro.....	1
1.1.1.Mecanismos moleculares do cancro .....	1
1.1.2.Vias de sinalização.....	10
1.2.Autofagia .....	15
1.2.1. Processo autofágico .....	16
1.3.Autofagia em cancro.....	18
1.3.1.Autofagia na supressão tumoral.....	18
1.3.2.Autofagia promotora de tumor.....	21
1.3.3.Autofagia na terapia contra o cancro .....	22
1.4. Mecanismos de regulação da autofagia .....	27
1.4.1.mTOR/PI3K.....	27
1.4.2.AMP-activated protein kinase (AMPK) .....	28
1.5.Tribbles.....	30
1.5.1.TRIB2 .....	32
1.5.2.Tribbles em autofagia .....	33
1.6.Hipótese.....	34
1.7.Objetivos.....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.1.Cultura de células .....	36
2.1.1.Linhas celulares estabelecidas .....	36
2.1.2.Descongelamento de células .....	36
2.1.3.Manutenção, stocks e contagem das linhas celulares .....	37
2.1.4.Extração e quantificação de proteína .....	39
2.2.Westernblot.....	41
2.2.1.SDS-PAGE .....	41
2.2.2.Transferência da proteína.....	42
2.2.3.Bloqueio da membrana .....	43
2.2.4.Incubação de anticorpos.....	43
2.3.Ensaio de morte celular com Trypan blue .....	45
2.4.Reação em cadeia de polimerase em tempo real .....	46
2.4.1.Extração de ARN .....	46

2.4.2.Síntese e amplificação de cADN .....	49
2.4.3.Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	50
2.5.Análise do Fluxo autofágico.....	53
3 RESULTADOS .....	57
3.1. Os genes TRIBBLES são afetados pelos tratamentos de EBSS.....	57
3.2. Os níveis proteicos dos TRIBBLES são afetados pelos tratamentos de EBSS .....	59
3.3. Células com sobreexpressão de TRIB2 apresentam níveis reduzidos de expressão de genes autofágicos .....	61
3.4. TRIB2 altera o fluxo autofágico .....	63
3.5. Inibidor de ULK1 e Spautina-1 reduzem os níveis de expressão de TRIB2 .....	67
3.6. Efeito de TRIB2 na morte celular quando o fluxo autofágico é inibido .....	70
3.6.1. Efeito do bloqueio do fluxo autofágico com cloroquina .....	72
3.7. Células com TRIB2 são mais vulneráveis à morte celular em condições de bloqueio do fluxo autofágico com cloroquina.....	74
3.8. Células com TRIB2 acumulam mais p62 e menos LC3-II em condições de indução e bloqueio do fluxo com cloroquina.....	75
3.9. Efeito do MG132 nos níveis da proteína TRIB2.....	77
3.10. Expressão dos marcadores autofágicos com recuperação dos níveis de TRIB2 .....	78
3.11. Efeito de TRIB2 por indução a montante da via autofágica.....	80
3.11.1. Tempo estabelecido para o inibidor de mTORC1-Rapamicina.....	80
3.11.2. Impacto de TRIB2 na expressão dos marcadores autofágicos após o tratamento com rapamicina e cloroquina.....	82
3.12. Células com TRIB2 são mais vulneráveis à morte celular quando o fluxo é induzido com Rapamicina e PIK75 e inibido com cloroquina .....	83
3.13. TRIB2 altera o fluxo autofágico às 3 horas de tratamento .....	85
3.14. Células com TRIB2 acumulam mais autofagossomas em condições basais e de indução do fluxo autofágico.....	87
4 DISCUSSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS .....	93
5 CONCLUSÃO .....	102
6 REFERÊNCIAS .....	104

## Índice de Ilustrações

Figura 1.1-Hallmarks do cancro.....	10
Figura 1.2-Representação da via a montante de PI3K/Akt.....	12
Figura 1.3-Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	14
Figura 1.4- Representação dos três tipos de autofagia.....	16
Figura 1.5- Processo autofágica.....	18
Figura1.6-Possíveis mecanismos pelos quais a autofagia prejudicada promove a tumorigénese.....	20
Figura 1.7- Papel da autofagia na tumorigénese.....	22
Figura 1.8- Duplo papel da autofagia na terapêutica do cancro.....	24
Figura 1.9- Sinalização da proteína quinase ativada por AMPK e mTOR.....	29
Figura1.10-Regulação de ULK1 por AMPK e mTORC1 em resposta aos níveis de glicose.....	30
Figura 1.11 -Estrutura da família Tribbles.....	31
Figura 1.12-TRIB3 interage com p62 e inibe o processo autofágico.....	34
Figura 2.1-Contagem de células na Câmara de <i>Neubauer</i> .....	38
Figura 2.2- Curva padrão da concentração de BSA.....	40
Figura 2.3-Representação esquemática do gel SDS-PAGE.....	42
Figura 2.4-Esquematização da transferência na técnica de <i>Western blot</i> .....	43
Figura 2.5-Esquematização do protocolo da extração de ARN.....	48
Figura 2.6-Esquema ilustrativo do protocolo de síntese de cADN.....	50
Figura 2.7-Diagrama esquemático do repórter RFP-GFP-LC3.....	54
Figura 2.8-Protocolo de transfeção com Lipofectamina em placas de 24 poços .....	55
Figura 3.1- Níveis de expressão de mARN dos genes TRIBBLES após tratamento com EBSS.....	58
Figura 3.2- Análise dos níveis proteicos dos Tribbles em tratamentos com EBSS.....	61

Figura 3.3-Níveis de expressão de mRNA dos genes autofágicos após tratamentos com EBSS.....	62
Figura 3.4- Ilustração esquemática da detecção do fluxo por <i>western-blot</i> .....	64
Figura 3.5-Análise da expressão de LC3-II e p62 após indução da autofagia e bloqueio com cloroquina.....	65
Figura 3.6-Análise da expressão de LC3-II e p62 após indução da autofagia e bloqueio com SBI-0206965 e spautina-1.....	68
Figura 3.7- Avaliação da percentagem de morte celular após tratamentos com SBI-0206965 e Cloroquina.....	71
Figura 3.8-Estabelecimento da concentração de cloroquina a ser utilizada no bloqueio do fluxo autofágico.....	73
Figura 3.9- Fluxo autofágico é alterado na presença de TRIB2 em condições de indução e bloqueio do fluxo com cloroquina.....	74
Figura 3.10- Efeito de TRIB2 na expressão dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 após indução e bloqueio da autofagia com cloroquina a 100µM.....	76
Figura 3.11-Efeito do MG132 nos níveis da proteína de TRIB2.....	78
Figura 3.12- Expressão dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 com recuperação dos níveis proteicos de TRIB2 após indução e bloqueio do fluxo autofágico.....	79
Figura 3.13- Estabelecimento do tempo para a indução da autofagia com a rapamicina.....	81
Figura 3.14- Análise dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 após indução do fluxo autofágico com rapamicina e inibição com cloroquina.....	82
Figura 3.15- Análise estatística da indução de autofagia por Rapamicina e PIK75 com inibição por cloroquina em células com TRIB2 (U2OS #1163) .....	84
Figura 3.16- Análise da expressão de LC3-II e p62 após indução da autofagia e bloqueio com cloroquina às 3 horas de tratamento.....	86
Figura 3.17- Análise por imunofluorescência do fluxo autofágico nas linhas celulares U2OS wild-type e U2OS #1163.....	89

Figura 3.18- Quantificação dos GFP-RFP-LC3 puncta e número médio total de puncta por célula para as linhas celulares U2OS wild-type e U2OS #1163 às 3 e 6 horas de tratamento.....	90
Figura 4.1- Análise esperada para imunofluorescência com GFP-LC3.....	99
Figura 4.2- Ligação de p62 com substratos autofágicos poliubiquitinados ao domínio de pseudocinase de TRIB2.....	100
Figura 4.3-TRIB2 à semelhança de TRIB3 poderá interagir com p62 e inibe o processo autofágico.....	101
Figura 5.1-Pacientes com níveis elevados de TRIB2 podem beneficiar de compostos que inibam tanto a via de PI3K/AKT como o fluxo autofágico.....	103

## Índice de tabelas

Tabela 2.1: Percentagem de acrilamida de acordo com os intervalos de tamanho das proteínas em SDS-PAGE.....	41
Tabela 2.2: Lista de anticorpos primários e secundários para a análise por Western-blot.....	44
Tabela 2.3: Lista de <i>primers</i> usados para a análise de RT-qPCR.....	51

## Índice de equações

Equação 2.1: Fold change do cálculo da expressão do gene .....	52
--	----

## Abreviaturas

### A

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AMP:** adenosina monofosfato

**AMPK:** proteína cinase ativada por AMP

**As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** trióxido de arsénio

**ATG:** *Autophagy-related proteins*

**ATP:** Adenosina trifosfato

**ARN:** ácido ribonucleico

### B

**BSA:** *Bovine Serum Albumine*

### C

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementar

**CMA:** autofagia mediada por chaperonas

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

### D

**DNA:** *deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)*

**dNTPs:** desoxirribonucleotídeos de trifosfato

**DMSO:** *dimetil sulfóxido*

**DMEM:** *dulbecco`s modified eagle medium*

### E

**EBSS:** *Earle's Balanced Salt Solution*

**ECL:** *enhanced chemiluminescence*

**ECM:** matriz extracelular

**EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*

**EGFR-TKIs:** inibidores de tirosina quinase do recetor do fator de crescimento epidérmico

**EMT:** transição epitélio-mesenquimal

### F

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*

**FOXO:** *Forkhead box O*

## G

**GDP:** guanosina difosfato

**GPCR:** recetor acoplado à proteína G

**GTP:** guanosina trifosfato

## H

**H<sub>2</sub>O:** água

**HCQ:** hidroxicloroquina

**HRP:** *horseradish peroxidase*

## L

**LIR:** região de interação a LC3

**LKB1:** cinase hepática

## M

**MAP1-LC3:** microtubule-associated protein 1 light chain 3

**MAP3K1:** *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1*

**MET:** transição mesenquimal-epitelial

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio

**mTOR:** *mammalian target of rapamycin*

**mTORC1:** *mammalian target of rapamycin complex 1*

**mTORC2:** *mammalian target of rapamycin complex 2*

**mLST8:** *mammalian lethal with Sec13 protein 8*

**mSin1:** proteína 1 de interação com MAPK ativada por stress em mamíferos

## N

**NK:** *natural killers*

**NKG2D:** *recetor natural killer group 2D*

## P

**PBS:** *Phosphate-Buffered Saline*

**PCR:** Reação em cadeia de polimerase

**PKC:** cinase 3'-fosfoinositideo dependente da cinase 1

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PH:**homologia de *pleckstrin*

**PI:** fosfotidilinositol  
**PI3K:** fosfotidilinositol 3-cinase  
**PICs:** *protease inhibitors cocktail*  
**PIP2:** fosfotidilinositol-4,5-bifosfato  
**PIP3:** fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfato  
**PI3P:** trifosfato de fosfotidilinositol  
**PKB:** proteína cinase B  
**PTEN:** *Phosphatase and tensin homolog*  
**PVDF:** *Polyvinylidene fluoride*

## R

**Rb:** *retinoblastoma*  
**Rheb:** homólogo de Ras enriquecido no cérebro  
**RNA:** *ribonucleic acid*  
**RNS:** espécies restaivas de nitrogénio  
**ROS:** espécies reativas de oxigénio  
**RT:** Transcriptase reversa  
**RPTK:** recetor de proteína tirosina quinase

## S

**SAHA:** ácido hidroxámico suberoilánilida  
**SASP:** senescence-associated secretor phenotype  
**SDS:** dodecil sulfato de sódio  
**siRNA:** *small interfering RNA*  
**SNAREs:** *Soluble NSF attachment protein receptors*

## T

**TBS-T:** *Tris-Buffer Saline Tween-20*  
**TEMED:** *Tetramethylethylenediamine*  
**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor beta*  
**TKIs:** inibidores de tirosina cinase  
**TP53:** *Tumour Protein P53*  
**TSAs:** antígenos específicos do tumor  
**TSC:** complexo de esclerose tuberosa

## U

**UBA:** domínio associada à ubiquitina

**ULK1:** *unc-51-like cinase*

**UPS:** sistema ubiquitina-proteossoma

## V

**VEGF:** fator de crescimento endotelial vascular

**VPS:** *Vacuolar Protein Sorting*

## W

**WT:** *Wild-type*

## Outros

**µg:** microgramas

**µL:** microlitros

**mL:** mililitros

**5-FU:** *5-Fluorouracil*

“Nunca tenha a certeza de nada, porque a sabedoria começa com a  
dúvida”

Sigmund Freud



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Cancro

O cancro é uma das principais causas de mortalidade no mundo<sup>1</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2020 foram registadas cerca de 10 milhões de mortes causadas por cancro e espera-se que em 2040 a sua ocorrência suba para mais de 29 milhões<sup>2,3</sup>. Dados de 2020 revelaram que o cancro da próstata, pulmão e colorretal são responsáveis por cerca de 43% de todos os cancros diagnosticados em homens. Entre as mulheres, 50% dos tumores são tumores da mama, pulmão e colorretal<sup>2</sup>. Em Portugal, foram registados 60.467 novos casos e 30.168 mortes em 2020<sup>4</sup>. Uma vez que o cancro é uma das principais causas de morte, em particular precoce, há décadas que os cientistas tentam entender os mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento, e de que forma se pode interferir para abrandar ou interromper a sua formação e progressão.

### 1.1.1 Mecanismos moleculares do cancro

A tumorigénese é um processo evolutivo durante o qual ocorrem uma série de várias alterações genéticas e epigenéticas ao longo do tempo e que permitem que as células normais se transformem progressivamente em células cancerígenas<sup>5,6</sup>.

Em 2000 *Hanahan e Weinberg* publicaram o artigo “*Hallmarks of cancer*” no qual dão uma perspetiva do conhecimento adquirido ao longo dos anos sobre o desenvolvimento de uma célula tumoral, demonstrando que todas as células tumorais têm características comuns<sup>5</sup> (Figura 1.1). Este artigo categorizou estas alterações em seis *Hallmarks* comuns a todas as células cancerígenas: Sustentação da sinalização proliferativa, evasão aos supressores de tumor, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogénese e invasão e metástase.

#### 1.1.1.1 Sustentação da sinalização proliferativa

As células normais requerem fatores de crescimento para se manterem viáveis<sup>5,6</sup>. Estes fatores, ligam-se a recetores de membrana ou outras moléculas induzidas pelas células vizinhas dando sinal às células para proliferarem e dividirem<sup>7</sup>. Estas instruções são deste modo, fundamentais para garantir o controlo do número e posição das células dentro de um tecido<sup>7,8</sup>.

Contrariamente, o crescimento de uma célula neoplásica é independente de fatores de crescimento, proliferando em condições que não são favoráveis, isto é, estas geram os seus próprios sinais de crescimento independentes do meio circundante<sup>5,6</sup>.

Mutações nas vias de sinalização pro-oncogénicas induzem redes de transcrição que sustentam o crescimento e proliferação de células cancerígenas.

### **1.1.1.2 Evasão aos supressores de tumor**

Dentro de um tecido normal, múltiplos sinais anti-proliferativos operam para manter a estabilidade do tecido<sup>5</sup>. Estes sinais podem bloquear a proliferação celular de duas formas. Quando existem danos celulares, as células são forçadas a entrar num estado quiescente, estado não proliferativo em que as células não se dividem, mas têm a capacidade de retornar ao ciclo celular, quando devidamente estimuladas<sup>7</sup>. Por outro lado, quando esses danos são irreparáveis, as células podem ser induzidas a abandonar permanentemente o ciclo celular e ativar o processo apoptótico (morte celular programada)<sup>7,9</sup>. Estes programas de regulação negativa da proliferação celular dependem de genes supressores de tumor, cuja função é limitar a proliferação, garantindo a replicação e reparação correta do ácido desoxirribonucleico (ADN) de uma célula. Estes genes são também denominados *gatekeepers* e atuam em *checkpoints* do ciclo celular onde verificam se a célula está em condições de se dividir ou não<sup>7,9</sup>. Nas células cancerígenas estes *checkpoints* estão defeituosos e estas células replicam o seu ADN apesar do dano, progredindo assim no ciclo celular. O contorno dos sinais anti-proliferativos é conseguido deste modo através de mutações (alterações que ocorrem no conteúdo da informação de um gene) em genes supressores de tumor, em que ambos os alelos de um gene devem ser inativados para alterar o comportamento de uma célula<sup>5-7,9</sup>.

### **1.1.1.3 Resistência à morte celular**

A apoptose é um processo de morte celular programada e a sua função é eliminar células que se encontram danificadas após diversas reparações<sup>7</sup>. A resistência à apoptose é uma das características adquiridas pelas células cancerígenas<sup>5,6</sup>. Estas células conseguem contornar a via apoptótica pela inibição de genes pré-apoptóticos e pela ativação de genes anti-apoptóticos. Deste modo, ambas as estratégias levam à proliferação de células que contêm danos no ADN e que a maquinaria de reparação da célula não conseguiu corrigir. Isto resulta na sobrevivência das células malignas<sup>5-7,9</sup>.

#### **1.1.1.4 Imortalidade replicativa**

As células humanas normais replicam-se por um número finito de vezes<sup>5,7</sup>. Esta divisão limitada acontece devido ao encurtamento dos telómeros (sequências de repetições nas extremidades dos cromossomos) a cada divisão celular. A telomerase, uma enzima que sintetiza estas repetições, têm uma atividade reduzida em células normais<sup>7</sup>. Por este motivo, com a perda dos telómeros, as células ficam com a proliferação comprometida e ativam programas de apoptose ou senescência. Células senescentes permanecem metabolicamente ativas, mas perdem irreversivelmente a capacidade de retomar o ciclo celular<sup>7</sup>. As células cancerígenas, contrariamente às normais, apresentam níveis constitutivamente elevados desta enzima, garantindo um potencial replicativo ilimitado<sup>5-7,9</sup>.

#### **1.1.1.5 Indução da angiogénese**

A angiogénese é um processo que induz a formação de vasos sanguíneos<sup>9</sup>. Este processo pode ocorrer em tecidos normais de acordo com as necessidades do organismo, como por exemplo, na cicatrização de feridas. A vascularização de um tecido é dependente do equilíbrio entre fatores pró e anti angiogénicos, que são proteínas de sinalização<sup>5,6,10</sup>. Estas proteínas ligam-se a recetores de células endoteliais (células do revestimento dos vasos sanguíneos) e a neovascularização só ocorre quando estas células passam de um estado quiescente (não proliferativo) para uma proliferação ativa. Está demonstrado que células neoplásicas perdem este equilíbrio e induzem a proliferação de células endoteliais, quer pelo aumento de fatores indutores, quer pela redução de fatores inibidores da angiogénese. As células tumorais ativam este mecanismo em resposta a baixos níveis de oxigénio (hipóxia) e à disponibilidade de nutrientes, que tem como consequência o aumento da proliferação e crescimento celular descontrolados<sup>10</sup>. A angiogénese desempenha desta forma um papel crucial na progressão do tumor<sup>5,6,9</sup>.

#### **1.1.1.6 Invasão e metástase**

As células cancerígenas tornam-se metastáticas quando adquirem a capacidade de se deslocarem e invadirem tecidos circundantes<sup>5</sup>. Para que o processo invasivo e metastático seja bem-sucedido, as células não só dependem das cinco características adquiridas descritas anteriormente como também de mudanças no seu microambiente<sup>5</sup>. Estas mudanças estão

associadas a alterações na ligação entre células e com a matriz extracelular<sup>9</sup>. As células normais são dependentes da ancoragem, isto é, necessitam da sua ligação aos componentes da matriz para sobreviverem e proliferarem. As células malignas para se tornarem invasivas têm de perder o fenótipo epitelial e sofrer alterações fenotípicas, um processo denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT)<sup>5,6,9</sup>. Entre as modificações caracterizadas até então, está a perda de expressão de E-caderina, uma molécula de adesão célula-célula e a alteração de integrinas, cuja função é a ligação das células aos componentes da matriz. A ativação de proteases, enzimas que quebram ligações peptídicas é também necessária para remodelar a matriz extracelular e permitir assim o avanço das células neoplásicas. Entre as diversas proteases descritas estão as metaloproteínas e proteases de catepsina<sup>5,11</sup>.

Após degradarem a matriz, as células invadem o estroma e acedem aos vasos sanguíneos (intravasão) que lhes permite deslocarem-se até outro tecido (transporte). Atualmente sabe-se que após a saída das células da corrente sanguínea para o novo órgão (extravasão), estas sofrem um processo reverso no seu fenótipo denominado transição mesenquimal-epitelial (MET). Este processo resulta na formação de novas colónias e posterior metástase<sup>5,6,9,11</sup>.

Em 2011 os mesmos autores propuseram mais quatro novas capacidades adquiridas: instabilidade genómica que confere heterogeneidade ao tumor; inflamação promotora de tumorigénese; reprogramação metabólica para sustentar as células neoplásicas e resistência à destruição pelo sistema imune<sup>6</sup> (Figura 1.1).

### **1.1.1.7 Instabilidade e mutação do genoma**

As células normais apresentam uma classe de genes que asseguram a integridade do genoma, conhecidos como *caretakers*<sup>7</sup>. Estes genes ao assegurarem a integridade do ADN, reduzem a probabilidade de mutações e anomalias cromossómicas. As células tumorais apresentam erros nos *caretakers* que estão envolvidos: na deteção de danos no ADN e ativação da maquinaria de reparação, reparação direta do ADN danificado e por fim inativação de moléculas mutagénicas. A perda da função destes genes é devido a mutações de inativação (semelhantes aos supressores de tumor) e repressão epigenética através da metilação de promotores. A metilação é a ligação de grupos metil a bases de citosina no ADN, quando esta ocorre no promotor de um gene pode causar repressão na sua transcrição<sup>9</sup>.

Os defeitos na manutenção e reparo do genoma conferem vantagem seletiva para a progressão do tumor, porque as células vão acumulando erros que levam a instabilidade genética e consequente aumento das taxas mutacionais<sup>6,7,9</sup>.

### **1.1.1.8 Inflamação promotora de tumor**

A inflamação é uma resposta do sistema imunitário a estímulos que podem causar lesões celulares e teciduais<sup>12</sup>. A inflamação pode ser aguda quando atua inicialmente no tecido e é de curta duração, ou crônica, quando se instala permanentemente. Estudos epidemiológicos sugerem que os tumores podem desenvolver-se em locais de infecção ou inflamação crônica e análises a biópsias tumorais demonstram a presença de células imunes<sup>6,13,14</sup>. A inflamação está implicada nas várias fases da carcinogênese. Inicialmente as células inflamatórias geram substâncias químicas, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) que participam na ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e entre outras alterações genéticas. Estas células tal como as tumorais também produzem mediadores pró-inflamatórios tais como citocinas e quimiocinas. As citocinas regulam a função de outras células imunes e as quimiocinas quando libertadas atraem mais leucócitos. Estes fatores criam assim um *loop* positivo entre inflamação e cancro que contribui para a promoção e progressão tumoral. O estado inflamatório é considerado uma característica facilitadora para o desenvolvimento do tumor por demonstrar estimular a proliferação e sobrevivência das células neoplásicas, induzir e sustentar a angiogénese e formação de metástase<sup>6,14,15</sup>.

### **1.1.1.9 Reprogramação metabólica**

As células normais obtêm a energia dos alimentos através de diversas reações químicas ou metabolismo<sup>16</sup>. O metabolismo envolve duas vias: a anabólica e a catabólica. A via anabólica sintetiza moléculas grandes a partir de moléculas pequenas e requer mais energia do que a que liberta. A via catabólica, por outro lado, degrada e transforma moléculas grandes em produtos mais pequenos e liberta energia. As células adquirem energia sob a forma de adenosina trifosfato ou ATP através do catabolismo de açúcares como a glucose (glicólise) e da fosforilação oxidativa. Em condições aeróbicas (na presença de oxigênio), as células quebram a glucose em piruvato no citoplasma (glicólise) e as moléculas de piruvato seguem para a mitocôndria onde são convertidas em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) através do ciclo de *Krebs* e da fosforilação oxidativa<sup>9</sup>. Com este processo a célula têm um rendimento de cerca

de 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucose. Em condições anaeróbicas, quando o oxigénio é limitado, estas células recorrem à fermentação láctica em que a glucose depois de ser degradada em piruvato (glicólise) é convertida em lactato. Nesta via a célula obtém apenas duas moléculas de ATP por cada molécula de glucose<sup>9,16</sup>.

As células cancerígenas ao contrário das normais, degradam a glucose através da glicólise na presença de oxigénio- glicólise aeróbia. Esta dependência de glicólise na presença de oxigénio em células cancerígenas é conhecida como o efeito de *Warburg*<sup>6,9,16,17</sup>. Este efeito confere benefícios que promovem o crescimento, sobrevivência e proliferação destas células a longo prazo. Uma vantagem é o metabolismo elevado de glicólise facilitar diversos processos anabólicos como a biossíntese de macromoléculas e organelos necessários para a proliferação celular. A secreção de lactato pela célula leva a uma diminuição do pH (acidificação) no microambiente que facilita a morte de células indesejadas no estroma e degradação da matriz extracelular. Uma vez que os níveis de oxigénio variam espacialmente e temporalmente nos tumores, a independência destes níveis para que ocorra o metabolismo glicolítico é outro benefício descrito<sup>6,17</sup>.

#### **1.1.1.10 Resistência à destruição pelo sistema imune**

O sistema imunitário deteta e defende o corpo contra infeções e doenças<sup>9</sup>. Os mecanismos de reconhecimento das estruturas que compõe os agentes invasivos podem ser realizados por duas vias distintas: pelo sistema imune inato ou pelo sistema imune adaptativo. O primeiro consiste numa resposta imediata à eliminação do invasor e é mediada por macrófagos e granulócitos. A segunda é uma linha de defesa que se desenvolve no decorrer da invasão e é mais especializada, isto é, gera anticorpos (linfócitos) que reconhecem antígenos (moléculas que são próprias do invasor). As células neoplásicas podem evitar a sua destruição pelo sistema imune de várias formas. A primeira estratégia adotada por estas células é parar de expressar os antígenos específicos do tumor (TSAs) sem comprometer a sua sobrevivência e proliferação. As células *natural killers* (NK) são células imunes inatas que respondem na presença de células infetadas ou transformadas, como é o caso das cancerígenas<sup>15</sup>. Estas células têm o recetor *natural killer group 2D* (NKG2D) que se liga a proteínas associadas ao stress induzidas pelas células cancerígenas. Outra estratégia adotada por estas células é a repressão destas proteínas ou a sua libertação para o meio extracelular de modo a bloquear este recetor. Estas células também libertam diversos fatores como FasL e TGF- $\beta$ . FasL é um ligante que

quando ligado ao seu recetor induz a ativação da via da apoptose<sup>9</sup>. Células tumorais adquirem resistência à morte celular por FasL, através da expressão de inibidores de caspases ou através da sua produção que leva à morte de linfócitos que contenham o seu recetor. O TGF- $\beta$  que não só têm um efeito imunossupressor sobre células imunes, como também pode induzir a apoptose de macrófagos e células dendríticas. Além destes mecanismos de desativação de células imunes, as células cancerígenas também recrutam células inflamatórias imunossupressoras como células T reguladoras, que podem inativar outros linfócitos T que entrem na massa tumoral<sup>6,9</sup>.

Em Janeiro deste ano, onze anos depois, os mesmos autores que descreveram as dez capacidades adquiridas pelas células neoplásicas, voltam a propor mais quatro: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes<sup>18</sup> (Figura 1.1).

### **1.1.1.11 Desbloqueio da plasticidade fenotípica**

A diferenciação celular é um processo pelo qual uma célula estaminal sofre transformações que a especializam para realizar determinadas funções num tecido<sup>9</sup>. Este processo constitui uma barreira para a tumorigénese por ser anti proliferativo. Assim, as células neoplásicas precisam de desbloquear a plasticidade fenotípica para evadirem o estado de diferenciação<sup>18</sup>. A plasticidade fenotípica define-se pela capacidade de uma célula de adquirir outros fenótipos<sup>19</sup>. Três mecanismos de plasticidade foram descritos por atuarem em diversas etapas da formação tumores. O primeiro mecanismo descrito é a desdiferenciação, neste processo as células diferenciadas revertem o seu fenótipo para o dos seus progenitores. Uma célula progenitora é uma célula descendente de uma célula estaminal que possui a capacidade de se diferenciar para formar um ou mais tipos de células. As células malignas com origem numa célula progenitora podem também bloquear a sua diferenciação, ficando num estado de diferenciação parcial. O último mecanismo descrito é a transdiferenciação, que ocorre quando as células malignas passam de um fenótipo de diferenciação para outro fenótipo totalmente diferente, adquirindo características que lhes permitem ser reconhecidas por outros tecidos<sup>9,18</sup>. A reprogramação do fenótipo requer alterações genéticas como a repressão de genes associados à diferenciação e ativação de outros genes associados à nova morfologia da célula. Modificações epigenéticas em domínios específicos da cromatina também são requeridas para o mesmo efeito<sup>18-20</sup>.

### **1.1.1.12 Reprogramação epigenética não mutacional**

A epigenética é um processo que afeta o fenótipo celular sem o envolvimento de alterações genéticas na sequência do genoma<sup>9</sup>. Atualmente sabe-se que alterações no epigenoma como mutações em genes que modulam a cromatina, contribuem para a tumorigênese, no entanto, o conceito de reprogramação epigenética não mutacional envolve mudanças epigenéticas que regulam a expressão dos genes sem envolver mutações. Estas modificações provêm de mudanças no microambiente tumoral que são benéficas para a tumorigênese, por selecionarem clones de células com maior aptidão para proliferarem e expandirem<sup>18,21</sup>. As alterações epigenéticas que podem ser observadas são padrões anormais de metilação de ADN e mudanças na cromatina que se refletem na desregulação da expressão génica. Como descrito no ponto 1.1.1.7. a metilação quando ocorre no promotor de um gene pode causar repressão da sua transcrição, a hipermetilação ou excesso de metilação em promotores de genes supressores de tumor têm sido observados<sup>9,22</sup>. A hipóxia é outro fator que induz hipermetilação de determinados genes.

Dentro de vários tumores a expressão e repressão de histonas observada em subpopulações de células cancerígenas é correlacionada com a capacidade de indução do tumor e prognóstico. Outras evidências baseadas na reprogramação epigenética das células que compõe o microambiente, como fibroblastos associados ao cancro, células imunes e células endoteliais também apoiam que os mecanismos celulares podem ser corrompidos independentemente da instabilidade e mutação do genoma<sup>18</sup>.

### **1.1.1.13 Microbiomas polimórficos**

Os microbiomas ou microbiotas são comunidades de microrganismos que se associam simbioticamente aos tecidos do corpo humano<sup>18,23</sup>. Novas evidências baseadas na variabilidade de microbiomas (microbiomas polimórficos) em humanos, sugerem que estes microrganismos, com principal foco em bactérias, podem conferir suscetibilidade a certos tipos de cancro<sup>18,24</sup>. As maiores concentrações de micróbios estão presentes ao longo do trato gastrointestinal e na pele. O microbioma intestinal é fundamental para a degradação e absorção de nutrientes para o organismo. Desequilíbrios na flora intestinal (disbiose) podem causar diversas doenças, entre elas a suscetibilidade ao cancro. A disbiose pode ocorrer por diversas razões, a principal razão é a ocupação de micróbios indesejados que são responsáveis por causar infeções intra-abdominais crónicas. Investigações clínicas e epidemiológicas identificaram diversas bactérias

presentes ao longo do trato digestivo como *Helicobacter pylori* e *Salmonella enterica* que provocam inflamação<sup>24,25</sup>. Como descrito anteriormente, inflamações crônicas são promotoras de tumor e contribuem para a instabilidade e mutação do genoma. Os microbiomas polimórficos também modulam o sistema imune adaptativo e inato através de bactérias que produzem fatores como quimiocinas e citocinas, que causam danos às células imunes. Embora o papel do microbioma ao longo do sistema digestivo seja amplamente estudado, novas observações em diferentes tipos de tumor verificam que estes tumores apresentam assinaturas microbianas específicas, facilitadoras de carcinogênese<sup>18,26</sup>.

#### **1.1.1.14 Células senescentes**

Como mencionado no tópico 1.1.1.4 células senescentes permanecem metabolicamente ativas, mas perdem irreversivelmente a capacidade de retornar ao ciclo celular<sup>9,18</sup>. A senescência celular é iniciada como resposta a insultos celulares prolongados tais como danos no ADN irreparáveis, stress oxidativo, alterações na cromatina, disfunção mitocondrial e encurtamento de telômeros<sup>18,27,28</sup>. Este mecanismo é conhecido por prevenir a tumorigênese, no entanto diversos estudos demonstram que a senescência estimula o desenvolvimento e progressão maligna. As células senescentes comunicam com o microambiente e os seus constituintes. Um mecanismo de comunicação descrito envolve o complexo *senescence-associated secretor phenotype* (SASP). A SASP é ativada quando as células entram em senescência e promove a libertação de diversas proteínas, entre elas quimiocinas, citocinas e proteases<sup>18,29</sup>. Acredita-se que a ativação deste complexo através da libertação destas moléculas sinalizadoras e proteases possa promover a tumorigênese por induzir a transição epitelial-mesenquimal, aumentar a vascularização do tumor, facilitar a inflamação e suprimir a diferenciação celular<sup>27</sup>. Em suma, estas células podem afetar a homeostase do tecido e contribuir para a transformação de células neoplásicas por adquirirem alterações epigenéticas que afetam o seu fenótipo e função<sup>30</sup>.



**Figura 1.1- Hallmarks do cancro. Capacidades adquiridas pelas células durante a transformação de células normais em malignas.** Descrição dos seis Hallmarks em 2000: (1) sustentação da sinalização proliferativa, (2) inibição de genes supressores de tumores, (3) resistência à morte celular, (4) imortalidade replicativa, (5) indução da angiogénese e (6) invasão e metástase. Em 2011, os mesmos autores adicionam quatro Hallmarks do cancro: (7) instabilidade e mutação do genoma, (8) inflamação promotora de tumor, (9) reprogramação metabólica e (10) resistência à destruição pelo sistema imune. À lista supramencionada, passado onze anos foram descritas mais quatro capacidades adquiridas: (11) desbloqueio da capacidade fenotípica, (12) reprogramação epigenética não mutacional, (13) microbiomas polimórficos e (14) células senescentes. *Adaptado de Hanahan D. and Weisenberg R., Cell 2000, Hanahan D. and Weisenberg R., Cell 2011 e Hanahan D., AACR 2022.*

Estes *hallmarks* representam a biologia básica de um tumor que é fundamental para o entendimento do processo tumorigénico.

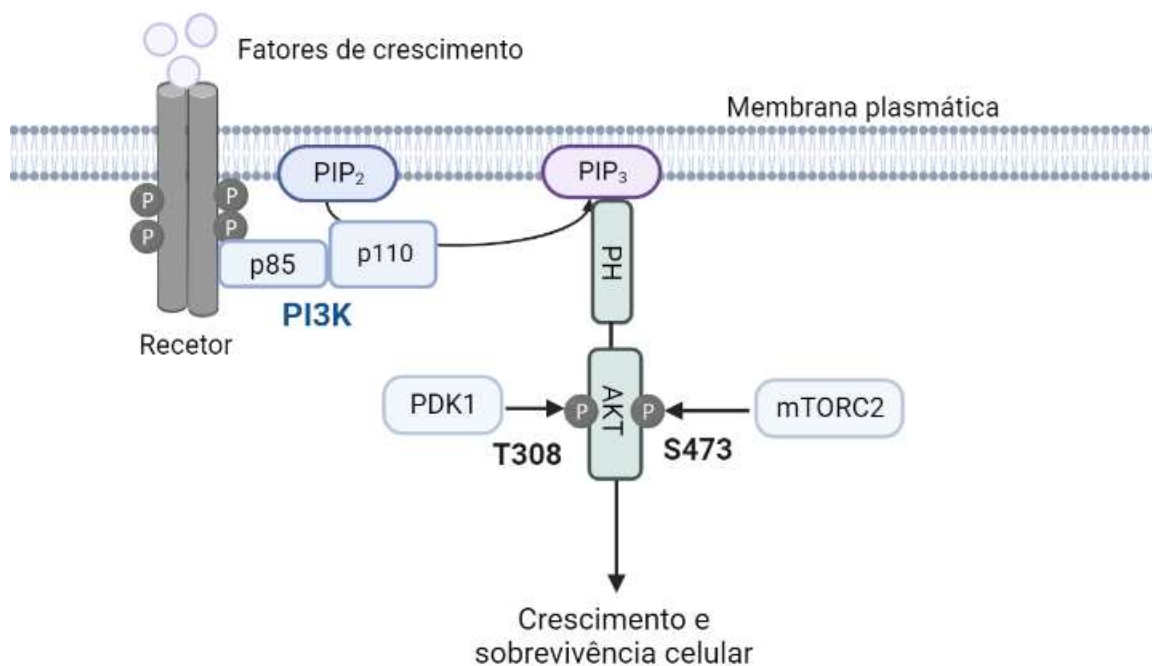
### 1.1.2 Vias de sinalização

Uma via de sinalização é definida por uma série de reações químicas sobre o qual um conjunto de moléculas trabalha em conjunto para controlar uma função celular. A via é ativada por moléculas sinalizadoras como fatores de crescimento ou hormonas provenientes do ambiente celular que se ligam ao recetor da célula, posteriormente a molécula seguinte intracelular recebe o sinal e transmite-o a próxima molécula. Este processo é repetido ao longo de toda a via até que a célula complete a sua função<sup>9</sup>.

As alterações genéticas e epigenéticas no cancro levam á ativação anormal de vias de sinalização que controlam o crescimento, divisão celular, sobrevivência, morte celular e migração<sup>31</sup>. Uma das vias alteradas em diversos cancros humanos é a via PI3K/Akt/mTOR que esta envolvida na regulação da sobrevivência, proliferação, crescimento, metabolismo, angiogénese e metástase<sup>32</sup>.

### 1.1.2.1 PI3K/AKT

O fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) é um heterodímero composto por uma subunidade catalítica (p110) e uma reguladora (p85). Este componente é ativado por um recetor de proteína tirosina quinase (RPTK) (que se torna ativo por autofosforilação de resíduos de tirosina) ou por um recetor acoplado à proteína G (GPCR). Quando PI3K está ativo, converte por meio de fosforilação fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana celular<sup>32,33</sup> (Figura 1.2). Seguidamente o PIP3 recruta um subconjunto de proteínas de sinalização com domínios de homologia de *pleckstrin* (PH) para a membrana como a proteína quinase B (PKB) também conhecido como AKT e a cinase 3'-fosfoinositideo dependente da cinase 1 (PDK1) (Figura 1.2). AKT é ativado através de dois resíduos conservados, a treonina 308 (T308) e a serina 473 (S473). A fosforilação da T308 é feita por PDK1, que acredita-se estar constitutivamente ativo na via. Por outro lado, a serina 473 é fosforilada pelo alvo de rapamicina em mamíferos complexo 2 (mTORC2)<sup>32,33</sup>. A ativação de AKT pode ser bloqueada pela atividade do supressor de tumor *tensin homologue deleted on chromosome 10* (PTEN). Esta fosfatase desfosforila PIP3 em PIP2 (Figura 1.2). Quando ativo, AKT, promove o crescimento e sobrevivência celular através da fosforilação de várias proteínas citoplasmáticas<sup>32</sup>.



**Figura 1.2- Representação da via a montante de PI3K/Akt.** Os fatores de crescimento ligam-se ao receptor que se autofosforila nos resíduos de tirosina. Na membrana plasmática, PI3K composto pela subunidade catalítica (p110) e pela subunidade reguladora (p85) liga-se ao receptor e torna-se ativo. A ativação deste heterodímero promove a conversão de PIP<sub>2</sub> em PIP<sub>3</sub>. PIP<sub>3</sub> por sua vez recruta um subconjunto de proteínas com domínio de homologia de pleckstina (PH) para a membrana. Neste subconjunto está incluído PDK1 e Akt. A ativação de Akt depende da fosforilação de mTORC2 na serina 473 e de PDK1 na treonina 308. Akt ativo, medeia a ativação e inibição de vários alvos que resultam entre muitos processos no crescimento e sobrevivência celular. *Adaptado de Vara et al., 2004*

### 1.1.2.1.1 Mammalian target of rapamycin (mTOR)

O principal fator a jusante de AKT é a cinase serina/treonina *mammalian target of rapamycin* (mTOR). mTOR pertence a família das cinases relacionada ao fosfoinosítídeo 3-cinase (PI3K) e foi descoberto na década de 1970 como alvo de um composto com propriedades antifúngicas, imunossupressoras e antitumorais, denominado rapamicina<sup>34</sup>. A rapamicina é usada clinicamente para imunossupressão e para tratar diversas doenças. Análogos à rapamicina denominados rapálogos também foram desenvolvidos para terapia contra o cancro<sup>35,36</sup>.

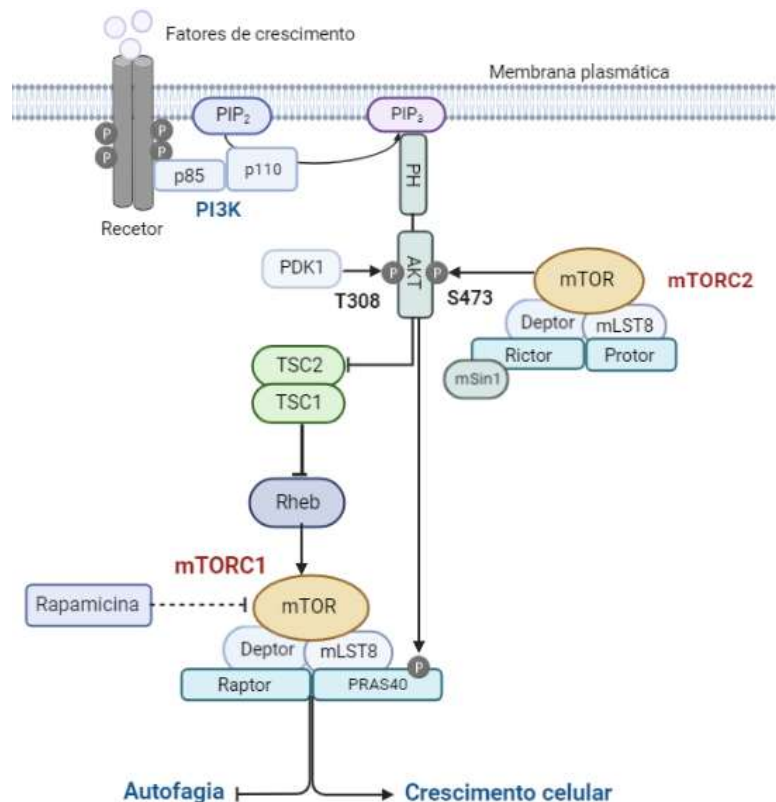
mTOR deteta indiretamente os níveis de nutrientes e a presença de fatores de crescimento cruciais para manter o metabolismo e crescimento das células<sup>32</sup>. A hiperativação da via de mTOR está associada ao processo de envelhecimento, diabetes e progressão do cancro<sup>34,35</sup>.

mTOR atua na subunidade catalítica de dois complexos de proteínas cinases distintas conhecidos como mTOR complexo 1 (mTORC1) e complexo 2 (mTORC2). mTORC1 tem cinco componentes: mTOR; a proteína reguladora associada a mTOR (Raptor); *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8); substrato de AKT rico em prolina de 40kDa (PRAS40) e a proteína de interação mTOR contendo o domínio DEP (Deptor). Raptor é uma proteína reguladora da atividade catalítica de mTORC1 e ajuda a recrutar os seus substratos. PRAS40 e Deptor inibem a atividade de mTORC1 por mecanismos que não são conhecidos. A função de mLST8 atualmente é desconhecida, mas acredita-se que não é necessária para a função desta proteína (mTORC1)<sup>35,36</sup>. Como descrito no parágrafo anterior, a rapamicina em mamíferos têm como o alvo direto o mTOR. O complexo rapamicina-FKB1P2 liga-se ao domínio FRB de mTORC1 e inibe-o diretamente, quando a célula se encontra em jejum<sup>34,36</sup>(Figura 1.3). Por outro lado, o mTORC2 é conhecido por ser insensível aos tratamentos com rapamicina. Este complexo tal como o complexo 1 possui mLST8, Deptor, mTOR e contem a proteínas Rictor (insensível à rapamicina), proteína 1 de interação com MAPK ativada por stress em mamíferos (mSin1; também conhecido como MAPKAP1) e uma proteína observada com Rictor (Protor) em vez de Raptor e PRAS40. Existem algumas evidências de que Rictor e mSin1 estabilizam-se um ao outro. Rictor e Protor interagem, mas a função biológica ainda não é clara. Deptor têm a mesma regulação negativa semelhante ao complexo 1 de mTOR e mLST8 é fundamental para a sua estabilidade e função<sup>36,37</sup>. O mTORC2 como mencionado no ponto anterior, ativa AKT através da fosforilação na serina 473 (Figura 1.2 e 1.3), controlando a proliferação e sobrevivência celular.

O mTORC1 regula o crescimento e o metabolismo celular por responder aos níveis de nutrientes, fatores de crescimento, energia e stress. Um dos sensores mais importantes envolvidos na regulação da atividade de mTORC1 é o complexo de esclerose tuberosa (TSC), um heterodímero que contem a subunidade 1 (TSC1) e 2 (TSC2). TSC1/2 funciona como uma proteína ativadora de GTPase, homólogo de Ras enriquecido no cérebro (Rheb). Rheb ligado à guanosina trifosfato (GTP) interage diretamente com mTORC1 para estimular a sua atividade. O complexo TSC1/2 regula negativamente a sinalização de mTORC1 pela conversão de Rheb ao estado inativo, ligado à guanosina difosfato (GDP). Na presença de fatores de crescimento a via de PI3K/AKT torna-se ativa e AKT fosforila TSC2, levando à inativação de TSC1/2 e consequente ativação do complexo 1 de mTOR (Figura 1.3). AKT pode também ativar este complexo de maneira independente de TSC1/2 pela fosforilação de PRAS40 (Figura 1.3). mTORC1 ativo promove a síntese de proteínas, lípidos (essenciais para construir a membrana

plasmática e membranas de organelos intracelulares) e ácidos nucleicos (para produzir ácido ribonucleico-ARN e ADN). A biossíntese de macromoléculas é crucial para o crescimento celular<sup>34,35</sup>. mTORC1 também promove o crescimento celular suprimindo o catabolismo de proteínas como o processo autofágico (Figura 1.3)<sup>34,35</sup>.

A via de PI3K/Akt/mTOR é ativada numa grande percentagem de cancros humanos através de vários mecanismos como a perda do supressor de tumor PTEN, ativação de recetores de fatores de crescimento, como o *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) e mutações em PI3K<sup>38</sup>.

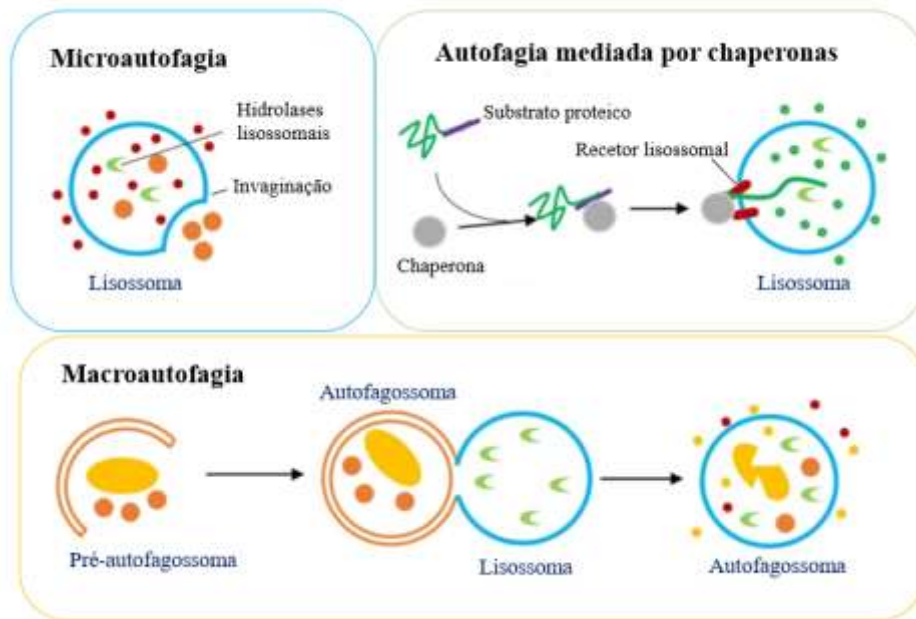


**Figura 1.3 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.** Os fatores de crescimento ligam-se ao recetor que se autofosforila nos resíduos de tirosina. Na membrana plasmática, PI3K composto pela subunidade catalítica (p110) e pela subunidade reguladora (p85) liga-se ao recetor e torna-se ativo. A ativação deste heterodímero promove a conversão de PIP<sub>2</sub> em PIP<sub>3</sub>. PIP<sub>3</sub> por sua vez recruta um subconjunto de proteínas com domínio de homologia de pleckstina (PH) para a membrana. Neste subconjunto está incluído PDK1 e Akt. A ativação de Akt depende da fosforilação de mTORC2 que é composto por: mTOR; Deptor; mLST8; Rictor; mSin1 e Protor na Serina de 473 e de PDK1 na treonina 308. Akt ativo, medeia a ativação do complexo mTORC1 que contém: mTOR; Deptor; mLST8; raptor e PRAS40. Esta ativação pode ocorrer de duas maneiras: 1) inibição de TSC2 que por sua vez promove a ligação de Rheb à GTP (estado ativo) que se vai ligar a mTORC1 diretamente ou 2) fosforilação de PRAS40 que deixa de ser um regulador negativo de mTORC1. A sinalização deste complexo aciona o crescimento celular e impede outras vias catabólicas, como a autofagia. Quando as células se encontram em jejum (sem fatores de crescimento) a rapamicina inibe o mTORC1. mTORC2 é insensível aos tratamentos com este composto anticancerígeno. *Adaptado de Vara et al., 2004 e Saxton et al., 2017*

## 1.2 Autofagia

A autofagia é um processo catabólico intracelular que responde a condições de stress metabólico como privação de nutrientes, baixos níveis de energia e hipóxia.<sup>39-41</sup> Este mecanismo consiste na obtenção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) e aminoácidos através da degradação de organelos defeituosos, tais como: mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomas e pode também incidir sobre proteínas com má conformação ou agregação<sup>40</sup>. Fisiologicamente, o processo autofágico funciona como um mecanismo protetor nas células, por manter a homeostase de nutrientes e energia quando estas se encontram em jejum e por degradar componentes danificados e organismos invasores<sup>42</sup>.

A autofagia pode ser de três tipos: autofagia mediada por chaperonas (CMA), microautofagia e macroautofagia que diferem quanto às suas funções e modo de entrega dos componentes citoplasmáticos aos lisossomas<sup>39,43</sup> (Figura 1.4). A autofagia mediada por chaperonas consiste no reconhecimento e direcionamento de proteínas solúveis por parte de um complexo de chaperona. Uma vez que as proteínas são identificadas, em conjunto com o complexo vão ser reconhecidas por um recetor lisossomal que auxilia no desdobramento destas proteínas para degradação no interior do lisossoma<sup>40,44</sup> (Figura 1.4). A microautofagia é um processo não seletivo que envolve uma invaginação interna da membrana dos lisossomas que captura e efetua a fagocitose direta dos componentes citoplasmáticos<sup>44</sup> (Figura 1.4). No caso da macroautofagia, os constituintes são sequestrados para um autofagossoma, uma vesícula de membrana dupla que posteriormente funde-se com o lisossoma. O resultado desta fusão dá origem a um autolisossoma, onde ocorre a degradação dos componentes citoplasmáticos (Figura 1.4). Os constituintes resultantes deste processo catabólico (aminoácidos e pequenas moléculas) são entregues ao citoplasma para produção de energia<sup>39-42,44,45</sup>. Esta reciclagem celular desempenha desta forma um papel importante na sobrevivência e manutenção das células. A sua desregulação está associada ao cancro, infeções e entre outras doenças neurodegenerativas, metabólicas e cardiovasculares<sup>39-42,45</sup>. Este projeto irá focar-se na macroautofagia (referida como autofagia) como o principal mecanismo catabólico utilizado pelas células eucarióticas.



**Figura 1.4 Representação dos três tipos de autofagia.** A) Microautofagia: Degradação dos componentes por meio de uma fagocitose mediada por hidrolases lisossomais no interior do lisossoma. B) Autofagia mediada por chaperonas: marcação do substrato proteico através de chaperonas e reconhecimento deste complexo pelo recetor lisossomal, desdobração e deterioração da proteína no lisossoma. C) Macroautofagia: Formação de um pré-autofagossoma, fusão do autofagossoma com o lisossoma, constituição do autolisossoma, degradação dos componentes autofágicos. *Adaptado de Chen et al., 2020*

### 1.2.1 Processo autofágico

Durante a autofagia os componentes celulares são sequestrados em vesículas de membrana dupla, os autofagossomas que se fundem com os lisossomas para degradar os substratos autofágicos. O processo autofágico divide-se assim em várias etapas: iniciação, nucleação, maturação e fusão<sup>40-42</sup>.

A autofagia inicia-se através da fosforilação e ativação do complexo de ULK1, que é constituído por Atg13, Atg 101 e FIP200. Este complexo é necessário para a formação do pré-autofagossoma, uma membrana formada a partir do retículo endoplasmático. Nesta etapa, ULK1 fosforila Beclin-1 na serina 14 e regula a localização de VPS34 para o pré-autofagossoma. Vps34 é uma cinase lipídica- fosfatidilinositol 3-cinase, que utiliza fosfatidilinositol (PI) como substrato para formar trifosfato de fosfatidilinositol (PI3P) e esta está acoplada no pré-autofagossoma a Vps15, uma proteína cinase serina/treonina. Deste modo, em conjunto com Beclin-1, formam um complexo que aumenta a sua atividade catalítica e consequentemente aumentam os níveis de PI3P, que são fundamentais para a nucleação do pré-

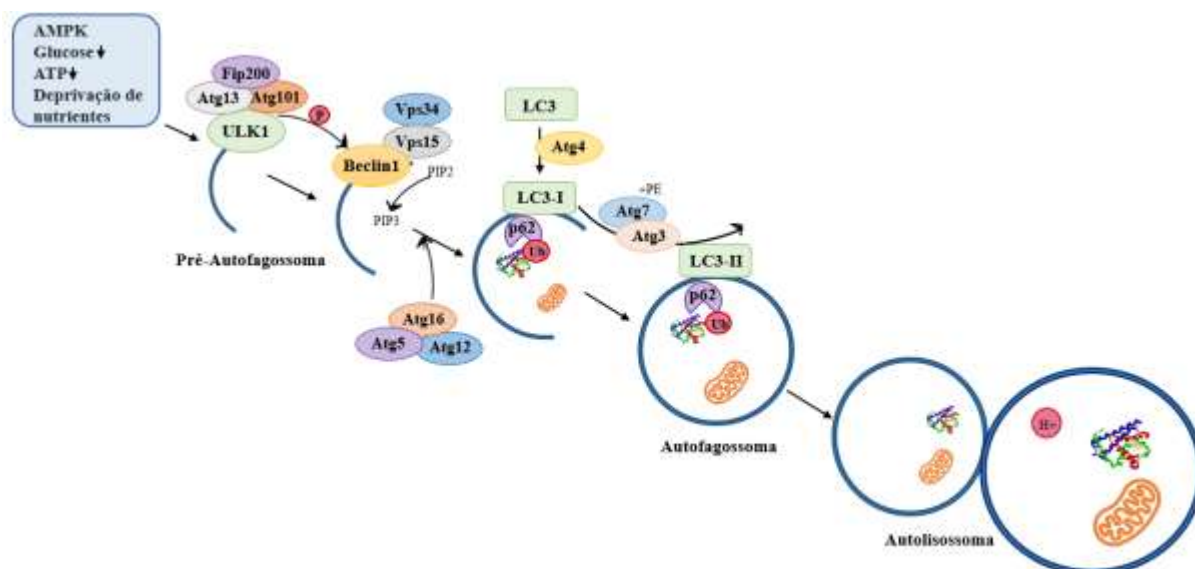
autofagossoma e para o recrutamento de proteínas Atg (*Autophagy related proteins*). Nesta etapa, a conversão de PIP2 em PIP3 também é essencial para a ativação de cinases dependentes de PI3P (Figura 1.5)<sup>40,42,45-48</sup>.

A fase seguinte consiste na nucleação do pré-autofagossoma. Neste passo, são necessários dois sistemas de conjugação *ubiquitina-like*. No primeiro sistema ocorre a conjugação de Atg12 a Atg5 por meio de uma ligação covalente à lisina 130. Este complexo liga-se posteriormente a Atg16L através da região N-terminal, formando um complexo multimérico que se associa ao pré-autofagossoma e induz a sua curvatura. O segundo sistema envolve o processamento da proteína Map1-LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), ou comumente conhecida como LC3 (proteína homóloga à Atg8 em leveduras). Esta proteína citosólica é clivada proteoliticamente por Atg4, uma protease de cisteína, para gerar LC3-I (Figura 1.5)<sup>39-42,49,50</sup>.

Antes de ocorrer a fusão das extremidades do autofagossoma, ocorre a seleção e entrega dos substratos. A molécula recetora que aumenta a seletividade e facilita o engolfe de determinados substratos para degradação no processo autofágico é p62, um substrato seletivo da autofagia, que se liga diretamente a poli ou mono-ubiquitina através do seu domínio associado à ubiquitina (UBA). Este sequestra os substratos ubiquitinados e entrega-os no autofagossoma pela ligação a LC3, através da sua região LIR (região de interação a LC3)<sup>39-41,50,51</sup>.

Após a marcação e entrega de substratos na estrutura autofágica, ocorre o processamento de LC3-I em LC3-II. O Atg7 ligado a Atg3 conjuga-se com fosfatidiletanolamina (PE), através de uma reação de ubiquitinação enzimática para formar LC3-II. O LC3-II é integrado nas superfícies interna e externa do autofagossoma, onde desempenha não só um papel importante na seleção dos substratos para degradação, como também na fusão das extremidades do autofagossoma (Figura 1.5)<sup>40,42,45,49,50</sup>.

A fusão autofagossoma-lisossoma ocorre com o auxílio de diversas proteínas entre elas: Rab7, *Soluble NSF attachment protein receptors* (SNAREs) e *Vacuolar Protein Sorting* (VPS) de classe C. Durante a fusão, a membrana interna do autofagossoma juntamente com a carga autofágica são degradadas quando expostas às hidrolases e ao lúmen acidificado do lisossoma. Os componentes da degradação são transportados de volta para o citoplasma onde serão utilizados para produção de energia e síntese de novas proteínas em resposta à privação de nutrientes e hipóxia (Figura 1.5)<sup>40,52-55</sup>.



**Figura 1.5- Processo autofágico.** Em situações de privação de glicose, nutrientes e baixos níveis de ATP, o sensor energético AMPK fica ativo e induz a autofagia pela fosforilação de ULK1 que juntamente com o seu complexo (Atg13, FIP200, Atg101), ajudam na formação do pré-autofagossoma. ULK1 ativo, fosforila Beclin-1 e permite a ligação da mesma com VPS15 e VPS34. Este complexo converte PIP2 em PIP3 que são fundamentais para o recrutamento de proteínas Atg. No próximo passo atuam dois sistemas de conjugação *ubiquitina-like*. Atg12-Atg5-Atg16 induz a curvatura do pré-autofagossoma e promove o processamento de LC3 em LC3-I através da clivagem proteolítica de Atg4. Posteriormente ocorre a seleção dos substratos por p62 através do domínio UBA e entrega no autofagossoma pela região de ligação a LC3 (LIR). LC3-I é processado em LC3-II por conjugação com PE e por meio de Atg 3 e Atg7. A última etapa consiste na fusão do autofagossoma com o lisossoma e degradação dos substratos autofágicos através de hidrolases e lúmen acidificado do lisossoma. Adaptado de Hansen M, Rubinsztein DC, Walker D., 2018.

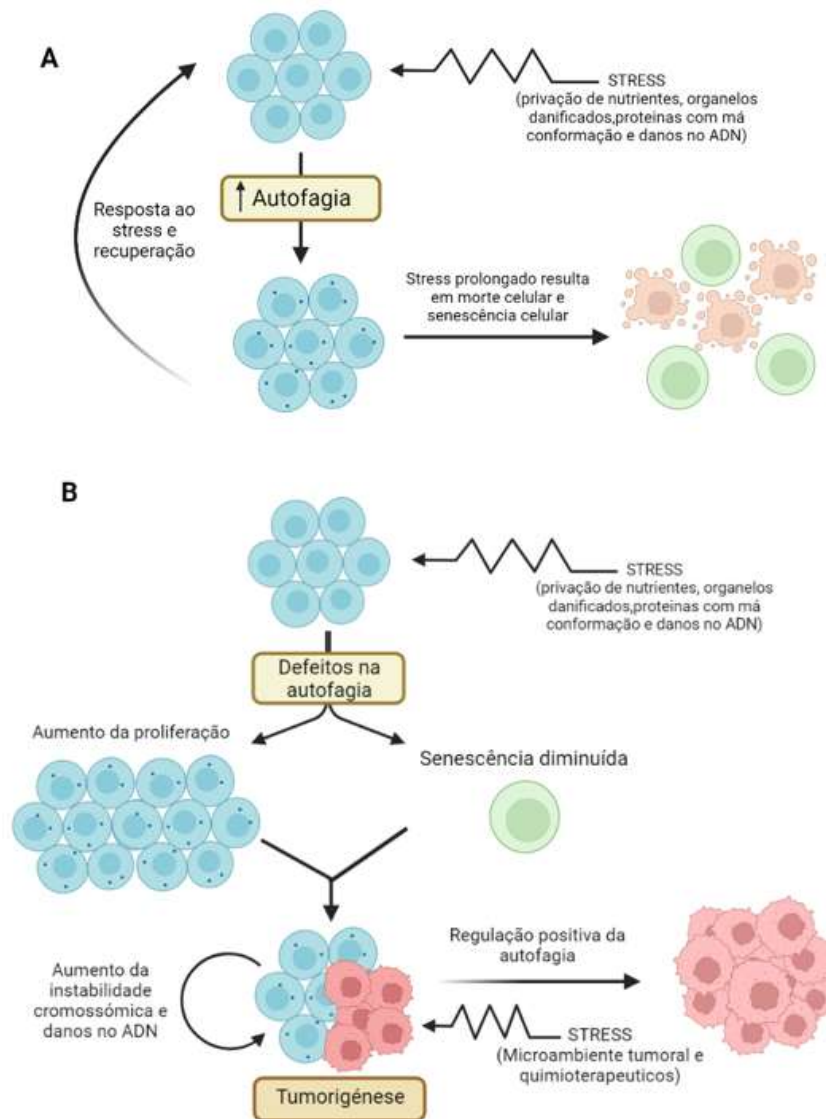
## 1.3 Autofagia em cancro

### 1.3.1 Autofagia na supressão tumoral

Nas fases iniciais do desenvolvimento do tumor a autofagia demonstra ser anti-tumoral. O papel da autofagia na supressão tumoral pode ser explicado em primeiro lugar pela capacidade de prevenir a instabilidade genómica. A perda de genes da autofagia promove danos no ADN, amplificação de genes e alterações cromossómicas (aneuploidias). Vários estudos em modelos de rato demonstraram a importância desses genes como supressores da tumorigénese<sup>48,56,57</sup>. Em 1999, Liang *et al* estabeleceram a primeira associação entre autofagia e o cancro. Estes autores comprovaram que a Beclin-1, um componente importante na nucleação do autofagossoma, era um candidato a supressor de tumor<sup>56-58</sup>. A perda monoalélica deste supressor encontrada em vários tipos de cancros, foi associada a baixos níveis de autofagia e

correlacionada com uma maior propensão à tumorigênese. Outros genes relacionados com a autofagia (Atgs) foram também demonstrados como tendo um efeito supressor de tumor<sup>57,59</sup>.

A reciclagem de constituintes danificados na célula também garante a manutenção do genoma por diminuir a acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 1.6)<sup>48,56</sup>. Um segundo processo pelo qual a autofagia tem um efeito anti-tumoral é através da sua função na manutenção e entrada das células em senescência. A perda da autofagia leva a que as células proliferem em condições de dano no ADN e em condições em que os sinais do microambiente tumoral são inapropriados (Figura 1.6)<sup>48,56</sup>.



**Figura 1.6 Possíveis mecanismos pelos quais a autofagia prejudicada promove a tumorigênese.** (A) Em tecidos normais, a autofagia funciona para promover a sobrevivência das células, respondendo a diversos insultos celulares tais como: privação de nutrientes; danos no ADN; privação de nutrientes; organelos danificados e proteínas com má conformação. Quando estes fatores são reparáveis a célula induz a autofagia e recupera do stress. Em condições em que o stress é prolongado e não é reparável a célula ativa outros mecanismos como senescência celular e morte celular não apóptica. Em ambas as situações, a proliferação é evitada. (B) Em tecidos em que a autofagia é comprometida, a célula perde a capacidade de responder aos mesmos insultos e vários mecanismos são propostos para contribuir para a tumorigênese. (1) A autofagia tem um papel importante na senescência e morte celular não apóptica, pelo que sua perda pode resultar na diminuição destes mecanismos supressores de tumor. (2) A diminuição da autofagia facilita a proliferação celular através da acumulação de danos no ADN e organelos defeituosos que aumentam as espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente aumentam a instabilidade genômica. Contrariamente, a regulação positiva deste processo em tumores estabelecidos pode promover a sobrevivência de células tumorais em resposta ao stress metabólico e microambiente tumoral. As células normais estão representadas a azul; os pontos azuis caracterizam a acumulação de erros; as células senescentes correspondem às células verdes; as laranja espelham a morte celular não apóptica e por fim as vermelhas significam as células cancerígenas. Adaptado de Wang *et al.*, 2010.

### 1.3.2 Autofagia promotora de tumor

Contrariamente, em estádios finais da carcinogénese, quando o tumor é estabelecido, a via autofágica tem a função pro-tumoral por proporcionar a sobrevivência das células cancerígenas<sup>48,56,57,60,61</sup>.

O processo autofágico responde ao alto requerimento metabólico e energético de tumores em proliferação através da reciclagem dos constituintes ubiquitinados para produzir substratos metabólicos (Figura 1.7). As células cancerígenas no interior do tumor sólido sofrem privação de nutrientes e hipóxia consequente do microambiente tumoral<sup>56,59</sup>. A autofagia pode ser ativada para ajudar a superar estas condições até que a angiogénese seja iniciada.

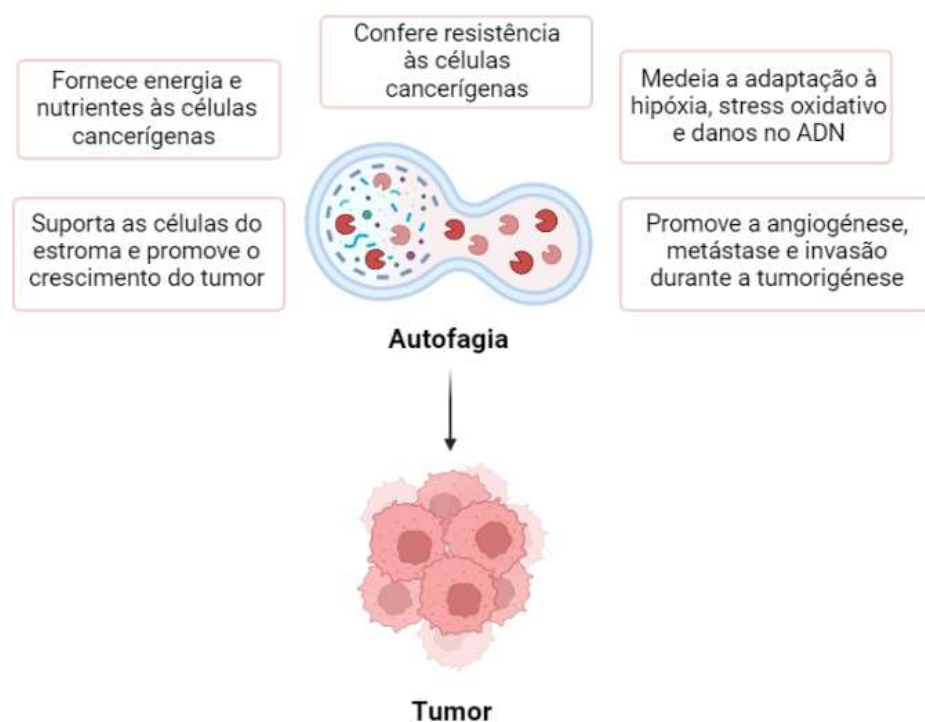
A reprogramação metabólica é uma das características adquiridas pelas células neoplásicas. O aumento da glicose aeróbia conhecido como efeito de *Warburg* é auxiliado pelo processo autofágico através do fornecimento de energia por meio da degradação de moléculas e organelos. A macroautofagia também foi recentemente implicada no favorecimento da glicólise pelas células malignas. Embora o mecanismo pelo qual a autofagia regula a glicólise atualmente seja desconhecido, foi proposto que este efeito poderia ser mediado pela remoção de mitocôndrias, via autofágica, de modo a forçar a dependência energética pela via da glicose<sup>56,62</sup>.

O mecanismo autofágico também suporta as células do estroma e promove o crescimento do tumor (Figura 1.7). Durante a carcinogénese as células malignas induzem a produção excessiva de espécies reativas de oxigénio que, por sua vez ativam mecanismos de resposta ao stress oxidativo e autofagia nas células estromais. Estes mecanismos ativos ajudam na defesa antioxidante e protegem as células cancerígenas adjacentes do dano e morte celular. A reciclagem de metabolitos ricos em energia provenientes do estroma suportam a biogénese e o crescimento das células cancerígenas<sup>60,63</sup>.

A autofagia promove a angiogénese, metástase e invasão durante a tumorigénese (Figura 1.7). Demonstrou-se que o Atg5 modula a angiogénese em células endoteliais e que o processo autofágico também pode promover a angiogénese induzindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)<sup>60,61</sup>. *Tuloup-Minguez et al.*, em 2011 também descreveram que a via autofágica promove a sobrevivência das células metastáticas durante o destacamento da matriz extracelular (ECM) e que os componentes desta matriz eram capazes de regular a atividade

autofágica em células HeLa<sup>60,64</sup>. *Galavotti et al* em 2013 também propuseram que a inibição da autofagia ou perda da expressão de p62 reduziam a taxa de migração e invasão conferindo defeitos metabólicos em células estaminais de glioblastoma. Este estudo correlacionou deste modo a autofagia com a promoção da migração e invasão<sup>60,65</sup>.

Por fim, o processo autofágico também promove resistência a compostos anticancerígenos (Figura 1.7)<sup>56,57,59,60,63</sup>. A resistência à quimioterapia associada à autofagia é um dos desafios para o tratamento do cancro e será detalhado no próximo ponto.



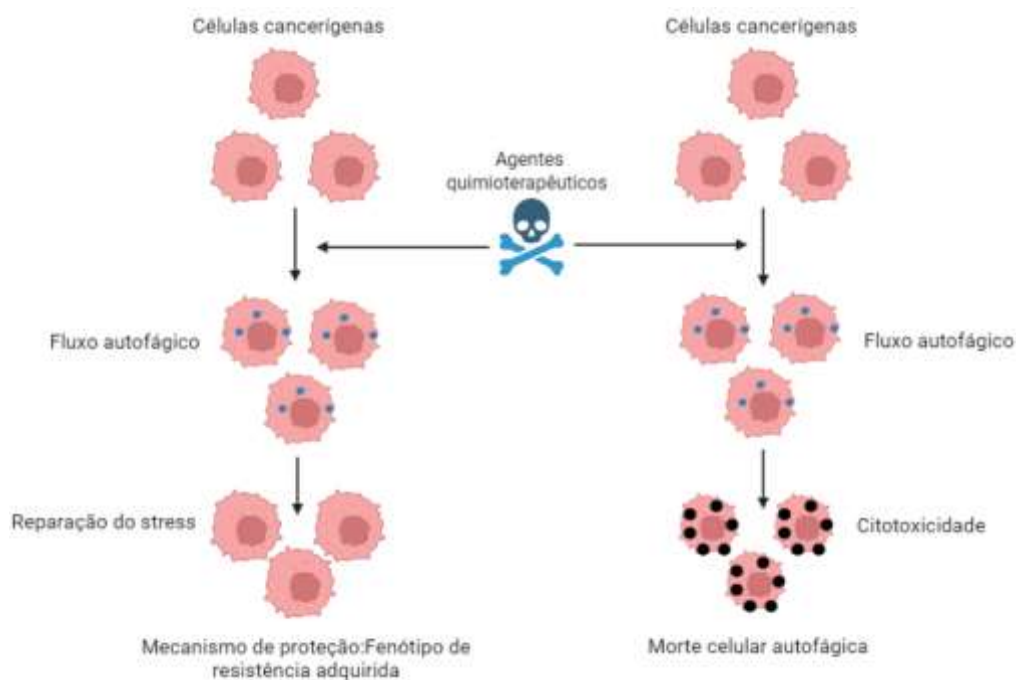
**Figura 1.7 Papel da autofagia na tumorigênese.** A autofagia contribui para a tumorigênese de várias formas (1) Suporta as células do estroma e promove o crescimento do tumor; (2) Fornece energia e nutrientes às células cancerígenas; (3) Confere resistência às células neoplásicas; (4) Medeia a adaptação à hipóxia, stress oxidativo e danos no ADN e (5) Promove a tumorigênese, metástase e invasão durante a carcinogênese. Adaptado de *Kocaturk et al., 2019*.

### 1.3.3 Autofagia na terapia contra o cancro

Uma vez que a autofagia tem um papel duplo na tumorigênese, a indução desta via pode ter um papel pró-sobrevivência ou pró-morte, que contribuem respetivamente tanto para a resistência dos compostos anticancerígenos como para a eficácia dos tratamentos. Uma vez que

a autofagia tem um papel duplo no tumor, duas estratégias terapêuticas são viáveis <sup>60,63</sup>. A primeira abordagem terapêutica visa sensibilizar as células cancerígenas para a quimioterapia/radioterapia através da inibição do papel citoprotetor da autofagia. A segunda estratégia requer a indução da morte celular via autofágica em pacientes resistentes à apoptose <sup>60,66</sup>.

O principal objetivo da quimioterapia é eliminar as células cancerígenas de modo a minimizar os danos nos tecidos normais. As células podem ser eliminadas por três processos: apoptose, morte celular autofágica e necrose. A necrose diferencia-se dos dois primeiros tipos de morte celular por estar associada a inflamação e causar grandes danos nos tecidos normais. Por este motivo, a apoptose e a morte celular autofágica têm sido utilizadas na terapia do cancro. A apoptose caracteriza-se pela degradação do ADN, condensação da cromatina, colapso do citoesqueleto, encolhimento da célula, inchaço e formação de bolhas na membrana celular. A célula é toda fragmentada e posteriormente fagocitada por células do sistema imune<sup>9,63</sup>. A morte celular autofágica, por outro lado mantém o núcleo e o citoesqueleto intacto sem degradação do ADN e os autofagossomas são constitutivamente gerados para a degradação de substâncias e organelos danificados durante o processo<sup>63,67</sup>. A acumulação de autofagossomas pode contribuir para a toxicidade celular das células transformadas e este efeito tóxico tem sido explorado para fins terapêuticos<sup>56</sup>. Recentemente a autofagia tem sido demonstrada como um mecanismo alternativo de morte celular (morte celular autofágica), quando os danos são irreversíveis e não suportáveis à célula. Em terapia este mecanismo é uma alternativa as células cancerígenas que adquirem resistência à apoptose <sup>63,66,67</sup>(Figura 1.8).



**Figura 1. 8 Duplo papel da autofagia na terapêutica do cancro.** A autofagia é ativada como um mecanismo protetor, conferindo um fenótipo de resistência adquirida em algumas células cancerígenas durante a quimioterapia. Por outro lado, o processo autofágico também pode funcionar como um agente de morte pela indução de morte celular autofágica. A morte celular autofágica consiste na acumulação de autofagossomas que são constitutivamente gerados, tal como erros que não são reparáveis. Adaptado de *Sui et al., 2013*.

### 1.3.3.1 Autofagia como um mecanismo de sobrevivência e resistência contra as terapêuticas

A autofagia promove a resistência à quimioterapia, radiação e terapias direcionadas comprometendo a eficácia dos tratamentos anticancerígenos. A regulação negativa da autofagia é uma maneira eficaz de aumentar o efeito citotóxico dos diferentes protocolos na terapêutica do cancro<sup>56</sup>. Atualmente as moléculas de inibição da autofagia baseiam-se em repressores que atuam nas diversas etapas do fluxo, como repressores da autofagossomas, da acidificação lisossomal e fusão autofagossoma-lisossoma. Outra estratégia, visa o silenciamento por *knockdown* da expressão de proteínas relacionadas à autofagia através de *small interfering RNA* (siRNA)<sup>60,66</sup>.

A radiação ionizante é eficaz no tratamento de vários tipos de cancro e esta tem sido verificada como indutora da autofagia<sup>68</sup>.

*Ko et al* em 2013 demonstraram que a autofagia induzida por radiação tinha uma função citoprotetora e que a inibição deste processo aumentava a eficácia do tratamento da radiação. A depleção dos genes ATG5 e Beclin-1 (importantes na fase da nucleação do autofagossoma) aumentaram a sensibilidade das linhas celulares de cancro humano à radiação<sup>68,69</sup>. No ano anterior, *Cerniglia et al* também demonstraram que o inibidor de PI3K e mTOR (NVP-BEZ235) induzia a autofagia após a radiação e que este mecanismo conferia resistência às células<sup>38</sup>. Posteriormente verificaram que a utilização de NVP-BEZ235 combinado com a cloroquina, um repressor da autofagia que inibe o fluxo por meio da alteração do pH lisossomal, aumentavam a radio sensibilização das células neoplásicas promovendo mais morte celular e menos sobrevivência<sup>38,69</sup>.

O mecanismo autofágico confere resistência aos compostos administrados em quimioterapia, conferindo sobrevivência às células cancerígenas<sup>66</sup>. A inibição da autofagia em quimioterapia demonstrou aumentar a eficácia dos agentes quimioterapêuticos<sup>60,66</sup>. O 5-fluorouracil (5-FU) é um medicamento amplamente utilizado no tratamento de vários cancros entre eles o cancro da mama, cabeça e do pescoço, colorretal e estômago. Este composto é um antimetabólico que inibe processos de biossíntese fundamentais para as células cancerígenas<sup>70</sup>. Foi verificado que a administração deste fármaco com o inibidor da autofagia (cloroquina) diminuía o crescimento do tumor no cancro colorretal *in vivo* e *in vitro*. No cancro do esófago, a combinação de repressores do processo autofágico em combinação com 5-FU ou cisplatina (um alquilante utilizado na terapêutica) evidenciaram um aumento do potencial quimioterapêutico<sup>66</sup>. Os inibidores da tirosina quinase do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR-TKIs) são comumente utilizados em pacientes com cancro do pulmão de células não pequenas. Em 2011 *Han et al*, verificaram que estes inibidores de tirosina quinase aumentavam os níveis do fluxo autofágico, que por sua vez conferiam resistência às células neoplásicas do pulmão, através da inibição da via de PI3K/Akt/mTOR. No entanto a repressão do fluxo pela cloroquina ou pelo silenciamento através de siRNA contra ATG5 e ATG7 (componentes importantes na formação dos autofagossomas), promoviam o efeito citotóxico de gefitinib e erlotinib nestas células. A inibição do mecanismo autofágico é uma abordagem terapêutica para melhorar a eficácia dos inibidores de tirosina quinase (TKIs) no tratamento de pacientes com cancro<sup>66,71,72</sup>. Em vários estudos tanto a cloroquina como o seu derivado, hidroxicloroquina (HCQ) em combinação com outros agentes mostraram resultados benéficos em várias linhas celulares<sup>66,71,73</sup>. A combinação de estratégias terapêuticas que atuam sobre a

via de PI3K/Akt/mTOR e autofagia apresentam um grande potencial para superar a resistência à quimioterapia<sup>60,63,66,69,71</sup>.

### 1.3.3.2 Morte celular autofágica como um mecanismo anticancerígeno

Como descrito anteriormente, a maioria dos compostos anticancerígenos tem como alvo os mecanismos de morte celular programada. A autofagia pode mediar a morte celular em células cancerígenas que apresentam defeitos ou resistência à apoptose<sup>60,66,74</sup>. A indução da morte celular autofágica por diferentes compostos é uma alternativa à terapêutica em tumores que apresentem estas condições. Os genes Bax e PUMA são reguladores fundamentais da apoptose. Em 2010, *Xiong et al* verificaram que células do cólon deficientes em Bax e PUMA induziam morte celular por autofagia após o tratamento com 5-FU, ao contrário da mesma linha *wild-type*. Para provar que a morte celular autofágica era uma via alternativa à apoptose nas células comprometidas, estes autores inibiram o fosfatidilinositol 3-cinase com 3-MA que regulou negativamente o fluxo autofágico. Os resultados demonstraram menos morte celular ao tratamento com o mesmo composto anticancerígeno (5-FU)<sup>66,75</sup>. O trióxido de arsénio ( $As_2O_3$ ) é um dos fármacos propostos para a terapia de diferentes neoplasias. O mesmo foi descrito como tendo um potencial indutor da autofagia citotóxica em células cancerígenas, nomeadamente em leucemia<sup>76</sup>. A promoção da morte autofágica a partir deste composto tem sido visto como uma boa abordagem terapêutica em vários tipos de cancro resistentes à apoptose<sup>60</sup>.

A ativação da via autofágica por fármacos também é uma das estratégias que pode promover a morte celular<sup>60,74</sup>. A inibição de mTOR é um dos principais métodos para desencadear a autofagia em estudos pré-clínicos e clínicos. Em 2013 o grupo de *Pierre Bischoff* demonstrou que o inibidor de mTOR (RAD001) potencializou a morte celular autofágica induzida por temozolomida em linhas celulares de glioblastoma<sup>60,66,77</sup>. A rapamicina (um inibidor de mTORC1) também induz a morte celular autofágica e suprime a proliferação de células malignas em diferentes linhas celulares<sup>74,78,79</sup>.

O tamoxifen é utilizado no tratamento do cancro da mama. A resistência adquirida a este fármaco é um dos problemas na terapia. O ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA), induz a morte celular autofágica em células do cancro da mama que são resistentes ao tamoxifen e reduz significativamente o crescimento do tumor<sup>60,66</sup>. A via AMPK/Akt/mTOR é essencial para a regulação da morte celular mediada por autofagia. A regulação negativa da via

Akt/mTOR por um composto de diarilquinolina (STM-57) provou induzir a morte celular autofágica em células do carcinoma nasofaríngeo<sup>66,80</sup>. A *tanshinone IIA* é um dos compostos utilizados na terapêutica do cancro. Um estudo em leucemia também comprovou que este fármaco induz a morte celular autofágica pela fosforilação de proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e desfosforilação de mTOR<sup>66,81</sup>.

Embora o papel da autofagia seja controverso na tumorigénese e na terapêutica, dados *in vitro* e *in vivo* indicam que a autofagia contribui maioritariamente na sobrevivência e resistência à quimioterapia e radioterapia<sup>60</sup>. No entanto é necessário entender os mecanismos de regulação e função desta via no contexto dos diversos tipos de tumor.

## 1.4 Mecanismos de regulação da autofagia

A autofagia ocorre em baixos níveis basais em praticamente todas as células e é rapidamente ativa quando as células necessitam de gerar nutrientes e energia intracelular<sup>57</sup>. Um dos principais reguladores do processo autofágico é o inibidor mTOR que responde aos níveis de nutrientes na célula. Entre outras moléculas que regulam este processo está a proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) que é um regulador chave dos níveis energéticos celulares. Deste modo, a via de fosfatidilinositol 3-cinase/alvo de mamífero da rapamicina (PI3K/mTOR) e a via de sinalização da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) surgem como os principais mediadores da regulação da autofagia<sup>80</sup>.

### 1.4.1 mTOR/PI3K

A autofagia pode ser induzida pela sinalização reduzida de fatores de crescimento. Como supramencionado, a sinalização de fatores de crescimento que regulam mTORC1 envolve a via de PI3K/Akt<sup>82</sup>. Na presença destes fatores, o Akt está ativo e regula positivamente mTORC1. A ativação de mTORC1 promove os processos anabólicos e inibe processos catabólicos, como a autofagia<sup>83</sup>.

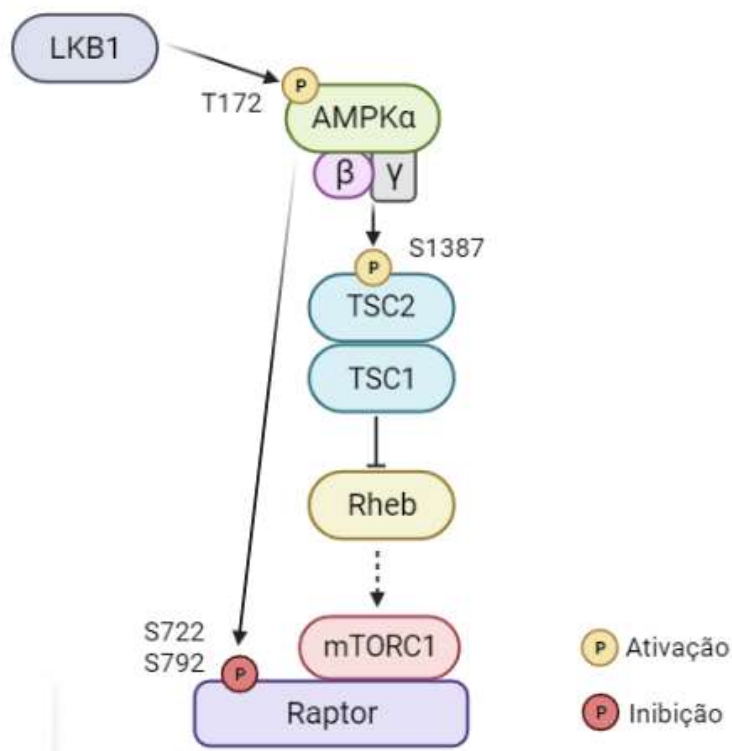
A desregulação da via de PI3K/Akt/mTOR pode desencadear a autofagia em muitos tipos de cancro em resposta a ambientes inóspitos com poucos nutrientes. Além disso, terapias anticancerígenas que interrompam esta via também promovem o processo autofágico<sup>84</sup>.

## 1.4.2 AMP-activated protein kinase (AMPK)

AMPK é uma proteína cinase composta por uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades reguladoras ( $\beta$  e  $\gamma$ )<sup>85-87</sup>. Esta proteína controla o metabolismo de glicose e lípidos em resposta a alterações nos nutrientes e níveis de energia intracelular<sup>86</sup>. Desta forma, AMPK promove processos catabólicos produtores de ATP e inibe processos anabólicos que consomem ATP<sup>88</sup>. Quando esta cinase é ativada, regula positivamente a autofagia por dois processos, através da inativação de mTOR ou pela ativação de ULK1<sup>51,84,89</sup>.

### 1.4.2.1 AMPK/mTOR

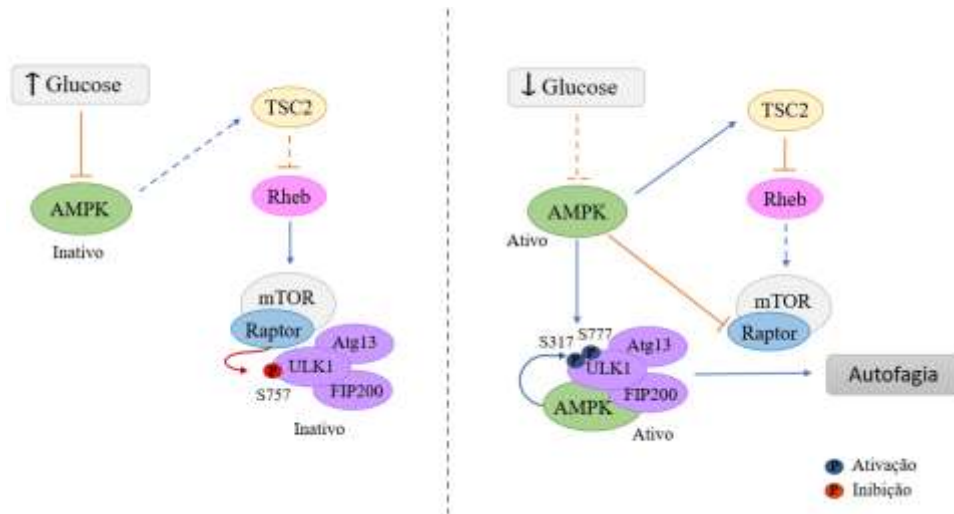
A proteína serina-treonina cinase hepática B1(LKB1) é um supressor de tumor que se encontra mutado em vários tipos de cancro<sup>86,87</sup>. LKB1 tem como substrato direto AMPK. Em condições em que os níveis de ATP diminuem e os níveis de AMP aumentam (como ocorre durante a privação de nutrientes e hipóxia), AMPK é fosforilado diretamente por LKB1 na treonina 172 da subunidade alfa (Figura 1.9)<sup>83,87</sup>. Quando fosforilado, AMPK torna-se ativo e antagoniza a atividade de mTORC1 através do complexo TSC2/TSC1 e de Raptor. Como mencionado no ponto 1.1.2.1.1., TSC2 inibe indiretamente mTORC1 por meio de Rheb. A proteína cinase AMPK fosforila TSC2 na serina 1387 e promove a ativação deste complexo, que por sua vez favorece a ligação de Rheb à guanosina difosfato (GDP). Uma vez que Rheb liga-se a GDP torna-se inativo e não regula a atividade de mTORC1 (Figura 1.9)<sup>88</sup>. Por outra via, AMPK fosforila as serinas 722 e 792 da proteína associada à regulação do complexo 1 de mTOR (Raptor) (Figura 1.9)<sup>88,89</sup>. A autofagia induzida pela regulação negativa de mTOR resulta na produção elevada de ATP através da reciclagem de substratos autofágicos<sup>51</sup>.



**Figura 1. 9 Sinalização da proteína cinase ativada por AMPK e mTOR.** Em condições de stress energético, AMPK é fosforilado por LKB1 na treonina 172. AMPK ativo regula positivamente a autofagia através de mTORC1 de duas formas. (1) TSC2 é fosforilado por ativação na serina 1387. O complexo TSC2/TSC1 quando está ativo promove a ligação de Rheb a GDP e torna-o inativo. Desta forma Rheb inativo não interage diretamente com mTORC1.(2) A proteína cinase AMPK fosforila as serinas 722 e 792 por inibição na proteína Raptor. Adaptado de *Shackelford and Shaw.,2009*.

### 1.4.2.2 AMPK e ULK1

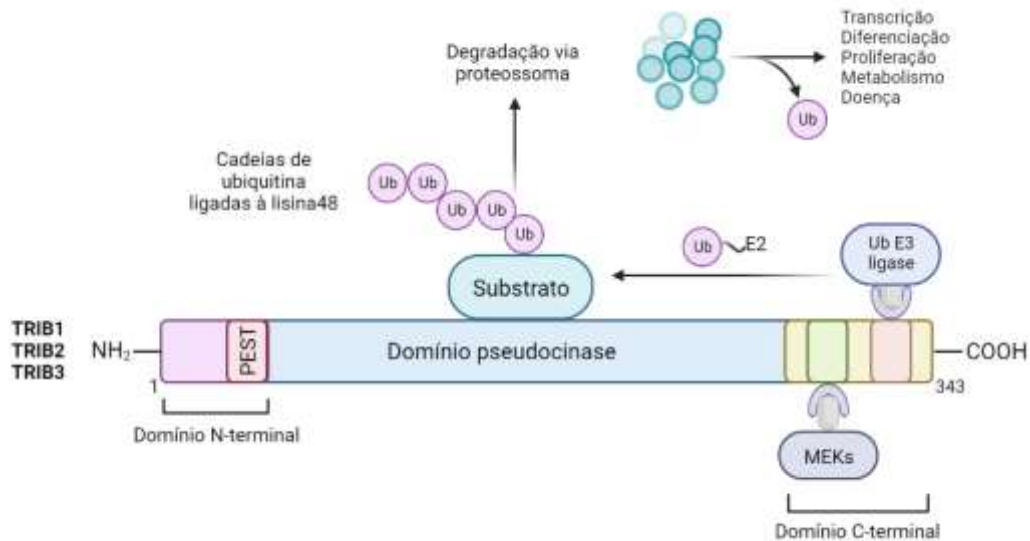
O complexo proteico composto por *unc-51-like kinase 1* (ULK1), gene 13 relacionado à autofagia (Atg13) e a proteína de interação da família cinase de adesão focal de 200 kDa (FIP200) é um regulador chave no início da autofagia<sup>82,84,85</sup>. Em condições de privação de nutrientes, AMPK inibe mTORC1 através de TSC2 e Raptor e ativa a autofagia pela fosforilação direta de ULK1 nas serinas 317 e 777 (Figura 1.10). No entanto, em condições ricas em nutrientes, mTORC1 fosforila o mesmo complexo na serina 757. Esta fosforilação por inativação, interrompe a interação de ULK1 com AMPK e inibe o processo autofágico<sup>82,84,85</sup>(Figura 1.10).



**Figura 1.10 Regulação de ULK1 por AMPK e mTORC1 em resposta aos níveis de nutrientes em fatores de crescimento.** (1) Sob níveis de glicose altos ou suficientes para a célula, AMPK torna-se inativo e mTORC1 está ativo. O mTORC1 ativo fosforila ULK1 na serina 757 e interrompe a interação de AMPK com ULK1. (2) Em condições de privação de glicose, AMPK torna-se ativo e inibe mTORC1 através de TSC2 e Raptor. Uma vez ativo, este sensor de energia intracelular fosforila por ativação ULK1 nas serinas 777 e 317 e induz a autofagia. Adaptado de *Kim et al., 2011*.

## 1.5 Tribbles

A família Tribbles (TRIB1, TRIB2 e TRIB3) é constituída por proteínas pseudocinases que controlam vários processos biológicos nas células<sup>90</sup>. Estruturalmente, os Tribbles são caracterizados por três domínios, um domínio N-terminal que contém uma região PEST, um domínio central de pseudocinase serina/treonina e um domínio C-terminal<sup>90-92</sup>(Figura 1.11). O domínio C-terminal contém um motivo que tem como alvo membros da família MAPKK/MEK e um motivo peptídico de associação direta a ligases ubiquitina E3. O domínio de pseudocinase é importante para o posicionamento e regulação de potenciais substratos para ubiquitinação e degradação pela via do proteossoma (Figura 1.11)<sup>92</sup>. Estas pseudocinases atuam como moléculas adaptadoras, que ligam e bloqueiam a atividade de moléculas reguladoras que participam em diversas vias de sinalização<sup>90-92</sup>.



**Figura 1.11 Estrutura da família Tribbles.** Estruturalmente a família Tribbles (TRIB1, TRIB2 e TRIB3) é composta por um domínio N-terminal que contém um motivo PEST, um domínio central de pseudocinase e um domínio C-terminal. O último contém um motivo que tem como alvo, membros da família MAPKK/MEK e uma região de associação direta a ligases de ubiquitina E3. A ubiquitina E3 ligase recruta uma enzima conjugadora de ubiquitina E2 que é carregada com uma ubiquitina, em conjunto reconhecem o substrato proteico. Este substrato encontra-se posicionado e regulado pelo domínio de pseudocinase. A poliubiquitinação do substrato é mediada por cadeias de ubiquitina ligadas à lisina 48, posteriormente o substrato é degradado via proteossoma. Tribbles participam na transcrição, diferenciação, proliferação, metabolismo e doença. Adaptado de *Eyers et al., 2017*.

Os Tribbles tem sido implicados no desenvolvimento de vários tipos de cancro por mostrarem um efeito oncogénico ou um comportamento de supressor de tumor dependendo do membro da família e do tecido.<sup>90,91</sup> No contexto do cancro, estas proteínas modulam vias de sinalização associadas a proliferação, sobrevivência, diferenciação e resistência a fármacos. A função destes membros na tumorigénese envolve a ubiquitinação e degradação de substratos ou supressão da sua estabilização e ligação a moléculas reguladoras de vias de sinalização como MEK e AKT<sup>90,92,93</sup>.

O TRIB1 foi identificado como um oncogene em leucemia mieloide aguda<sup>92,94</sup>. Este membro da família dos Tribbles foi também correlacionado com a sobrevivência das células cancerígenas da próstata e associado a um mau prognóstico<sup>90,95,96</sup>. Vários estudos foram publicados descrevendo a importância de TRIB1 noutros cancros como colorretal, glioma, ovário e tireoide<sup>90,93</sup>.

A semelhança de TRIB1, TRIB3 também está descrito como tendo um papel fundamental no desenvolvimento de diversos tumores, entre eles cancro do pulmão, mama, renal, gástrico, fígado, retinoblastoma, glioblastoma e ovário<sup>90,92,93</sup>. A expressão da proteína TRIB3 foi descrita como elevada em pacientes com cancro colorretal e ao nível do gene foi correlacionado com mau prognóstico para pacientes com cancro da mama e do pulmão de células não pequenas<sup>90,92,97-99</sup>. Em melanoma, a perda da expressão de TRIB3 foi correlacionada a um fenótipo tumoral mais agressivo, evidenciando que esta proteína atua como supressor de tumor<sup>90,100</sup>. Nestes casos, TRIB3 foi associado à regulação negativa de AKT através do complexo mTORC2 na serina 473 (Figura 1.3)<sup>100</sup>.

### 1.5.1 TRIB2

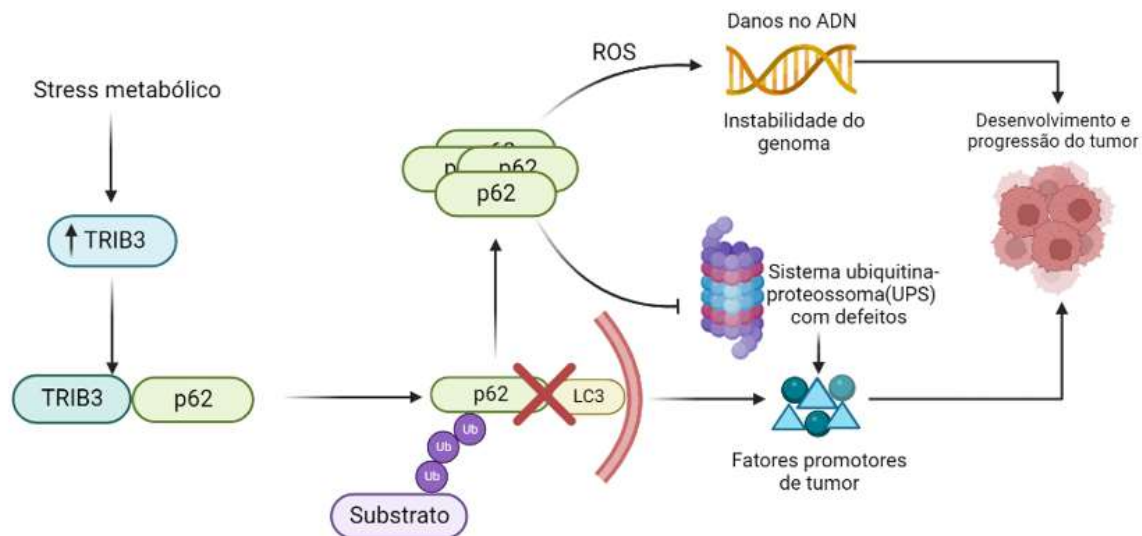
TRIB2 é o membro mais ancestral da família dos Tribbles e tal como os restantes membros, está associado à formação de tumores, progressão e resistência à terapia<sup>101</sup>. Está descrito que esta proteína é sobre-expressa em diversos tumores tais como melanoma, fígado, ovário e pulmão<sup>93,101,102</sup>.

A família TRIBBLES tem um papel fundamental na regulação do fator de transcrição C/EBP- $\alpha$ <sup>101</sup>. No cancro do pulmão e na leucemia mieloide aguda, TRIB2 atua como oncogene pela regulação negativa deste fator de transcrição que funciona como supressor de tumor<sup>101,103,104</sup>. As proteínas *Forkhead box O* (FOXO) também atuam como supressores de tumor e estão inativas na maioria dos cancros. Em melanoma, TRIB2 foi identificado como um repressor de FOXO e esta regulação aumentou a proliferação, sobrevivência e crescimento tumoral<sup>92,101,105</sup>. O nosso laboratório descreveu que TRIB2, ao contrário de TRIB3, interage diretamente com AKT ativando-o. Uma vez que FOXO atua na transcrição a jusante da via de sinalização de PI3K/Akt, a repressão de FOXO por TRIB2 parece ser indireta. No mesmo estudo, o nosso laboratório correlacionou a elevada expressão de TRIB2, associada à ativação de AKT com a baixa resposta a quimioterapêuticos. TRIB2 conferiu resistência a inibidores de PI3K (BAY236 e BAY1082439), inibidor de mTOR (Rapamicina), inibidor duplo PI3K/mTOR (BEZ235) e compostos citotóxicos convencionais como o 5-fluorouracil e DTIC<sup>101,106</sup>. Tratamentos à base de platina, como a cisplatina são utilizados em diversos cancros. TRIB2 tem sido implicado na sensibilidade dos tumores a terapia com cisplatina. *Kristsh et al* demonstraram que o *knockdown* de TRIB2 aumentava a resistência à cisplatina. Uma

explicação para esta observação foi o facto de estar descrito que as proteínas FOXO estão envolvidas na resistência ao tratamento com cisplatina. Uma vez que TRIB2 está ausente, não reprime a atividade de FOXO e deste modo a sensibilidade aos tratamentos com cisplatina é menor<sup>101,107</sup>. Em leucemia mieloide aguda a elevada expressão de TRIB2 conferiu quimiorresistência à *cytarabine*, *doxorubicin* e *daunorubicin*, que atuam na inibição da síntese de ADN. Por fim, *Wang et al* descreveram que o aumento de TRIB2 e *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1* (MAP3K1) em glioma está associado ao mau prognóstico e resistência à terapêutica com temozolamida<sup>108</sup>. De facto, TRIB2 parece funcionar como um biomarcador para o diagnóstico e progressão do tumor, assim sendo, pacientes com níveis elevados de TRIB2 podem beneficiar de terapêuticas personalizadas<sup>90,101,107,108</sup>.

## 1.5.2 Tribbles em autofagia

Está descrito que elevados níveis de TRIB3 interagem com a autofagia em algumas linhas celulares, inibindo-a<sup>109-111</sup>. Dados recentes revelam que o TRIB3 é um sensor de stress metabólico e interage diretamente com p62<sup>109,110,112</sup> (Figura 1.12). Este como supramencionado é responsável por sequestrar os substratos ubiquitinados e entregar no autofagossoma pela ligação a LC3. Uma vez que TRIB3 interage com p62, inibe a sua ligação a LC3 e assim suprime a degradação autofágica<sup>109-111</sup>. O facto de o fluxo autofágico ser interrompido leva à acumulação de p62 com substratos ubiquitinados e defeitos no sistema ubiquitina-proteossoma (UPS), o que por sua vez leva à acumulação de fatores promotores de tumor<sup>110,112</sup> (Figura 1.12). *Thang et al* em 2020, publicaram que TRIB3 é sobre expresso em glioblastoma e que a sua função na supressão da autofagia impulsionou a invasão e proliferação das células cancerígenas deste tumor<sup>113</sup>. As células de melanoma demonstraram promover a autofagia para aliviar o stress induzido pela terapia, conferindo resistência à terapêutica, sobrevivência e progressão do tumor<sup>111</sup>. A metformina foi descrita como um indutor do fluxo autofágico e regulador negativo da expressão de TRIB3, esta dupla regulação atenuou o crescimento e metástase em melanoma<sup>111</sup>. *Zhang et al* também descreveram que a interrupção da interação de TRIB3-SQSTM1 com um peptídeo helicoidal específico (Pep2-A2) demonstrou efeitos protetores contra a fibrose hepática<sup>109</sup>. Silenciar TRIB3 ou interromper a ligação de TRIB3-SQSTM1 pode ser deste modo uma estratégia terapêutica em alguns tipos de tumor<sup>109-111</sup>.



**Figura 1.12-TRIB3 interage com p62 e inibe o processo autofágico.** Em condições de stress metabólico TRIB3 funciona como um sensor e liga-se a p62. Esta interação direta inibe a ligação do recetor autofágico p62 com o substrato ubiquitinado a LC3 na membrana interna do autofagossoma. Uma vez que p62 não é degradado via autofágica, acumula-se na célula e induz espécies reativas de oxigénio (ROS) que por sua vez causam danos no ADN e instabilidade do genoma. Por outro lado, esta acumulação também promove inibição e defeitos no sistema ubiquitina-proteossoma (UPS). Estes mecanismos conferem diversos fatores promotores da carcinogénese que vão culminar no desenvolvimento e progressão do tumor. Adaptado de *Hua et al.,2015*.

## 1.6 Hipótese

Em vários contextos tumorais, TRIB3 e TRIB2 parecem regular a atividade da via de PI3K/Akt de modo antagonista. Elevados níveis de expressão de TRIB3 regulam negativamente a atividade de AKT e consequentemente da via de crescimento mTOR. Por outro lado, os dados científicos até ao momento revelam que níveis altos da proteína TRIB2 estão associados a níveis mais altos de fosforilação de AKT, e consequentemente um aumento na atividade da cinase mTOR. Adicionalmente, em alguns contextos tumorais, a presença de elevados níveis de TRIB3 esta associada a inibição do processo autofágico. Tendo estes dados em consideração, a nossa hipótese é de que TRIB2 atua na sobrevivência e resistência destes tumores induzindo o processo autofágico.

## 1.7 Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi investigar **a contribuição de TRIB2 na indução do processo autofágico.**

Deste modo delineamos os seguintes objetivos específicos:

- a) Estudar a contribuição de TRIB2 no fluxo autofágico usando as linhas isogénicas derivadas de osteossarcoma (U2OS) através da análise de marcadores autofágicos.
- b) Caracterizar o papel de TRIB2 a nível de morte celular, em células cuja autofagia está inibida.
- c) Analisar a expressão de genes autofágicos em células com e sem TRIB2 cuja autofagia está induzida

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultura de células

A cultura de células tem-se demonstrado uma ferramenta de enorme importância em diversas áreas de investigação, nomeadamente em Biologia Molecular, permitindo estudar várias patologias. A mesma consiste em extrair células de animais ou plantas e posteriormente crescer num meio artificial. Este ambiente contém todos os constituintes necessários para o seu crescimento e manutenção tais como: um substrato ou meio que contenha os nutrientes necessários (aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono e minerais), fatores de crescimento, hormonas e gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ), pH, temperatura e pressão osmótica<sup>114,115</sup>. O meio de crescimento utilizado neste estudo foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado com ultraglutamina (DMEM) (*Hyclone, Cytiva, USA*), 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) (*Biowest, South America*) e 1% de 100x de Penicilina Streptomomicina (*Corning, USA*).

#### 2.1.1 Linhas celulares estabelecidas

Para este estudo foi utilizada a linha celular de osteossarcoma -U2OS (*American Type Culture Collection* (ATCC)). Esta linha celular é derivada de um sarcoma moderadamente diferenciado da tíbia humano, é cromossomicamente alterada e é de fácil transfeção. Utilizou-se também a linha isogénica U2OS#1163 que sobre-expressa TRIB2 através da introdução do vector pBABE\_FLAG\_TRIB2, gerada anteriormente no nosso laboratório.

#### 2.1.2 Descongelamento de células

As linhas celulares descritas em 2.1.1 encontravam-se congeladas a  $-150^{\circ}C$  em 10% dimetil sulfóxido (DMSO) (*VWR, USA*), um agente criopreservador de células. Para descongelar as mesmas procedeu-se ao aquecimento dos crio-tubos (*VWR, China*) em banho maria a  $37^{\circ}C$ . Seguidamente preparou-se uma placa de 100 mm com 8 mL de meio de crescimento DMEM (*Hyclone, Cytiva, USA*), que foi previamente aquecido em banho-maria. Este procedimento foi realizado no interior de uma câmara de fluxo laminar *Microflow Biosafety Cabinet Class II (Telstar)* que foi primeiramente desinfetada com etanol a 70% a fim

de evitar contaminações, tal como todos os utensílios utilizados. Uma vez descongeladas e com a ajuda de uma pipeta p1000, as células foram transferidas para a placa e adicionou-se uma concentração final de 1µg/mL de puromicina (*Amresco, UK*) às células U2OS #1163, com o intuito de garantir uma pressão seletiva, para que apenas sobrevivam as células que contêm o DNA plasmídico e que incluem um gene de resistência a este antibiótico. As células foram mantidas numa incubadora (*Thermo electron corporation 311, Canada*) a 37°C com 21% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio de cultura foi renovado com o objetivo de eliminar restos de DMSO e metabolitos.

### **2.1.3 Manutenção, stocks e contagem das linhas celulares**

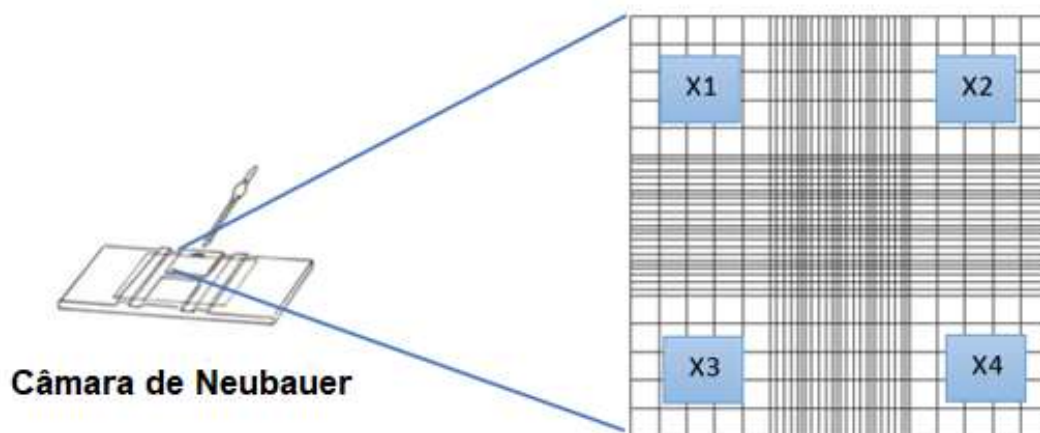
O meio de cultura pode mudar de uma tonalidade vermelho/rosa para laranja/amarela, esta alteração de cor indica-nos que o pH do meio se tornou mais ácido devido à atividade metabólica. Por este motivo as células foram visualizadas ao microscópio diariamente, a fim de perceber quando estão confluentes (percentagem de ocupação do espaço físico da placa) e deste modo perceber quando é necessário fazer uma passagem celular.

Neste procedimento começou-se por aspirar o meio antigo e adicionou-se PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (*Sigma Aldrich, USA*)), um tampão salino que possibilita retirar todos os detritos celulares de forma a lavar toda a superfície onde se encontram as células. Seguidamente, aspirou-se o PBS e adicionou-se 1 mL de tripsina com o objetivo de quebrar as ligações entre proteínas de adesão célula-célula, a fim de ficarem em suspensão. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C por 5 minutos e observou-se as mesmas ao microscópio para garantir que não estavam aderidas à placa. Na câmara de fluxo laminar acrescentou-se à tripsina 2mL de DMEM completo com a intenção de inativar a primeira solução. Posteriormente preparou-se uma nova placa de cultura com meio e adicionou-se um determinado volume de células. O restante volume foi descartado e as células foram incubadas em atmosfera húmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Quando necessário e para preservar a longo prazo as linhas celulares, estas foram congeladas periodicamente. Para congelar as células, aspirou-se o meio antigo, lavou-se com 1mL de PBS, removeu-se o mesmo e adicionou-se 1 mL de tripsina. Quando as células se encontravam em suspensão adicionou-se 2 mL de DMEM à placa, transferiu-se tudo para um *falcon* de 15 mL e procedeu-se a uma centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de

1000g. Terminada a centrifugação, todo o sobrenadante foi aspirado e de seguida ressuspendeu-se o *pellet* de células em 10% de DMSO e 90% de DMEM, transferindo-as para um crio-tubo (VWR, China), onde foram armazenadas a -80°C durante uma semana. Decorrido este tempo os crio-tubos foram transferidos para o congelador a -150°C até nova utilização. Este processo foi realizado de forma lenta com o criopreservante DMSO, a fim de este não formar cristais no interior das células.

Nas diferentes experiências levadas a cabo neste projeto foi necessário proceder-se à contagem de células. Para o efeito, o procedimento inicia-se do mesmo modo que a passagem de células descrita no parágrafo anterior. Decorrida a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 3 mL de DMEM e retirou-se 10 µL para um *ependorf*, a este adicionou-se 10 µL de *Trypan Blue* (Sigma Aldrich, UK). Desta solução removeu-se a mesma quantidade para uma câmara de *Neubauer* e contaram-se as células através do microscópio. A contagem foi feita em quatro quadrantes de 1mm<sup>2</sup> e determinou-se o número de células por mm<sup>3</sup>. Para obter o número de células por mililitro (mL), utilizou-se a seguinte fórmula:  $(X1+X2+X3+X4)/4 \times \text{fator de diluição} \times 10^4 = \text{Número de células por mL}$  (Figura 2.1).



**Figura 2.1-Contagem de células na Câmara de Neubauer.** A câmara de *Neubauer* foi usada para calcular o número de células em suspensão celular. Foram introduzidos 10 µL de amostra na câmara. As células foram contadas em quatro dos nove quadrantes identificados como X1, X2, X3 e X4. O número total de células por mL foi obtido através da fórmula:  $(X1+X2+X3+X4) / 4 \times \text{fator de diluição} \times 10^4$ . O fator de diluição utilizado foi de 2.

Para explorar a autofagia, no presente estudo foram utilizadas como ferramentas, inibidores e ativadores que estão descritos na literatura. Inibidores: SBI-0206965 (*Sigma Aldrich, USA*), Spautina-1 (*SigmaAldrich, USA*), Cloroquina (*Sigma Aldrich, USA Aldrich, USA*). Indutores: Rapamicina (*Sigma Aldrich, USA*) e PIK75 (*Sigma Aldrich, USA*).

#### **2.1.4 Extração e quantificação de proteína**

Após a colheita das células, procede-se à lise da membrana citoplasmática a fim de os componentes intracelulares serem libertados e se obtenha o chamado lisado proteico.

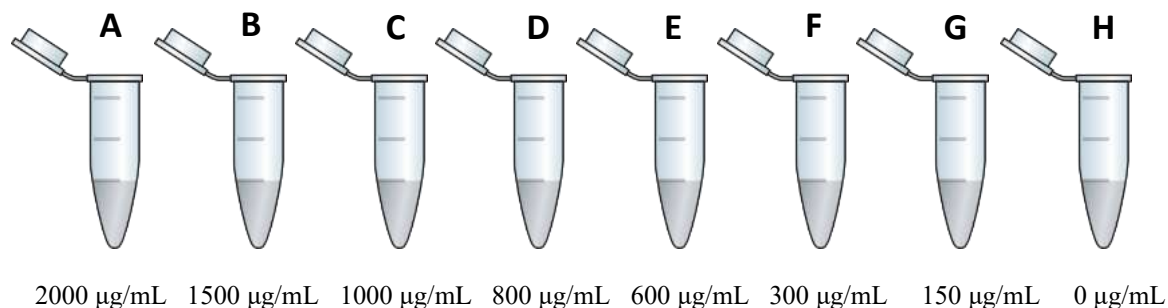
Para a extração da proteína neste projeto foi usado o tampão de extração com a seguinte constituição: (1 M Tris pH 7.5 (*Fisher Scientific, EUA*), 5 M NaCl (*Merck, Germany*), 5% Triton X-100 (*Amresco, Ohio*), 1M NaF (*VWR, EC*), 0.5 M EDTA (*Sigma Aldrich, USA*), 0.5M Ethylene glycol-bis-( $\beta$ aminoethyl ether)-*N',N',N',N'*-tetraacetic acid (EGTA; *AppliChem, Germany*), 200mM Sodium Pyrophosphate (*Santa Cruz, Dallas*), 1M  $\beta$ -Glycerolphosphate ( $\beta$ -G-P; *Santa Cruz, Dallas*), 100mM sodium orthovanadate (OVO4; *Sigma Aldrich, USA*) 0.1 mg/ $\mu$ L Calyculin A (*Santa Cruz, Dallas*) and 0.1 mg/ $\mu$ L Protease Inhibitors Cocktail (PIC; *Sigma Aldrich, USA*)). Após adicionado este tampão ao lisado proteico, foi realizada uma incubação de 20 minutos em gelo e para maximizar a eficácia da lise, a cada 5 minutos as preparações foram colocadas no vortéx. Seguidamente, os tubos foram centrifugados a 215 000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos a 4°C e colheu-se o sobrenadante para um novo tubo *Eppendorf*.

Para minimizar a atividade de proteases e outras enzimas que possam modificar a composição da amostra pela degradação proteica, em todos os procedimentos descritos os preparados foram mantidos em gelo.

A proteína foi quantificada usando o reagente de *Bradford (NZYTech, Portugal)*. Este é um ensaio colorimétrico, que tem por base a ligação da proteína ao corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, proporcionando uma mudança na absorção do mesmo de 465 a 595 nm, sendo que a proteína é monitorizada na absorção máxima de 595 nm que passa de castanho para uma coloração azul na presença de proteína<sup>116,117</sup>.

Para se obter a concentração das amostras comparou-se as absorvâncias das amostras com as de uma proteína com propriedades semelhantes e de concentração conhecida. Usou-se

albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*-BSA) a 2000 µg/mL para obter uma curva de calibração padrão (figura 2.2).



**Figura 2.2- Curva padrão da concentração de BSA.** Para o cálculo da concentração de proteína nas amostras teste, aplicou-se a curva de calibração linear. As diluições em série foram preparadas a partir da solução *stock* de albumina de soro bovino a 2000 µg/mL. A numeração com as letras de A a G correspondem às diferentes concentrações de BSA: A (2000 µg/mL), B (1500 µg/mL), C (1000 µg/mL), D (800 µg/mL), E (600 µg/mL), F (300 µg/mL), G (150 µg/mL), H (0µg/mL). Todas as diluições foram obtidas utilizando água Mili-Q.

Diluiu-se cada amostra a quantificar para um fator de diluição de 1:15 (5 µL de amostra em 70 µL de H<sub>2</sub>O). Na placa, pipetou-se 5µL de cada amostra (em duplicado) e 5µL das diluições de BSA numa placa de 96 poços. Por fim adicionou-se 250 µL de Bradford (*NZYTech*, Portugal) a cada poço.

A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e quantificou-se usando o Luminómetro Glo-max (Promega) a 595 nm. Usando a absorção da reta padrão ( $y=mx+b$ , onde  $y$ = absorvância a 595 nm e  $x$ = concentração da proteína) calculou-se a concentração de proteína das amostras e normalizou-se para uma mesma concentração final. Adicionou-se *Laemmli* 1x (0.2 M TrisHCl (*Sigma Aldrich*,USA), Ph 6.8, *glycerol* (*Sigma Aldrich*, USA) a 40% que irá dar densidade à amostra, 0.04% *Blue Bromophenol* (*Santa Cruz*, Dallas) para a visualização das amostras no gel, 0.3 M SDS (*Applichem*, Germany) um detergente que desnatura as proteínas e rompe as ligações não covalentes, permitindo que estas adquiram carga negativa ajudando assim a separação proteica em resposta ao impulso elétrico (eletroforese), 20% *β-Mercaptoethanol* (*Sigma Aldrich*,Steinheim)) e buffer extração. As proteínas foram desnaturadas a 100°C num *Termo Shaker* (BioSan) por 5 minutos.

## 2.2 Westernblot

A técnica do *Westernblot* tem como objetivo separar e identificar proteínas de acordo com o seu peso molecular. Posteriormente à separação das proteínas por eletroforese é realizada a transferência para uma membrana. De seguida, a visualização das bandas correspondentes requer a incubação com anticorpos específicos da proteína que se pretende visualizar <sup>117</sup>.

### 2.2.1 SDS-PAGE

As proteínas foram separadas de acordo com o seu peso molecular em uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de dodecil sulfato de sódio (SDS). Desta forma foram utilizados tampão 1 M Tris (*Sigma Aldrich,USA*) a pH 8.8, 40% *acrylamide* (Fisher Bioreagents,USA), 10% SDS (*Applichem,Germany*), H<sub>2</sub>O Mili-Q, APS (*Ammonium Persulfate, (Sigma Aldrich, USA)*) a 25% um agente oxidante que inicia a polimerização da poliacrilamida e bis-acrilamida juntamente com o *Tetramethylethylenediamine* (TEMED; *Santa Cruz Biotechnology, Dallas*) - catalisador de reação que permite a solidificação do gel poroso e concede a separação das proteínas de acordo com o seu tamanho.

A escolha da percentagem do gel de corrida foi baseada no tamanho de cada proteína de interesse como apresentado na Tabela 2.1.

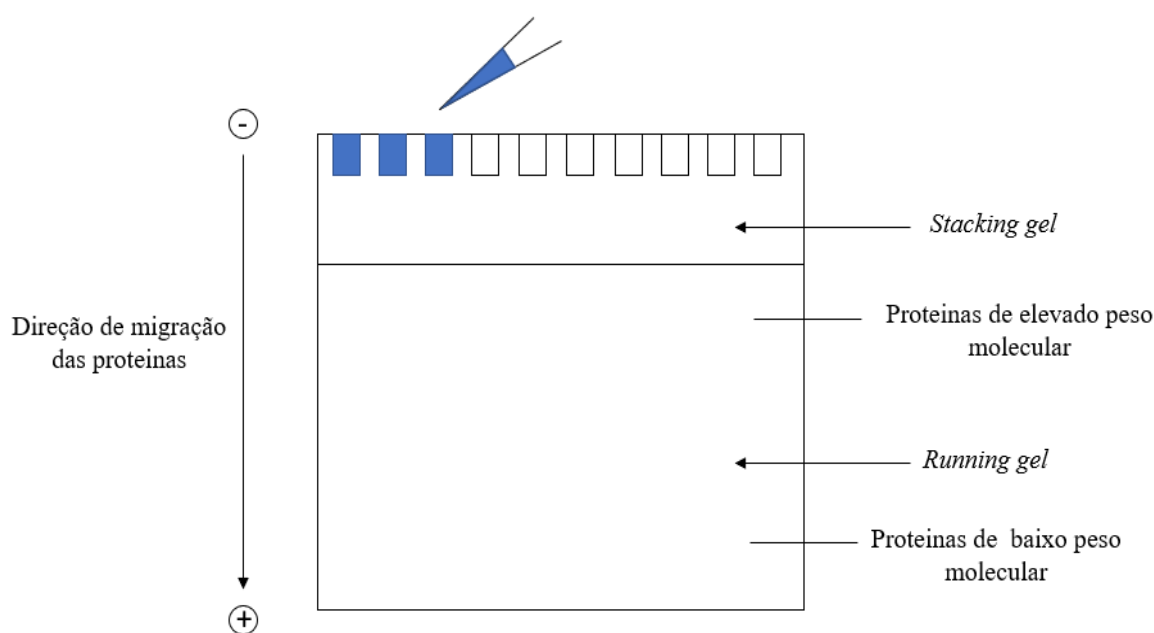
**Tabela 2.1: Percentagem de acrilamida de acordo com os intervalos de tamanho das proteínas em SDS-PAGE.** A migração das proteínas é inversamente proporcional aos seus pesos moleculares.

	6%	8%	10%	12%	15%
Tamanho da proteína (kDa)	60-200	40-100	20-70	20-60	10-40

Para o *Stacking gel* utilizou-se a mesma receita que no gel de corrida que apenas diferiu no Tris com pH=6.5. Esta diferença de pH é importante para que os aniões de glicina e os aniões de cloreto empacotem as proteínas numa espécie de sanduiche permitindo que as mesmas se juntem antes de entrar no gel de corrida e iniciem a migração ao mesmo tempo. A polimerização

dos géis levou cerca de 30 minutos. Posteriormente preparou-se o restante equipamento de eletroforese com os géis submersos em tampão SDS-*Page running buffer* (0.025 M Tris (*Sigma Aldrich*, USA), 0.25 M *Glycine* (*Sigma Aldrich*, USA) e 0.003 M SDS (*Applichem*, Germany)).

O primeiro poço de cada gel foi carregado com 3  $\mu$ L do marcador *NZYBlue Protein Marker* (NZYTECH) seguido de cada amostra como representado na Figura 2.3. Usando a fonte de energia BIO-RAD WB aplicou-se uma corrente de 75 V para iniciar a migração. Seguidamente a voltagem foi aumentada para 140-150V, quando alcançado o *running gel*. O tempo total de corrida foi de 80-90 minutos.



**Figura 2.3-Representação esquemática do gel SDS-PAGE.** O gel é carregado primeiramente com o marcador *NZYBlue Protein Marker* (NZYTECH) com 3  $\mu$ L seguido de cada amostra. A migração das proteínas é feita do polo negativo para o polo positivo. Proteínas com maior peso molecular encontram-se na parte superior do gel e proteínas de baixo peso molecular na parte inferior respetivamente.

## 2.2.2 Transferência da proteína

O próximo passo desta técnica consiste na transferência do gel para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) *Amersham*, UK) de 0,2 $\mu$ m que irá representar uma réplica do gel. Assim, colocou-se ambos envolvidos por papel de filtro, esponjas e uma placa de gelo

(Figura 2.4). Após a montagem de todo o equipamento de transferência adicionou-se SDS-PAGE *Transfer buffer* contendo 0.06M Tris (Sigma Aldrich,USA) e 0.05M Glicina (Sigma Aldrich,USA) e efetuou-se uma voltagem de 75 V durante 90 minutos para o gel de 10% e 60 minutos para o gel de 15% respectivamente.



**Figura 2.4-Esquematização da transferência na técnica de *Western blot*.** Para que ocorra a transferência o material é colocado pela mesma ordem demonstrada na figura, assim é aplicado uma corrente de 75 V com o intuito das proteínas migrarem para o cátodo (+). O tempo de transferência é de 90 minutos para o gel de 10% e de 60 minutos para o gel de 15%.

### 2.2.3 Bloqueio da membrana

Concluída a transferência procedeu-se ao bloqueio das membranas com leite magro em pó (Nestlé, Portugal) a 5% dissolvido em TBS-T (*Tris-Buffer Saline Tween-20*) (0.1M Tris (Sigma Aldrich,USA), 0.15M NaCl (Merck Milipore,Germany) e 0.1% Tween 20 (Merck Milipore, Germany)). A incubação foi feita durante 1 hora com agitação à temperatura ambiente. Este passo impede as ligações inespecíficas de outras proteínas com o anticorpo de interesse.

### 2.2.4 Incubação de anticorpos

Após o passo de bloqueio, as membranas foram incubadas a 4°C até ao dia seguinte com o anticorpo primário. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos na solução de

bloqueio (leite magro diluído em TBS-T X1) para o anticorpo TRIB2 e BSA com 0.05% de azida para os restantes anticorpos que estão descritos na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2: Lista de anticorpos primários e secundários para a análise por Western-blot.** A espécie, diluição, fornecedor e referência estão descritos para cada anticorpo utilizado na análise por Western-blot.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Fornecedor	Referência
TRIB1	Coelho	1:800	<i>Merck Millipore</i>	Ab75846
TRIB2	Coelho	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>	13533S
TRIB3	Coelho	1:1000	<i>Abcam</i>	Ab75846
LC3B	Coelho	1:500	<i>Cell Signaling Technology</i>	3868S
<i>Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)</i>	Coelho	1:500	<i>Cell Signaling Technology</i>	9234S
S6K total	Coelho	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Sc-230
SQSTM1/p62	Rato	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>	88588S
<i>Phospho-ULK1 (Ser555)</i>	Coelho	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>	5869S
<i>ULK1 total</i>	Coelho	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>	8056
<i>Phospho-AMPK<math>\alpha</math> (Thr172)</i>	Coelho	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>	2535
GAPDH	Coelho	1:5000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Sc-25778
<i>TUBULIN</i>	Rato	1:15000	<i>Sigma Aldrich</i>	T9026
<i>Anti-rabbit</i>	Burro	1:10000	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>	NA934

<i>Anti-mouse</i>	Ovelha	1:10000	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>	NA931
-------------------	--------	---------	------------------------------------	-------

Após a incubação com os anticorpos primários efectuou-se 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS-T, seguidamente adicionou-se o anticorpo secundário de diluição 1:10000, correspondente à espécie animal onde o anticorpo primário foi reproduzido. Esta incubação foi de 1 hora à temperatura ambiente e realizou-se novamente 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS-T.

Para a visualização das bandas utilizou-se uma solução de quimiluminescência-*enhanced chemiluminescence* (ECL) constituída por: 1.25mM Luminol (*Sigma Aldrich*, USA) diluído em DMSO, 0.2 mM ácido comárico (*Sigma Aldrich*, UK) diluído em DMSO, 0.1M TRIS pH 8.5 (*Sigma Aldrich*,USA) e 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*VWR*, EC). Esta preparação permite a detecção de proteínas em membranas de PVDF através da enzima HRP (*horseradish peroxidase*) presente nos anticorpos secundários que medeia a oxidação do luminol na presença de peróxido de hidrogénio.

Por fim, as imagens foram adquiridas através do sistema de imagem *ChemiDoc™XRS System* (BioRad).

### 2.3 Ensaio de morte celular com Trypan blue

Para determinar o efeito dos inibidores da autofagia na morte celular na presença de TRIB2, efetuou-se o ensaio de morte celular utilizando *Trypan blue*, que permite determinar a viabilidade celular através da integridade da membrana. As células mortas por perda de seletividade de membrana absorvem este corante para o citoplasma tornando-se azuis, enquanto que as células vivas permanecem intactas.<sup>118</sup>

Para este ensaio plaqueou-se as células em placas de 6 poços para os tempos de incubação estipulados nesta tese (12, 16, 24 e 36 horas).

Após estes tempos de incubação, para todos os procedimentos: colheita do meio, adição de PBS e tripsinização de células e meio, tudo foi recolhido para um falcon de 15 mL com o intuito de se aproveitar todas as células. Seguidamente centrifugou-se a 1000 rotações por

minuto (rpm) a 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em DMEM completo de acordo com o tamanho do mesmo.

Para a contagem de células na câmara de *Neubauer* o procedimento utilizado e o cálculo de células vivas e mortas por mililitro foi idêntico ao descrito no tópico 2.1.3.

O último passo deste ensaio consistiu na soma de todas as células por tratamento e no cálculo da percentagem de morte celular, que foi realizado através da seguinte fórmula: % morte celular = número de células mortas / Número total de células x 100%.

## 2.4 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) é uma técnica em biologia molecular que permite quantificar e analisar a expressão gênica, a partir de moléculas de ácido ribonucleico mensageiro (mARN). O RT-qPCR, inicia-se com a extração de ARN, posteriormente ocorre a conversão de ARN em cADN e a sua amplificação. A amplificação foi registada através da ligação de SYBR Green que apenas se liga às cadeias duplas de ADN, emitindo fluorescência. A fluorescência, detetada por um laser é proporcional à amplificação do gene, isto é, quanto maior a fluorescência do SYBR Green, mais ADN <sup>119</sup>. Este método é sensível, específico e rápido, e é utilizado para identificar diferentes variações na expressão de genes em amostras biológicas.

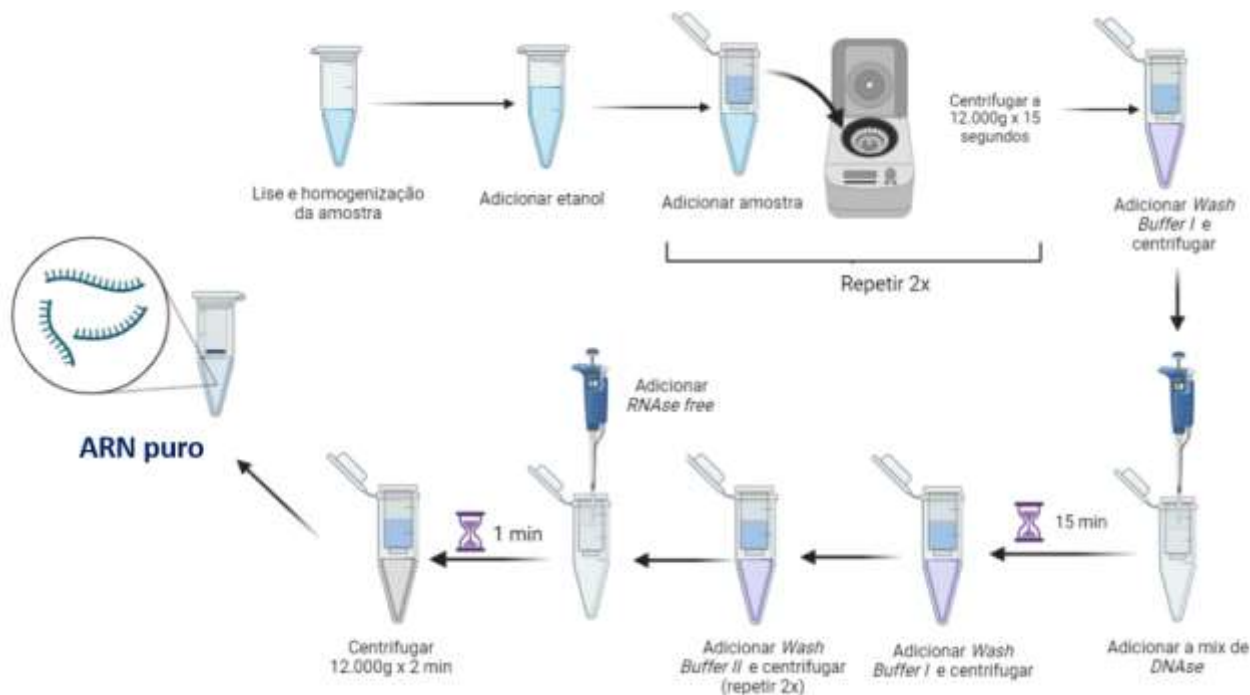
### 2.4.1 Extração de ARN

Foi extraído ARN da linha celular U2OS *wild-type* e da linha celular que expressa TRIB2 (#1163) após os tratamentos. As células foram colhidas de placas de 6 cm a uma confluência de 80-90% e os *pellets* foram armazenados em *ependorfs* de 1,5mL a -20°C para posterior uso.

O ARN é uma molécula instável, sensível e degradável. Por este motivo, com o intuito de destruir ARNs (enzimas que degradam o ARN) para todo o procedimento, superfícies e material foram utilizados *RNAse cleaner* (NZYTech, USA) e etanol a 70%.

A extração de ARN foi realizada com o E.Z.N.A Total RNA Kit I (OMEGA Bio-Tek, USA). De acordo com as instruções do fabricante, adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de *Lysis buffer* com 1% de 2-mercaptoetanol para cada amostra. Ao *buffer* de extração de ARN, adiciona-se 2-mercaptoetanol para assegurar que as ARNases libertadas pelas células sejam desnaturadas e desta forma não degradem o ARN. As amostras foram homogeneizadas com um vórtex durante 15 segundos. De seguida adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% a cada amostra e procedeu-se novamente à homogeneização no vórtex durante 15 segundos. Transferiu-se 700  $\mu\text{L}$  de amostra para a coluna providenciada pelo kit. Centrifugou-se a 12000g durante 15 segundos e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se o passo anterior para o restante volume de amostra. Seguidamente, adicionou-se 350  $\mu\text{L}$  de *Wash buffer I*, centrifugou-se novamente a 12.000g durante 15 segundos e descartou-se o sobrenadante (Figura 2.5). O *Wash Buffer*, tem como função garantir que todos os contaminantes, como proteínas, que se ligam à membrana, sejam removidos de forma que apenas fique retido o ARN.

Adicionou-se a *DNAse* diretamente na membrana que contem o ARN para garantir que todo o ADN é degradado e incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, adicionou-se novamente 350  $\mu\text{L}$  de *Wash buffer I* e centrifugou-se a 12.000g durante 15 segundos. Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer II* e centrifugou-se à mesma rotação e tempo estipulado que no ponto anterior. Este passo foi repetido duas vezes para assegurar que todos os contaminantes ligados à membrana são removidos. Após o sobrenadante ser descartado, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de *RNAse free* diretamente na membrana e incubou-se durante um minuto à temperatura ambiente. Por último, centrifugou-se a 12.000g durante 2 minutos e retirou-se as colunas dos *ependorfs* que estão previamente identificados com o ARN extraído (Figura 2.5).



**Figura 2.5-Esquemática do protocolo da extração de ARN.** O protocolo inicia-se com a adição de *Lysis Buffer* com 1% de 2-mercaptoetanol a cada amostra. Após a adição do *Buffer* de lise procede-se à sua homogeneização no vórtex e à adição de etanol a 70%. O passo seguinte consiste na transferência de 700 µL de amostra para um tubo em coluna e centrifuga-se a 12.000g durante 15 segundos. Em seguida é descartado o sobrenadante e este passo é repetido para o restante volume de amostra. Posteriormente, adiciona-se 350 µL de *Wash Buffer I* e centrifuga-se novamente à mesma velocidade de rotação e tempo estipulado anteriormente. De forma a garantir maior qualidade e extração de ARN puro, no passo seguinte adiciona-se *DNase* diretamente na membrana e incuba-se os tubos durante 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo repetiu-se o passo anterior de adição de *Wash Buffer I*. Uma vez descartado o sobrenadante, adiciona-se *Wash Buffer II* e centrifuga-se a 12.000g durante 15 segundos. Este passo é repetido duas vezes e é descartado o sobrenadante após cada centrifugação. Por último adiciona-se *RNase free* diretamente na membrana e incuba-se durante um minuto à temperatura ambiente. Centrifuga-se a 12.000g durante dois minutos e retira-se as colunas dos *ependorfs*, deste modo obtém-se o ARN puro.

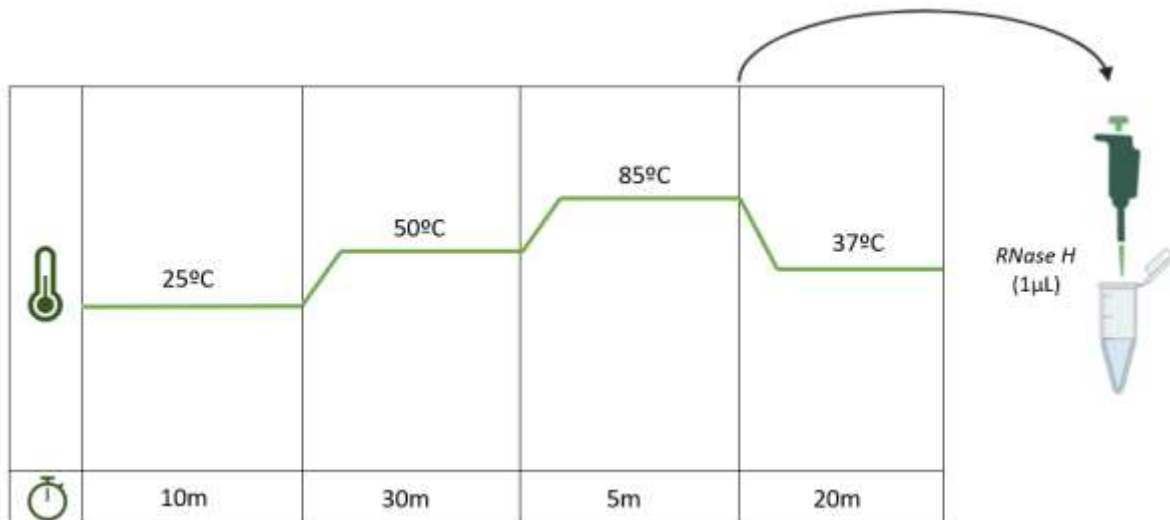
A concentração total de ARN (em µg /µL) e a qualidade do mesmo foram analisados utilizando o *NanoDrop 2000/c Spectrophotometer* (ThermoScientific, USA). A contaminação de proteína em amostras de ARN foi analisada através da razão de absorvâncias medidas em 260 nm e 280nm (A260/280). Esta proporção deve ser de aproximadamente 2 para que o ARN seja considerado puro. A razão de absorvâncias de 260 e 230 (A260/230) também foi analisada, uma vez que nos indica a contaminação por compostos orgânicos.

Após a medição e avaliação dos índices de contaminação, as amostras de ARN foram congeladas a -80°C para posterior uso.

## 2.4.2 Síntese e amplificação de cADN

Para a síntese de cADN foi utilizado o *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYTech, Portugal) e foram seguidas as instruções do fabricante. Preparou-se uma *mix* contendo 10 µL de NZYRT 2x *Master Mix*, 2 µL de NZYRT *Enzyme Mix* e o ARN (2ug) de cada amostra. Foi também adicionado água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC-*treated* H<sub>2</sub>O), que inativa todas as enzimas de ARNse presentes na água, para perfazer um volume final de 20 µL por cada amostra. O NZYRT 2x *Master Mix* contém os *primers*, desoxirribonucleotídeos de trifosfato (dNTPs), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e um tampão que é necessário para que não ocorra a alteração de pH. O NZYRT *enzyme* contém as enzimas necessárias para as seguintes reações, como a transcriptase reversa (*RNAse H minus*) e o inibidor de Ribonuclease NZY que elimina qualquer reação de ARN pela ação das ribonucleases.

Em seguida, as amostras foram submetidas a períodos de incubação térmica (ciclos) através do equipamento *C100 Touch Thermal Cycler* (BioRad, EUA). A síntese de cADN é caracterizada por três etapas: *annealing*, extensão e amplificação. A primeira etapa consiste na ligação do *primer* à cadeia molde de ARN, para este passo realizou-se uma incubação inicial de 10 minutos a 25°C (Figura 2.6). A segunda etapa é caracterizada pela síntese de ADN complementar (cADN), através dos *primers* que se ligaram a cadeia molde de ARN (passo anterior) e de uma enzima transcriptase reversa (RT). Para esta etapa foi necessário aumentar a temperatura para 50°C durante 30 minutos (Figura 2.6) para que ocorra a reação com a enzima RT. Por fim, após a extensão do cADN, a reação de RT foi interrompida por uma incubação de 5 minutos a 85°C (Figura 2.6). Na etapa final do PCR foi adicionado 1 µL de NZY *RNase H* e seguiu-se uma incubação de 37°C por 20 minutos (Figura 2.6). A função da *RNase H* é remover fragmentos de ARN, tal como impedir a sua ligação ao ADN, permitindo deste modo aumentar a sensibilidade e a eficiência do PCR.



**Figura 2.6- Esquema ilustrativo do protocolo de síntese de cADN.** A síntese de cADN é caracterizada por três etapas. A primeira etapa consiste na ligação dos *primers* à cadeia molde de ARN, este é realizado a uma incubação inicial de 25°C durante 10 minutos. Posteriormente aumentou-se a temperatura para 50°C durante 30 minutos, esta temperatura é a ideal para que ocorra a reação com a enzima transcriptase reversa. Neste passo ocorre a síntese do ADN complementar. Em seguida a reação de RT foi interrompida por uma incubação de 85°C durante cinco minutos. No final desta reação adicionou-se 1µL de *RNase H* a cada amostra. A adição da *RNase H* tem como objetivo eliminar os fragmentos de ARN, permitindo aumentar a sensibilidade e eficácia do PCR. Por último efetuou-se uma incubação de 37°C durante 20 minutos. m-minutos; C-Celsius.

### 2.4.3 Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

O qPCR é um método que permite detetar e quantificar os produtos da amplificação em tempo real<sup>119</sup>. Deste modo por meio de uma reação PCR, o cADN anteriormente gerado foi utilizado como molde, sobre o qual se incorporou um reagente de fluorescência. Assim, uma vez incorporado o reagente de fluorescência e na presença de *primers* específicos para cada gene de interesse, é possível detetar e quantificar os níveis de expressão de genes específicos.

Além dos genes de interesse foi também avaliada a expressão génica de um gene *housekeeping*. O *housekeeping* é um gene que está constitutivamente expresso em todas as células e assim é utilizado como gene de referência para normalizar a expressão dos genes em estudo. Para este projeto foi utilizado a Actina como gene de referência.

As amostras foram preparadas com uma *Mix* contendo o reagente de fluorescência 5 µL 2xSYBR Green (BioRad, EUA)), um reagente inespecífico que se liga às cadeias duplas de ADN e emite fluorescência permitindo a quantificação de ARN, 0.5 µL *primers forward* e *primer reverse* do stock a 1 µM dos genes de interesse, 2.8 µL H<sub>2</sub>O tratada com DEPC e 1.25 µL cADN por reação, para cada análise de gene. O volume total de reação foi de 10 µL e pipetou-se 8.8 µL por poço, numa placa de PCR de 384 poços. Foram também incluídos controlos negativos da reação, que contém todos os constituintes da *mix*, à exceção do cADN. A sequência dos genes analisados encontra-se descrita na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3: Lista de *primers* usados para a análise de RT-qPCR.** Sequência de *primers* (direção 5' para 3'), direção (*Forward* ou *Reverse*), tamanho (em pares de bases (pb)) e o fornecedor.

Gene	FW/RV	Sequência 5' → 3'	Tamanho (PB)	Fornecedor
NBR1	FW	GGTATCCATCAACAGTCAAGG	21	Eurofins
	RV	CGTTTTGCTCCTACAAGTGG	20	Eurofins
PINK1	FW	GGGAGTATGGAGCAGTCAC	19	Eurofins
	RV	AGCACATCAGGGTAGTCG	18	Eurofins
SQSTM1	FW	GGAGCAGATGAGGAAGATCG	20	Eurofins
	RV	TGGGTCCAGTCATCATCTCC	20	Eurofins
ULK1	FW	ACAAGAAGAACCTCGCCAAG	20	Eurofins
	RV	TTCCTTCACGATTTTGATTTCC	22	Eurofins
ULK2	FW	CTGACTTGTGGAGCATAGG	19	Eurofins
	RV	AATAAGGTGATGTTTCTCTGGG	22	Eurofins
UVRAG	FW	TCAACATGGACTAGGGACTC	20	Eurofins
	RV	ACTGGAGGTGTGATGTCTG	19	Eurofins
TRIB1	FW	ATCGCCGACTACCTGCTG	18	Eurofins
	RV	GTAATGTTGCTGTGCGATGG	20	Eurofins
TRIB2	FW	GACTCCGAACCTGTGCGATT	20	Eurofins
	RV	ATGAGCAGACAGGCAAAAGC	20	Eurofins
TRIB3	FW	TGCCCTACAGGCACTGAGTA	20	Eurofins
	RV	GTCCGAGTGAAAAAGGCGTA	20	Eurofins
ACTINA	FW	TGACCCAGATCATDTTTGAGA	21	Eurofins
	RV	AGGGCATACCCTCGTAGAT	20	Eurofins

O protocolo de amplificação inclui um passo inicial de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos e 60°C durante 30 segundos. O passo final de alongação consistiu em 65°C durante 5 segundos e 95°C durante 5 segundos. Durante a reação de RT-qPCR são detetadas variações na fluorescência, através de uma curva de amplificação. A amplificação é exponencial e foi registada fluorescência emitida através da ligação do reagente SYBR Green às cadeias duplas de ADN. A deteção da fluorescência é medida por um laser e a fluorescência é proporcional à amplificação do gene, isto é, quanto maior a fluorescência mais ADN existe na amostra. A reação de amplificação realizou-se no equipamento *CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad, EUA) e os resultados foram analisados utilizando o software *CFX Maestro* (BioRad, EUA).

Todas as amostras foram testadas em triplicado e o tratamento dos dados foi feito através da média desses triplicados. A partir desta média foi calculado o número de ciclos que é caracterizado pelo algoritmo  $\Delta Ct$ . O valor Ct indica-nos o ciclo a partir do qual começa a amplificação do nosso gene de interesse. O valor do Ct é inversamente proporcional ao número de vezes que o gene é transcrito, assim, quanto menor o valor de Ct, mais cedo começa a amplificação e maior é a expressão do gene. O valor obtido é normalizado para o transcrito de referência (Actina) de modo a obter o valor de  $\Delta Ct$  (Equação 2.1). Após a obtenção do valor de  $\Delta Ct$  para cada gene é possível comparar a linha *wild-type* com a linha que sobreexpressa TRIB2 através da subtração do  $\Delta Ct$  da amostra ao  $\Delta Ct$  da linha *wild-type* para cada um dos genes que pretendemos analisar (Equação 2.1). Por fim, utilizou-se a fórmula  $2^{-2\Delta\Delta Ct}$  para obter o número de vezes que o gene está amplificado relativamente ao controlo (*fold change*) (Equação 2.1).

$$\Delta Ct (\text{contolo}) = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{Actina})$$

$$\Delta Ct (\text{amostra teste}) = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{Actina})$$

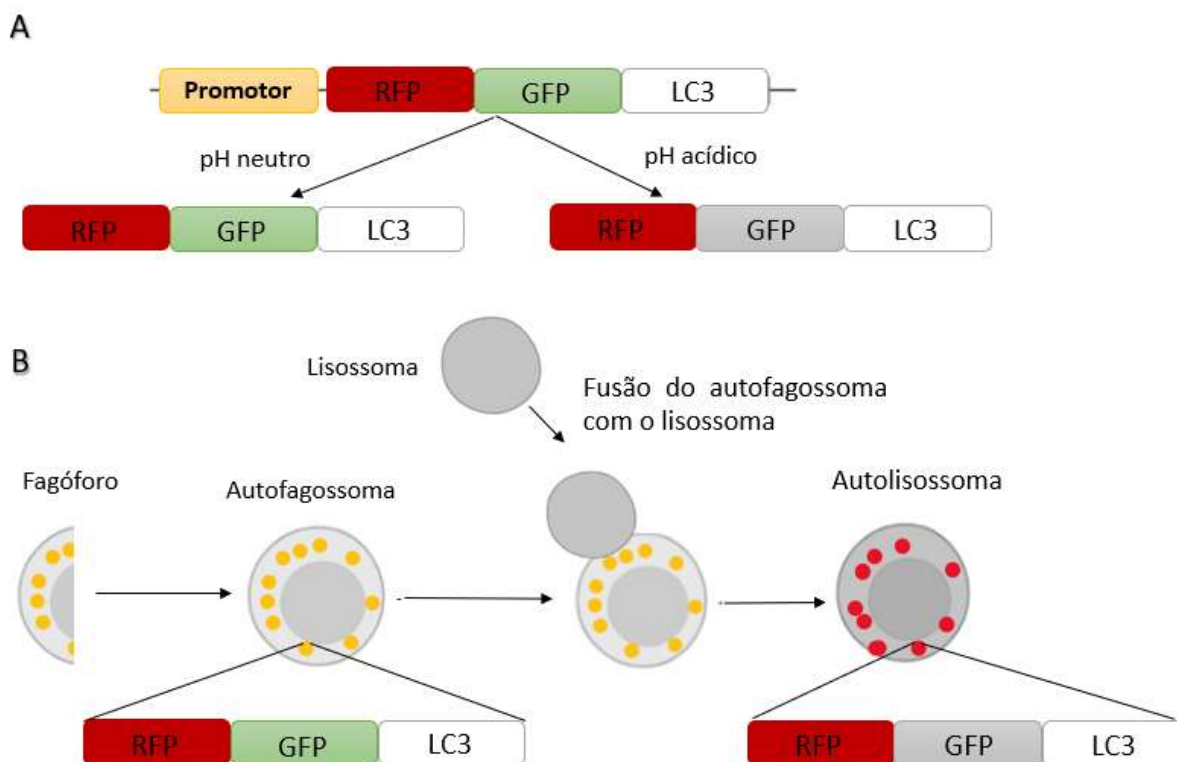
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{contolo}) - \Delta Ct (\text{amostra teste})$$

$$\textit{Fold change} = 2^{-2\Delta\Delta Ct}$$

**Equação 2.1: *Fold change* do cálculo da expressão do gene.** A avaliação da expressão dos genes foi analisada considerando a expressão génica de uma linha celular de controlo. Tanto para o controlo como para as amostras teste, normalizou-se os valores de Ct correspondentes a uma amplificação específica ( $\Delta Ct$ ) contra os valores Ct obtidos do gene de referência (Actina). Desta forma, realizou-se a relação entre o valor de Ct para o gene alvo de interesse e o valor de Ct para o gene de referência, para o controlo e amostras de teste. Normalizou-se o  $\Delta Ct$  da amostra teste para o  $\Delta Ct$  do controlo e obteve-se o  $\Delta\Delta Ct$ . O valor de  $\Delta\Delta Ct$  representa a mudança na expressão do gene alvo de interesse entre a amostra teste e a linha celular de controlo. Foi desta forma calculado o *fold change* através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que nos indica o número de vezes que o gene está a ser amplificado relativamente ao controlo.

## 2.5 Análise do Fluxo autofágico

A autofagia é um processo contínuo e a sua inibição ou indução vão afetar o fluxo autofágico. De modo a analisar o efeito da expressão de TRIB2 no fluxo autofágico usamos um sistema que expressa a proteína LC3 com um tag vermelho (RFP) e um tag verde (GFP) (Figura 2.7 A). Este método foi proposto por Kimura *et al.* em 2014 e permite-nos seguir o fluxo autofágico, uma vez que as proteínas fluorescentes GFP e RFP respondem de diferentes formas ao pH<sup>120</sup>. A fluorescência de GFP é suprimida em condições ácidas, enquanto o RFP é mantido nestas condições (Figura 2.7). No processo autofágico, quando o autofagossoma funde com o lisossoma, o ambiente torna-se ácido, o que leva à perda do sinal de GFP e à manutenção do sinal vermelho de RFP (Figura 2.7). Desta forma, os canais de GFP e RFP de células marcadas mostram diferentes padrões de puncta, dependendo do tipo de tratamento (Figura 2.7). Quando a autofagia é induzida nas células, observa-se mais punctas vermelhos, indicativos de maior fluxo autofágico. No entanto, quando a autofagia é inibida, verifica-se mais puncta amarelos, indicativos de mais autofagossomas e menor fluxo autofágico. Assim, esta técnica permite perceber, se a linha celular com TRIB2 (U2OS #1163), tem maior ou menor fluxo autofágico comparativamente com a *wild-type*.



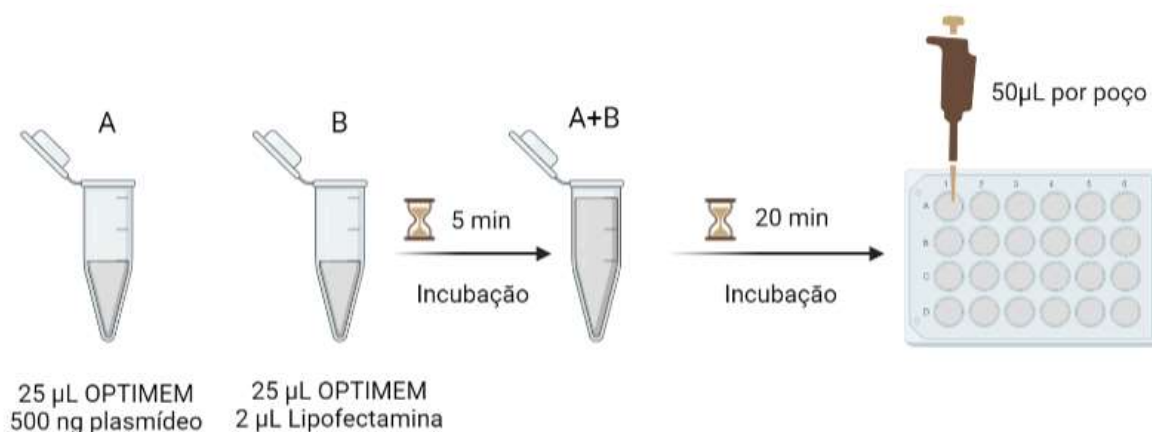
**Figura 2.7- Diagrama esquemático do repórter RFP-GFP-LC3 para monitorizar o fluxo autofágico.** (A) Representação do repórter RFP-GFP-LC3 e resposta das proteínas fluorescentes em diferentes condições de pH. A fluorescência de GFP é suprimida em condições ácidas, enquanto o RFP é mantido nestas condições. (B) Representação da marcação de RFP-GFP-LC3 durante a biogénese do autofagossoma, maturação e fusão com o lisossoma. Durante a formação do autofagossoma o sinal de GFP e RFP é mantido, demonstrando punctas amarelos. Autofagossomas fundem com os lisossomas para formar os autolisossomas. O sinal fluorescente de GFP é perdido devido às condições ácidas do lisossoma, onde o sinal de RFP se mantém, resultando em punctas vermelhos. Adaptado de *Lopez et al.*, 2018

Transfetámos a linha U2OS #1163 com o plasmídeo RFP-GFP-LC3 (ptLC3 #21074 Addgene, USA) cedido gentilmente pelo Professor Doutor Clévio Nóbrega (Anexo I).

No dia anterior à transfeção, cultivámos as linhas celulares em lamelas inseridas em placas de 24 poços de modo que estivessem a 60% de confluência no momento da transfeção.

No dia seguinte, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM<sup>®</sup> (meio com soro reduzido) a cada poço e foram preparados dois tubos *ependorf*, o primeiro tubo (tubo A) com 25  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM<sup>®</sup> e 500 ng de plasmídeo e o segundo tubo (tubo B) com 25  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM<sup>®</sup> e 2  $\mu\text{L}$  de Lipofectamina 3000 (*ThermoFischer Scientific*, Portugal) (Figura 2.7). O tubo A e o tubo B

foram incubados separadamente durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, misturou-se o volume do tubo A ao tubo B e incubou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente (Figura 2.8). Posteriormente, adicionou-se 50  $\mu$ L da mistura do tubo A+B gota a gota a cada poço. Após as 4 horas de incubação, substituiu-se o meio Opti-MEM<sup>®</sup> por DMEM e a mantiveram-se as células em cultura durante 24 horas.



**Figura 2.8-Protocolo de transfeção com Lipofectamina em placas de 24 poços.** No momento da transfeção prepara-se dois tubos (A e B) eppendorfs com os respectivos constituintes para a transfeção. O primeiro tubo *eppendorf* (A) contém 25  $\mu$ L OPTIMEM e 500 ng plasmídeo, o segundo tubo contém 25  $\mu$ L OPTIMEM e 2  $\mu$ L de Lipofectamina 3000. Seguidamente incuba-se as preparações à temperatura ambiente durante 5 minutos. Decorrido este tempo de incubação, adiciona-se o volume do tubo A ao B e incuba-se novamente à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente adiciona-se 50  $\mu$ L de preparação, gota a gota a cada poço que contém as células a uma confluência de 60% e incuba-se por 4 horas a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As quantidades dos constituintes utilizados (OPTIMEM, Lipofectamina e o plasmídeo) foram multiplicadas pelo número de amostras em estudo. min-minutos; C-Celsius.

Após o período de incubação, as células transfetadas foram submetidas aos tratamentos estipulados e foram fixadas para posterior visualização ao microscópio. Para tal as lamelas foram lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas em paraformaldeído (PFA) (Sigma Aldrich, USA) a 4% durante 20 minutos. Seguidamente, realizaram-se duas lavagens com PBS 1x, a fim de se retirar o excesso de PFA. As lamelas foram montadas em lâminas (VWR, Germany), com 3  $\mu$ L de meio de montagem com DAPI (sc-24941, Santa Cruz Biotechnology, USA). As imagens foram adquiridas no microscópio confocal LSM710 (ZEISS, Germany),

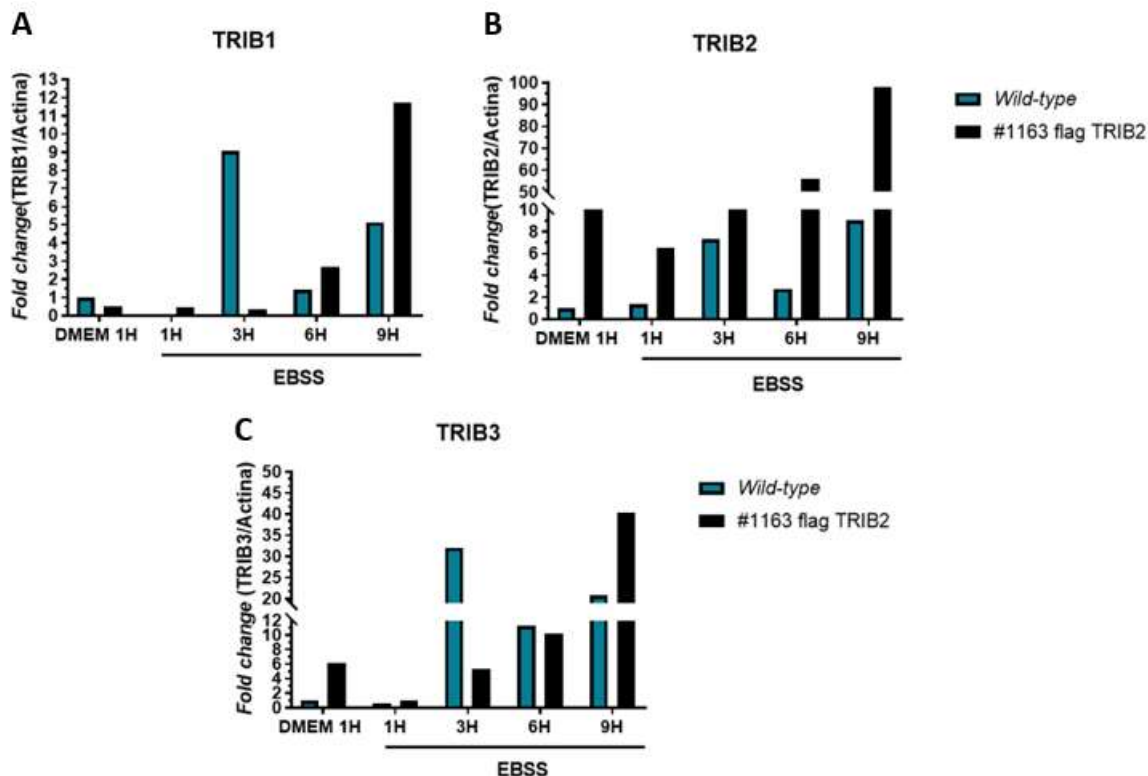
utilizando as linhas de laser 405, 488, 568 e o *Software* ZEN Black. A análise e tratamento destas imagens tal como as contagens dos respectivos “puncta” foram efectuados no *Software* ZEN 3.2 (Lite) (ZEISS).

### 3 RESULTADOS

Como descrito na introdução desta tese, a autofagia tem um papel controverso, mas fundamental na tumorigênese<sup>56,63</sup>. TRIB3 está descrito como um supressor do fluxo autofágico pela interação com o p62<sup>109,112</sup>. A inibição deste processo por esta proteína promove não só, a acumulação de fatores promotores de tumor como a indução de espécies reativas de oxigênio, que conferem instabilidade ao genoma. Estas condições culminam no desenvolvimento e progressão do tumor (Figura 1.12)<sup>109,112</sup>. Este projeto tem como objetivo principal, perceber se TRIB2 poderá desempenhar algum papel neste mecanismo.

#### 3.1. Os genes TRIBBLES são afetados pelos tratamentos de EBSS

A relação entre membros da família TRIBBLES ainda não foi muito explorada. Em alguns contextos parece que TRIB2 e TRIB3 tem funções antagonistas,<sup>106</sup> no entanto também há evidências que em determinadas situações estas proteínas podem compensar a função da outra<sup>100,105</sup>. Um dos métodos que utilizamos para manipular e induzir o processo autofágico é através da exposição das linhas celulares a meio com déficit de nutrientes, o meio EBSS. Com o objetivo de perceber se os genes TRIBBLES são modulados por estes tratamentos, analisou-se os níveis de expressão destes genes ao longo do tempo (1,3, 6 e 9 horas), após tratamento com EBSS (Figura 3.1). O nível de expressão de ARN mensageiro (mARN) de cada um dos genes da família TRIBBLES está representada em *fold change* relativamente à linha celular U2OS *wild-type*.



**Figura 3.1- Níveis de expressão de mRNA dos genes TRIBBLES após tratamento com EBSS.** Análise da expressão dos níveis de mRNA dos TRIBBLES durante os tratamentos com EBSS foram realizados através de RT-qPCR. As células U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram tratadas com meio rico em nutrientes (DMEM) durante uma hora e meio com privação de nutrientes (EBSS) durante 1, 3, 6 e 9 horas. Os níveis de expressão de (A) TRIB1, (B) TRIB2 e (C) TRIB3 é representada em valor de *fold change* relativo à linha celular U2OS *wild-type* para a condição de DMEM a uma hora.

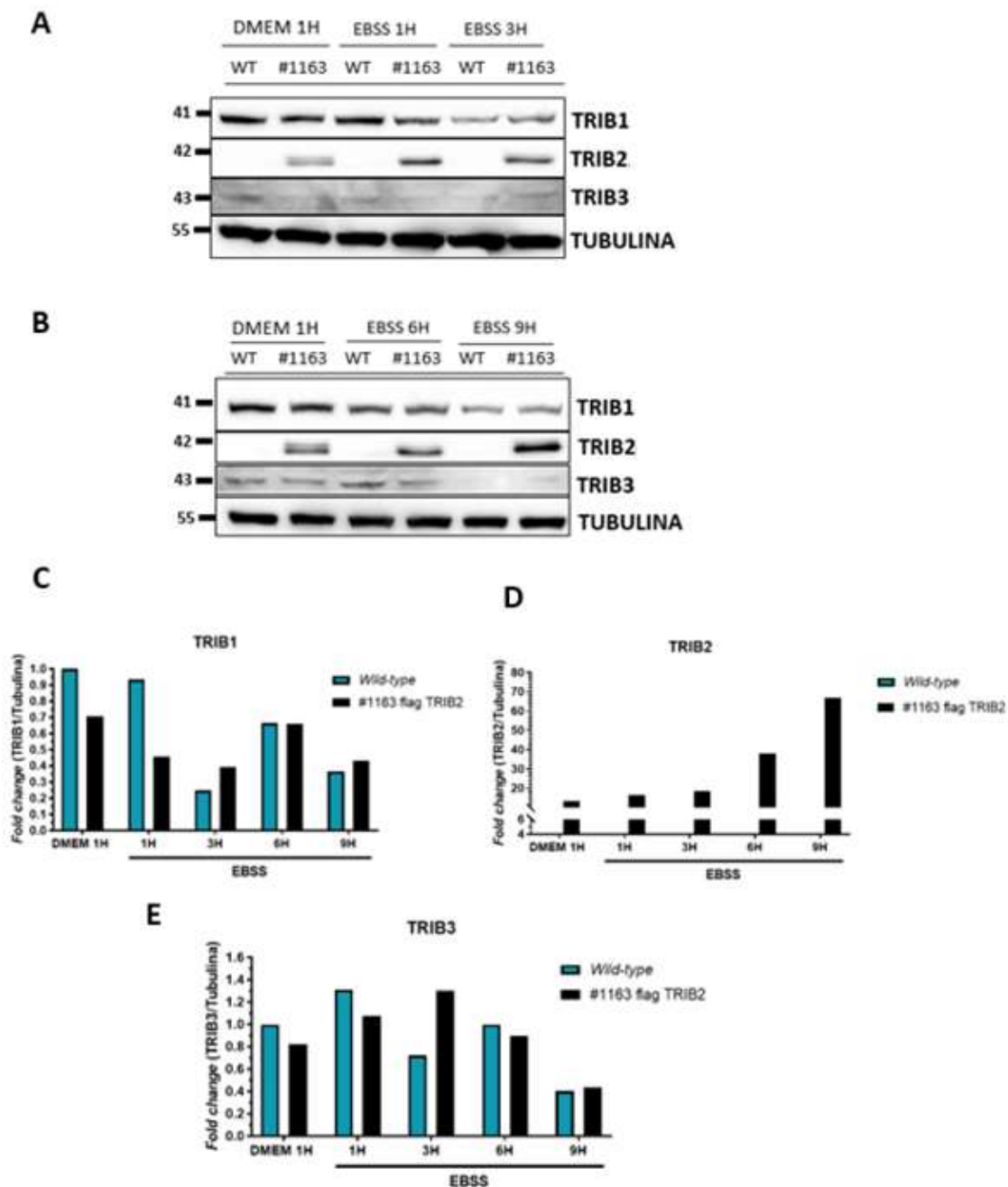
Os resultados demonstraram que em condições ricas em nutrientes, os níveis de expressão de TRIB1 não diferem, independentemente dos níveis de expressão de TRIB2 (Figura 3.1 A). Relativamente ao gene TRIB2, verificou-se um aumento de 25 vezes nos níveis de mRNA na linha celular U2OS #1163 quando comparada com a linha celular U2OS *wild-type* (Figura 3.1 B). Este resultado era esperado, uma vez que esta linha está transfectada com um plasmídeo que sobreexpressa TRIB2. Os níveis de expressão de TRIB3, em condições ricas em nutrientes, também se vêm aumentados em cerca de 5 vezes na linha celular que sobreexpressa TRIB2 (U2OS #1163) quando comparado com a linha celular U2OS *wild-type* (Figura 3.1 C).

Após incubar as células com meio sem nutrientes, observou-se que a expressão de todos os membros da família dos TRIBBLES aumentou ao longo do tempo de incubação com EBSS. No entanto, na linha *wild-type* verificou-se que os níveis de expressão de TRIB1 e TRIB3, após três horas de tratamento mostraram um aumento de 8 e 31 vezes nos níveis de expressão de mARN, respetivamente, comparativamente com o controlo (Figura 3.1 A e C). Contudo, estes dados são representativos de apenas uma experiência e podem representar um artefacto nestes resultados.

Em suma, os nossos dados revelam que os TRIBBLES são modulados a nível transcricional pela falta de nutrientes e que a nível da expressão de mARN não há compensação destes genes entre si.

### **3.2. Os níveis proteicos dos TRIBBLES são afetados pelos tratamentos de EBSS**

O nível de ARN mensageiro por vezes não é traduzido em níveis equivalentes de proteína. De forma a analisar se o aumento dos níveis de mARN se reflete em níveis aumentados de proteína, fomos analisar os níveis proteicos de cada uma das proteínas às mesmas condições experimentais usando a técnica de Western-blot, verificámos se os mesmos níveis de expressão se refletiam nos níveis da proteína (Figura 3.2). Para ambas as análises (RT-qPCR e *Western-blot*), os tratamentos, colheita dos *pellets* e extração da proteína foram realizados em simultâneo com o intuito de evitar variações nos resultados.



**Figura 3.2-Análise dos níveis proteicos dos Tribbles em tratamentos com EBSS.** As linhas celulares U2OS *wild-type* e #1163 foram tratadas com meio fresco durante uma hora ou com EBSS durante 1,3,6 e 9 horas. (A) Imagens representativas dos níveis proteicos da família dos Tribbles durante 1 e 3 horas de meio com privação de nutrientes. (B) Imagens representativas dos níveis proteicos da família dos Tribbles durante 6 e 9 horas de meio com privação de nutrientes. Quantificação dos níveis proteicos para todos os tratamentos, normalizados para o controlo (C) TRIB1; (D) TRIB2; (E) TRIB3. O gel foi carregado com 60 µg de proteína por poço. As quantificações foram realizadas no programa ImageJ e os gráficos foram gerados no GraphPad. DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*.

Os níveis de expressão da proteína TRIB1 e TRIB3 entre as linhas celulares demonstraram não diferir em condições ricas em nutrientes (Figura 3.2 C e E).

Após tratamentos com meio com privação de nutrientes, TRIB1 e TRIB3 a nível da proteína sugerem ser cíclicos (Figura 3.2 C e E). No entanto, os dados de expressão de mRNA aumentam com estes tratamentos.

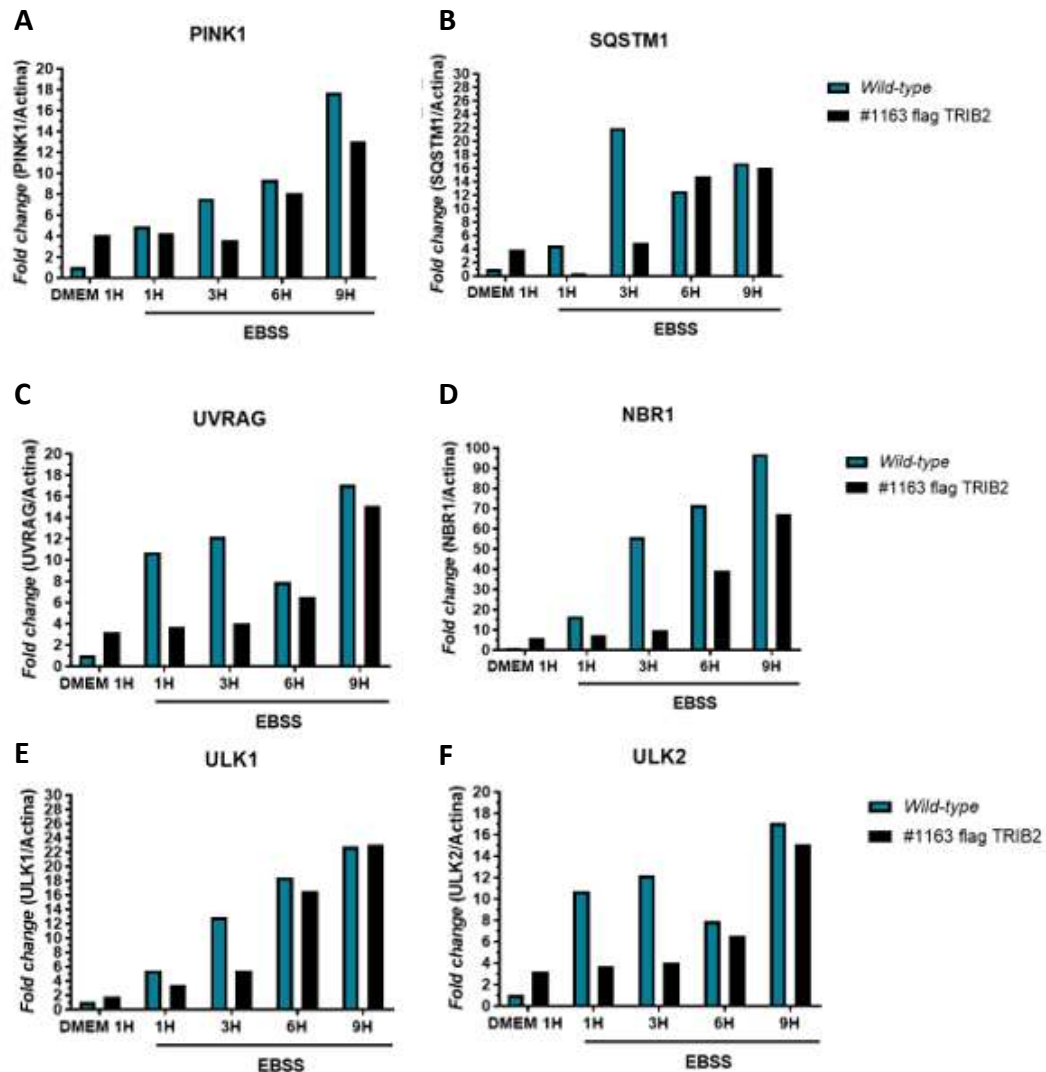
A análise dos níveis proteicos de TRIB2 validam a ausência da expressão desta proteína na linha celular U2OS *wild-type*, assim como a expressão de TRIB2 na linha celular U2OS #1163 que sobre expressa esta proteína (Figura 3.2 D). TRIB2 na mesma linha celular aumentou a sua expressão às 6 e 9 horas de tratamento com EBSS, porém, uma vez que esta linha tem uma sobreexpressão desta proteína, era esperado não se verificar alterações com os tratamentos de EBSS (Figura 3.2 D). Contudo, esta experiência foi realizada apenas uma vez e esta observação pode ser um artefacto.

Em suma, a expressão de mRNA dos TRIBBLES não é traduzido em níveis equivalentes da proteína. TRIB1 e TRIB3 sugerem ter uma expressão proteica cíclica com os tempos de tratamento e meio com privação de nutrientes. Deste modo, para comprovar esta observação, seria necessário explorar mais tempos de exposição, como 12, 14, 16 e 20 horas e verificar se este efeito se mantém.

### **3.3. Células com sobreexpressão de TRIB2 apresentam níveis reduzidos de expressão de genes autofágicos**

O processo autofágico refere-se a um processo contínuo na célula iniciado pela ativação de uma proteína cinase, ULK1. Os eventos que se seguem são maioritariamente regulados a nível de modificações pós-translacionais. No entanto em 2021 Bordi *et al.* publicaram um artigo que descreve que os genes que regulam o processo autofágico também são modulados a nível transcricional. Após analisar a expressão dos TRIBBLES em tratamentos de EBSS, decidimos analisar a expressão de genes que estão descritos na literatura como genes associados à ativação da autofagia<sup>121</sup>. Com o objetivo de perceber se a linha com sobreexpressão de TRIB2, expressa maiores níveis de mRNA destes genes em comparação com a linha celular *wild-type* foi realizada uma análise por RT-qPCR dos genes PINK1, SQSTM1, UVRAG, NBR1, ULK1 e ULK2.

De modo a analisar os níveis de mRNA dos genes autofágicos, tratamos as linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 durante uma hora em meio rico em nutrientes e 1,3,6 e 9 horas em meio com déficit de nutrientes (EBSS) (Figura 3.3)



**Figura 3.3-Níveis de expressão de mRNA dos genes autofágicos após tratamentos com EBSS.** Análise da expressão dos níveis de mRNA dos genes autofágicos após tratamentos com EBSS foram realizados através de RT-qPCR. As células foram tratadas com meio rico em nutrientes (DMEM) durante uma hora e meio com privação de nutrientes (EBSS) durante 1,3,6 e 9 horas. Os níveis de expressão de (A) PINK1, (B) SQSTM1, (C) UVRAG, (D) NBR1, (E) ULK1 e (F) ULK2 é representada em *fold change* relativo à linha celular U2OS *wild-type* para a condição de DMEM a uma hora. Células com TRIB2 expressam menos genes autofágicos. Os gráficos foram gerados no programa GraphPad. EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*; DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.N=1.

Como esperado, os nossos dados demonstram que o nível de expressão de mRNA dos genes autofágicos, aumentam progressivamente com o tempo de incubação em EBSS.

O SQSTM1 é o gene de p62, que está envolvido no recrutamento dos substratos poli-ubiquitinados e na ligação à LC3 na membrana do autofagossoma, para que ocorra a degradação autofágica. Os dados deste gene (Figura 3.3 B), demonstram maior expressão de níveis de mRNA mensageiro, com um *fold change* de 21 vezes mais que o controle, após três horas de tratamento para a linha *wild-type*. O gene UVRAG é fundamental na maturação dos autofagossomas e ULK2 responde à privação de nutrientes e é essencial para a degradação de proteínas ubiquitinadas<sup>121</sup>. Para a mesma linha, os genes UVRAG e ULK2 (Figura 3.3 E e F), após seis horas de EBSS, também diminuíram o seu nível de expressão.

Está descrito que PINK1 é induzido por privação de nutrientes e responde ao stress celular<sup>121</sup>. A expressão deste gene indicou ser mais elevada às 9 horas de tratamento com EBSS para ambas as linhas celulares (Figura 3.3 A). No entanto, os níveis de expressão do mesmo na linha celular *wild-type* comparativamente com a linha U2OS #1163 demonstram um aumento de 3 vezes mais às 3 horas.

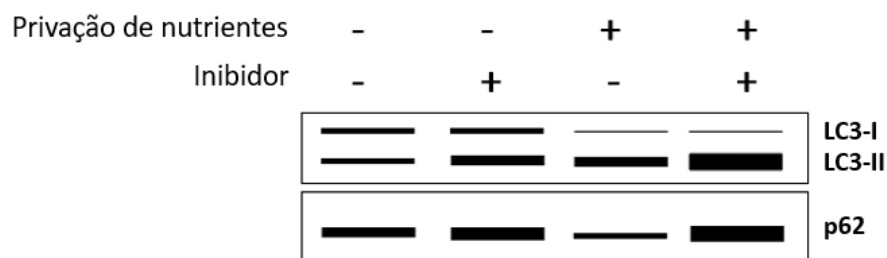
NBR1 é um recetor da autofagia que se liga aos substratos ubiquitinados, essencialmente peroxissomas e agregados. Este gene na linha celular *wild-type* apresentou um aumento de 14 vezes nos níveis de expressão de mRNA comparativamente com a linha U2OS #1163 (Figura 3.3 D). E o gene ULK1, um regulador mestre na indução da autofagia, que quando ativo desencadeia uma cascata de sinalizações para a formação do autofagossomas, também revelou diferenças mais acentuadas, entre as linhas celulares às 3 horas de tratamento (Figura 3.3 D).

Em síntese, foi interessante observar que a linha #1163 tem níveis de expressão de genes autofágicos inferiores à linha *wild-type*, estas diferenças são elevadas para três horas de tratamento com EBSS. Esta observação refuta a nossa hipótese inicial de que TRIB2 induz a autofagia, sugerindo que por outro lado TRIB2 bloqueia o fluxo autofágico.

### **3.4. TRIB2 altera o fluxo autofágico**

Com o objetivo de perceber o impacto de TRIB2 na autofagia. Este mecanismo foi induzido e analisado, através dos marcadores autofágicos LC3 e p62 em linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163. A conversão de LC3 (LC3-I em LC3-II) é comumente usado como

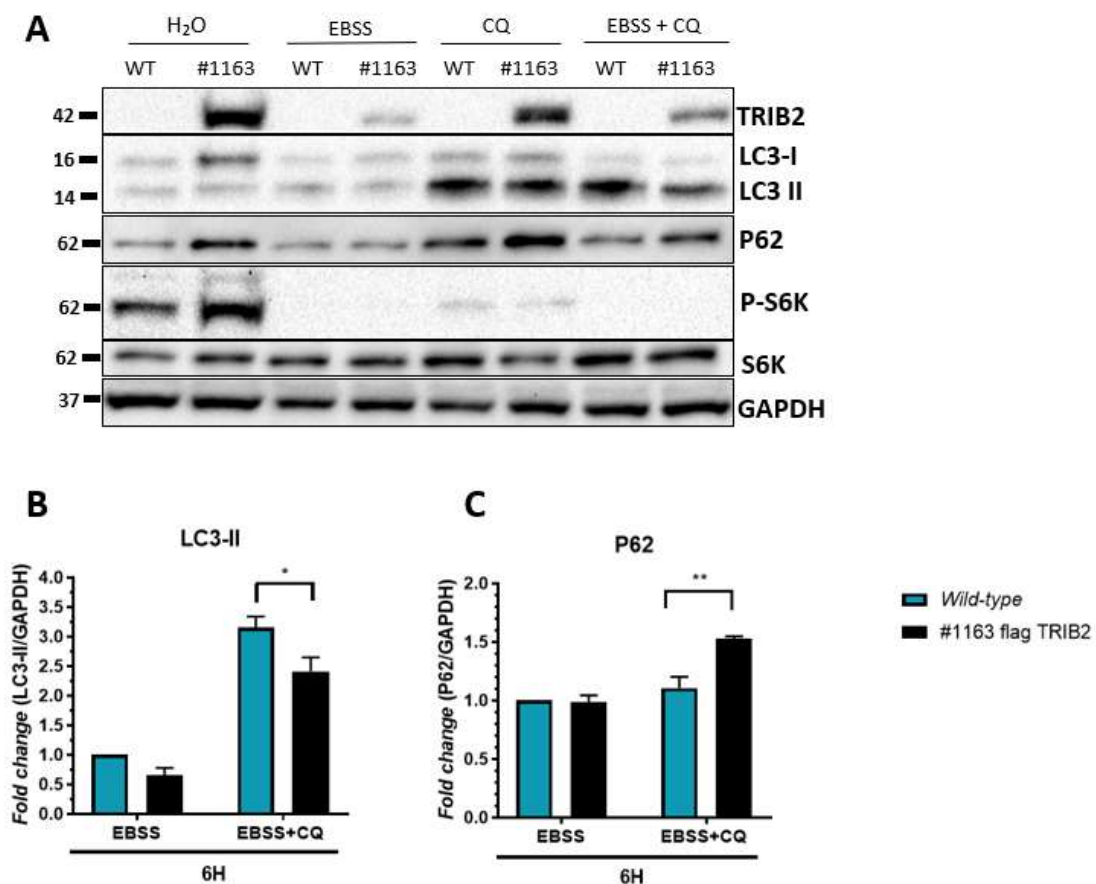
uma ferramenta porque a acumulação de LC3-II reflete a quantidade de autofagossomas e outras estruturas relacionadas à autofagia<sup>41,122,123</sup>. O p62 liga-se diretamente a LC3 e é degradado por autofagia (figura 1.5). Esta degradação significa fluxo autofágico contínuo, o que o torna também um marcador na avaliação deste mecanismo. De acordo com a literatura em condições de privação de nutrientes é esperado que a autofagia seja induzida e portanto não se observe acumulação de LC3 e p62<sup>39,122,124</sup>. No entanto, em condições em que o fluxo é inibido, ocorre a acumulação dos mesmos marcadores autofágicos que estão a ser produzidos por autofagia. Quando se induz e bloqueia a autofagia, com os respectivos indutores e inibidores, observa-se a acumulação dos marcadores que estão a ser degradados em condições de indução (privação de nutrientes) (figura 3.4)<sup>39,41,124</sup>.



**Figura 3.4- Ilustração esquemática da detecção do fluxo por *western-blot*.** O p62 e o LC3 são degradados por autofagia. Em condições de nutrientes, o inibidor acumula a quantidade de LC3-II e p62 que as células estão a fazer a nível basal. Quando o fluxo é induzido, não se observa os marcadores porque estão a ser degradados. Em condições em que o fluxo é induzido (privação de nutrientes) e inibido, observa-se a acumulação de p62 e LC3-II que estão a ser degradados no tratamento só com o indutor. Adaptado de *Yoshii et al*;2017.

A inibição do fluxo foi feita a partir de compostos descritos na literatura, SBI-0206965 (*Sigma Aldrich*, USA), spautina-1 (*Sigma Aldrich*, USA) e cloroquina (*Sigma Aldrich*, USA), que inibem respetivamente o início, meio e fim do processo autofágico. O tempo utilizado para a indução do fluxo foi previamente otimização por colaboradores do laboratório para a nossa linha celular de osteossarcoma. No entanto, foi realizada uma otimização para a indução da autofagia com uma concentração de 20  $\mu$ M de cloroquina (ANEXO II), por estar descrito na literatura, a uma, três e seis horas de tratamento.

Para iniciar o estudo proposto e a fim de cumprir o primeiro objetivo específico desta tese, começou-se por analisar o efeito de TRIB2 no fluxo autofágico, através da expressão dos marcadores autofágicos, LC3-II e p62, após indução (tratamento com EBSS) e bloqueio da via da autofagia com cloroquina a 20  $\mu$ M. As linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram expostas ao controlo com o veículo do nosso composto (H<sub>2</sub>O), utilizou-se também um controlo do indutor do fluxo autofágico (EBSS) e um controlo do inibidor (cloroquina), para garantir que o fluxo está a ser inibido no momento da fusão do autofagossoma com o lisossoma. Para a indução e bloqueio da via submetem-se as células a seis horas de tratamento com EBSS e cloroquina (Figura 3.5).



**Figura 3.5-Análise da expressão de LC3-II e p62 após indução da autofagia e bloqueio com cloroquina.** As células foram cultivadas com o controlo da cloroquina (H<sub>2</sub>O), EBSS (indutor da autofagia), cloroquina (inibidor do fluxo) e EBSS com cloroquina (indução e bloqueio da autofagia). A incubação consistiu num período de uma hora para o controlo e seis horas para os restantes tratamentos. Feita a lise para extração da proteína e análise por western blot. O gel foi carregado com 80  $\mu$ g de proteína por poço. Quantificações de (B) LC3-II e (C) p62 de duas experiências independentes foram normalizadas para o tratamento de EBSS. As quantificações foram realizadas através do programa ImageJ. A análise estatística foi realizada no GraphPad *Sidak's multiple comparisons test*. *p*-value <0.05\*. *p*-value <0.01\*\*. CQ-cloroquina a 20  $\mu$ M.; EBSS-Earle's Balanced Salt Solution. N=2 replicados biológicos.

Nesta experiência era esperado observar-se a acumulação dos marcadores autofágicos em EBSS com cloroquina (EBSS+ CQ), que estão a ser degradados quando induzimos apenas o fluxo autofágico (EBSS). Os nossos resultados demonstraram que em condições de indução e bloqueio do fluxo, a inibição foi eficiente para a linha *wild-type*, no entanto para a linha contendo TRIB2 (#1163) houve uma menor acumulação de LC3-II (Figura 3.5 A e B). Relativamente ao p62 verificamos que comparativamente com o controlo do indutor do fluxo (EBSS), a linha com TRIB2 verifica maior acumulação de p62 (Figura 3.5 A e C).

Com o intuito de perceber quantas vezes mais os marcadores autofágicos acumulam relativamente à condição de indução, quantificamos e normalizamos a expressão dos marcadores autofágicos para a condição de indução do fluxo na linha *wild-type*. Os nossos dados, indicaram que relativamente à condição de indução e bloqueio do fluxo, a linha U2OS *wild-type* acumulou 2 vezes mais LC3-II comparativamente à condição de indução (Figura 3.5 B). No caso do p62, os níveis de expressão da proteína não diferiram, uma vez que o *fold change* subiu de 1 para 1.1 (Figura 3.5 C). Para a mesma condição (indução e bloqueio do fluxo), a linha U2OS #1163 apresenta para os marcadores autofágicos LC3-II e p62 um *fold change* de 1.4 e 0.5 vezes mais do que a condição de indução (Figura 3.5 B e C). Estes dados indicam que células com TRIB2 produzem e acumulam mais p62 e menos LC3-II comparativamente com a linha *wild-type* em EBSS.

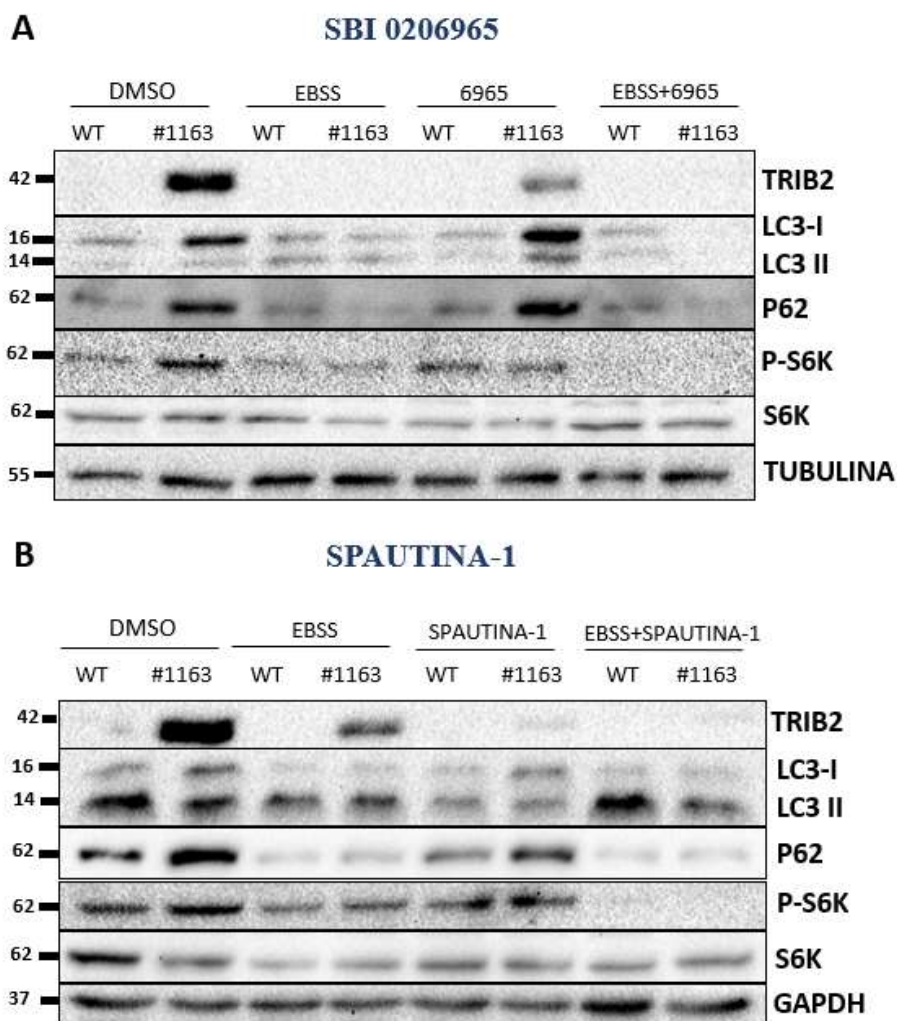
Biologicamente, maior acumulação de p62 pode indicar maior produção desta proteína em células com TRIB2. A observação de maior acumulação de LC3-II, pode ser indicativo de que a taxa de produção e degradação de autofagossomas é superior na linha U2OS #1163 quando comparado com a linha *wild-type*. Esta análise dos dados, apoia a nossa hipótese de que TRIB2 induz o processo autofágico. Por outro lado, menos LC3-II pode indicar menor produção de autofagossomas e mais p62 um atraso na entrega dos substratos autofágicos. Assim, de acordo com esta análise, TRIB2 pode inibir o processo autofágico.

Foi interessante observar que em condições ricas em nutrientes houve maior acumulação tanto de LC3-I como de p62 para a linha contendo TRIB2 (U2OS #1163) comparativamente à linha celular *wild-type*. Este resultado revela que TRIB2 a nível basal já altera o fluxo autofágico. Esta observação pode significar que biologicamente células com TRIB2 induzem o fluxo autofágico, pela maior produção de LC3-I e p62 ou de outro modo, a acumulação de LC3-I e p62 pode ser indicativo de que TRIB2 bloqueia o fluxo autofágico. Será necessário recorrer a outras experiências complementares para comprovar ou refutar a nossa hipótese.

Para a condição de tratamento com EBSS em que as células têm privação de nutrientes e induzem o fluxo autofágico, verificamos que os níveis globais de TRIB2 são reduzidos. Esta observação sugere que TRIB2 pode estar a ser consumido ou degradado, respondendo em condições de privação de nutrientes na célula.

### **3.5. Inibidor de ULK1 e Spautina-1 reduzem os níveis de expressão de TRIB2**

Com o intuito de perceber qual o efeito da sobre-expressão de TRIB2 ao longo das várias etapas do processo autofágico, repetimos a experiência anterior usando diferentes inibidores de moléculas que regulam esta via. Utilizamos o composto SBI-0206965 que inibe a cinase ULK1 e a spautina-1 que inibe Beclin-1 (Figura 1.5)<sup>125-128</sup>. Ambos os compostos foram utilizados a uma concentração de 10 $\mu$ M (Figura 3.6).



**Figura 3.6-Análise da expressão de LC3-II e p62 após indução da autofagia e bloqueio com SBI-0206965 e Spautina-1.** As linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram cultivadas com os inibidores SBI-0206965 e Spautina-1 a 10 $\mu$ M durante um período de 6 horas. A condição controlo (DMSO) refere-se ao tratamento com meio rico em nutrientes durante 1 hora. O gel foi carregado com 80  $\mu$ g de proteína por poço. Cloroquina a 20 $\mu$ M (CQ). EBSS-Earle's Balanced Salt Solution. N=3 replicados biológicos.

Sabendo que o SBI-0206965 inibe a cinase ULK1 (que inicia o processo autofágico) e a Spautina-1 a Beclina-1, estes compostos bloqueiam o início do processo autofágico e por consequência a formação de autofagossomas, esperaríamos observar níveis reduzidos dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 após inibição da autofagia.

Os nossos resultados demonstraram que quando o fluxo é inibido com SBI-0206965 as células com TRIB2 apresentam LC3-I e p62, comparativamente com a linha U2OS *wild-type* (Figura 3.6 A). O que verificamos foi que na linha celular U2OS *wild-type* a inibição foi eficiente, uma vez que a o SBI-0206965 bloqueou a cinase ULK1 e desta forma a formação de

autofagossomas. No entanto, quando o fluxo foi induzido e inibido com o mesmo inibidor, não se observou expressão dos marcadores autofágicos LC3-II e p62, como era espectável (Figura 3.6 A). Segundo os nossos dados resultados, células com níveis elevados de TRIB2 podem induzir mais autofagia e produzir mais LC3-I e p62, que não são recrutados para os autofagossomas, ou por outro lado TRIB2 pode estar a bloquear a autofagia e desta forma a exacerbar o efeito do SBI-0206965.

Quando o fluxo foi induzido e inibido com a Spautina-1, observou-se menor acumulação de LC3-II na linha com TRIB2 em comparação com a *wild-type*. A expressão de LC3-II para esta condição não era esperada, uma vez que a Spautina-1, sugere não ser eficiente para o bloqueio do fluxo autofágico. Assim, será necessário otimizar as condições experimentais e a concentração deste inibidor para experiências futuras.

O efeito de TRIB2 na expressão dos marcadores autofágicos, quando se inibe o fluxo com os três inibidores (Cloroquina, SBI-0206965 e Spautina-1), sugere que TRIB2 tem um efeito na via da autofagia a jusante, uma vez que interfere com a formação de autofagossomas, induzindo ou inibindo a sua formação. Esta análise é apoiada pela observação de LC3-I (Figura 3.6 A), quando o fluxo é inibido com o SBI-0206965 e menor acumulação de LC3-II, quando o fluxo é induzido e inibido com cloroquina (Figura 3.5).

Os nossos resultados, também demonstraram que estes inibidores reduzem os níveis de expressão da proteína TRIB2 (Figura 3.6). No entanto, esta redução não é suficiente para deixar de se observar o efeito de TRIB2. Esta observação é importante do ponto de vista terapêutico, visto que TRIB2 tem um papel oncogénico em diversos tipos de tumor, conferindo resistência a fármacos quimioterapêuticos. A modulação de TRIB2 é uma estratégia que está a ser explorada pelo nosso e outros laboratórios, para melhorar a resistência a terapias. Desta forma o mecanismo subjacente à redução da expressão de TRIB2 por estes inibidores, deve ser explorada no futuro.

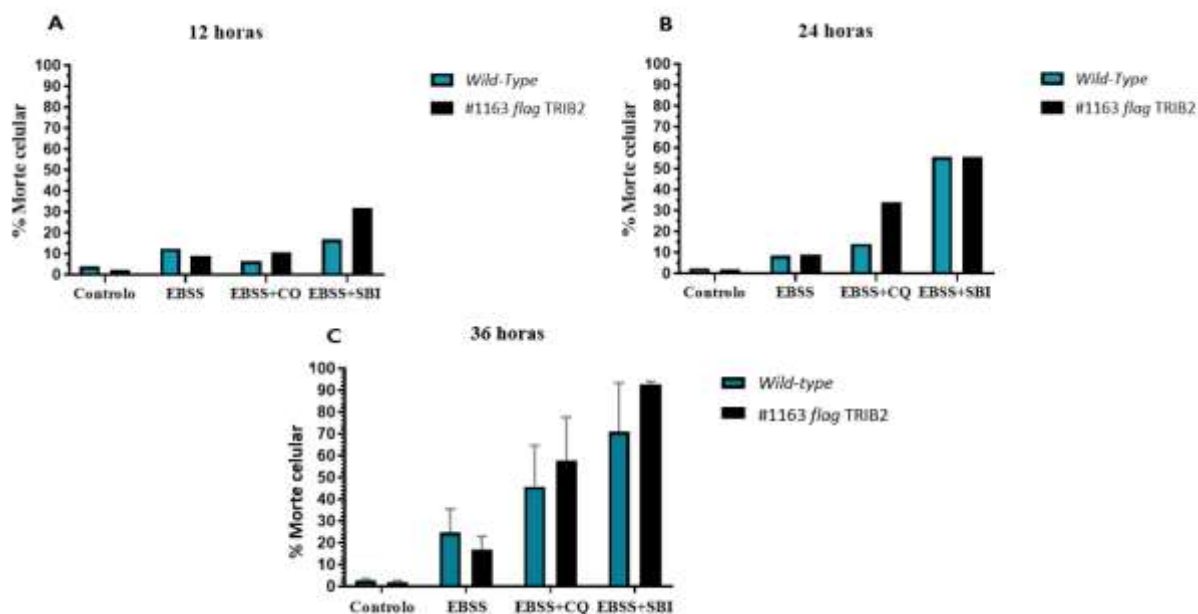
### **3.6. Efeito de TRIB2 na morte celular quando o fluxo autofágico é inibido**

A autofagia é uma via de sobrevivência celular. Quando a autofagia é inibida, ocorre a acumulação de autofagossomas. Uma vez que as células não conseguem degradar os autofagossomas, optam pela morte celular<sup>56</sup>.

TRIB2 tem um papel fundamental na sobrevivência, conferindo às células cancerígenas, resistência à morte celular, exigida pelos quimioterapêuticos.

Para perceber, o impacto da sobreexpressão de TRIB2 na indução da morte celular, quando a autofagia é inibida, foram realizados ensaios de morte celular com SBI-0206965 e cloroquina. O SBI-0206965 inibe o início da autofagia, através de ULK1. A cloroquina inibe a fusão do autofagossomas com o lisossoma, bloqueado o final do fluxo autofágico. Deste modo, este ensaio também permite perceber o impacto de TRIB2 na morte celular a montante e a jusante da via autofágica.

As células foram cultivadas num período de 12, 24 e 36 horas com meio com déficit de nutrientes (EBSS), EBSS com o inibidor de ULK1 (SBI-0206965) e EBSS com cloroquina (Figura 3.7).



**Figura 3.7- Análise da percentagem de morte celular após tratamentos com SBI-0206965 e Cloroquina.** As linhas celulares U2OS parental e U2OS #1163 foram plaqueadas 12 horas antes do início dos tratamentos. As células foram cultivadas com EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*), Cloroquina 20  $\mu$ M (CQ) e SBI-0206965 10  $\mu$ M (SBI) durante (A) 12 horas; (B) 24 horas e (C) 36 horas. Após os tratamentos, as células foram recolhidas e procedeu-se à contagem celular usando o reagente *Trypan Blue* (1:2). Para as 12 e 24 horas foi realizada uma experiência independente e para as 36 horas N=3 replicados biológicos. A significância estatística foi determinada pela *two-way* ANOVA. Os dados demonstram ser estatisticamente não significativos com um *p-value* superior a 0.1

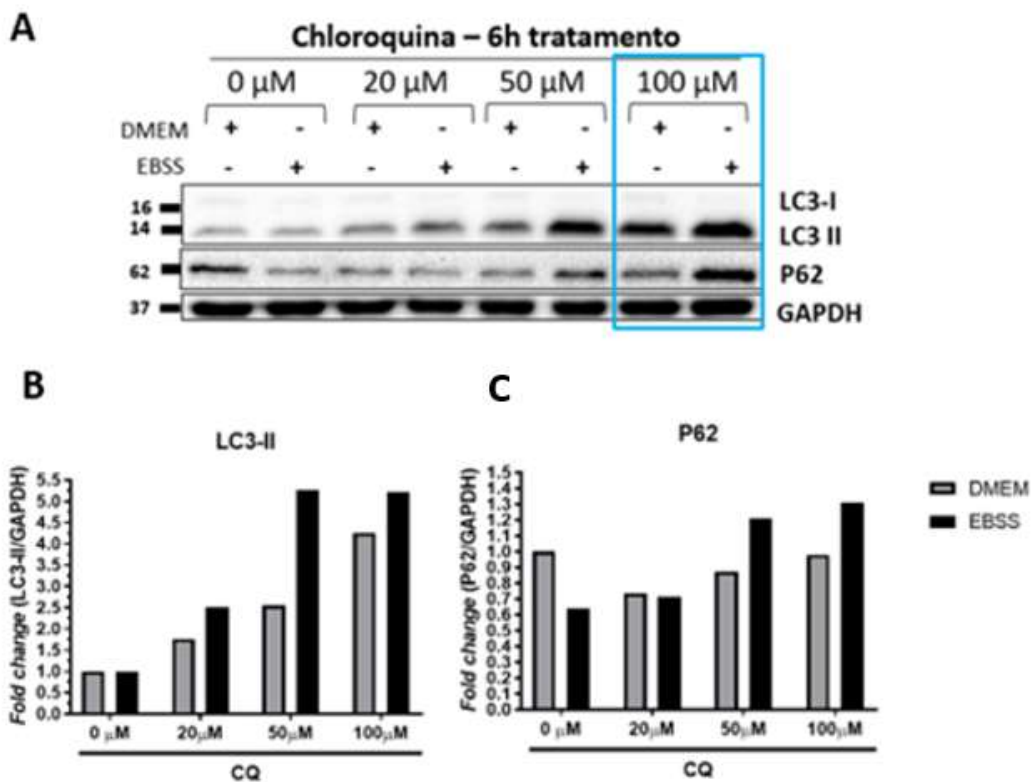
Os nossos resultados mostraram que após 12, 24 e 36 horas de indução e bloqueio do fluxo com SBI-0206965 e cloroquina, observa-se níveis elevados de morte celular (Figura 3.7). No entanto às 36 horas, verificou-se diferenças mais elevadas na morte celular entre as linhas U2OS *wild-type* e U2OS #1163 com o inibidor SBI-0206965. Com este resultado efectuaram-se três ensaios independentes e avaliou-se significado estatístico das percentagens de morte celular (Figura 3.7 C).

Esperávamos que células com TRIB2 apresentassem menores percentagens de morte celular, uma vez que esta proteína tem a função de oncogene em diversos contextos tumorais, conferindo resistência à morte celular exigida pelos quimioterapêuticos. Contudo, embora os dados não sejam reproduzíveis entre replicados biológicos, para os três ensaios independentes, os nossos dados indicaram mais morte celular na linha U2OS #1163, nos tratamentos com cloroquina (55%) e SBI-0206965 (93%) comparativamente com a *wild-type* (46%) e (71%) respetivamente (Figura 3.7 C). Desta forma, células com TRIB2 foram mais vulneráveis à morte

celular e este efeito foi mais exacerbado, quando o fluxo foi inibido pelo SBI-0206965 no início da via da autofagia.

### **3.6.1. Efeito do bloqueio do fluxo autofágico com cloroquina**

A opção de se usar uma concentração de 20 $\mu$ M de cloroquina nos ensaios anteriores foi baseada na bibliografia para diversas linhas celulares tumorais <sup>125</sup>. Porém, na linha celular U2OS a concentração de 20  $\mu$ M não resulta em ensaios com reprodutibilidade. De modo a contornar este problema, optámos por realizar uma experiência de otimização da concentração de cloroquina a ser utilizada especificamente na linha celular U2OS. Com esse objetivo, as células U2OS foram expostas a concentrações de 20, 50 e 100 $\mu$ M de cloroquina durante um período de 6 horas (Figura 3.8). Para perceber, qual a concentração que permite uma inibição eficaz, foram analisados a acumulação dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 em condições de bloqueio do fluxo com cloroquina e indução com inibição do fluxo (EBSS e cloroquina). Esta análise indica-nos se o inibidor bloqueia a autofagia basal das células e se esse efeito é exacerbado quando o fluxo é induzido. É esperado, que a acumulação de LC3-II e p62, em condições de privação de nutrientes-indicativo de mais autofagossomas-seja maior em comparação com a condição de inibição em meio rico em nutrientes.

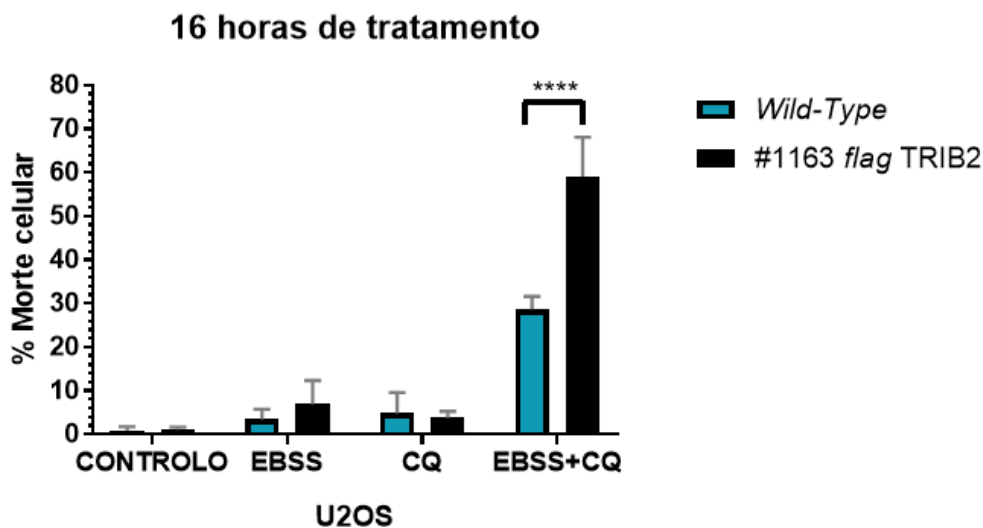


**Figura 3.8-Estabelecimento da concentração de cloroquina a ser utilizada no bloqueio do fluxo autofágico.** As células U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram expostas a um período de seis horas de tratamento com EBSS e DMEM. Foi feita a lise para a extração do conteúdo proteico. O gel foi carregado com 60  $\mu$ g de proteína por poço. O inibidor lisossomal, cloroquina está a uma concentração de 20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Quantificações de (B) LC3-II E (C) p62 foram normalizadas para o controlo (Células *wild-type* em DMEM com cloroquina a 6 horas). As quantificações foram normalizadas no programa ImageJ. CQ-cloroquina; DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EBSS-Earle's Balanced Salt Solution. N=1.

Os resultados obtidos indicam que a concentração de 50  $\mu$ M é a mais adequada por se observarem diferenças mais elevadas entre a acumulação de p62 e LC3-II entre os tratamentos, refletindo uma eficácia maior na inibição da autofagia (Figura 3.8). Contudo, optou-se por 100  $\mu$ M de cloroquina por também apresentar níveis elevados dos marcadores autofágicos e por ser a concentração eleita nos ensaios autofágicos para a linha celular U2OS.

### 3.7. Células com TRIB2 são mais vulneráveis à morte celular em condições de bloqueio do fluxo autofágico com cloroquina

Com o intuito de validar o efeito de TRIB2 na morte celular, quando o fluxo é inibido e desta forma obter significância estatística nos resultados, foram realizados ensaios de morte celular com a cloroquina a 100  $\mu\text{M}$  (concentração estipulada com a experiência anterior) (Figura 3.8). As células foram cultivadas em meio rico em nutrientes (controlo), indutor do fluxo autofágico (EBSS), inibidor (cloroquina), e indutor com o inibidor (EBSS e cloroquina) por um período de 16 horas (Figura 3.9).



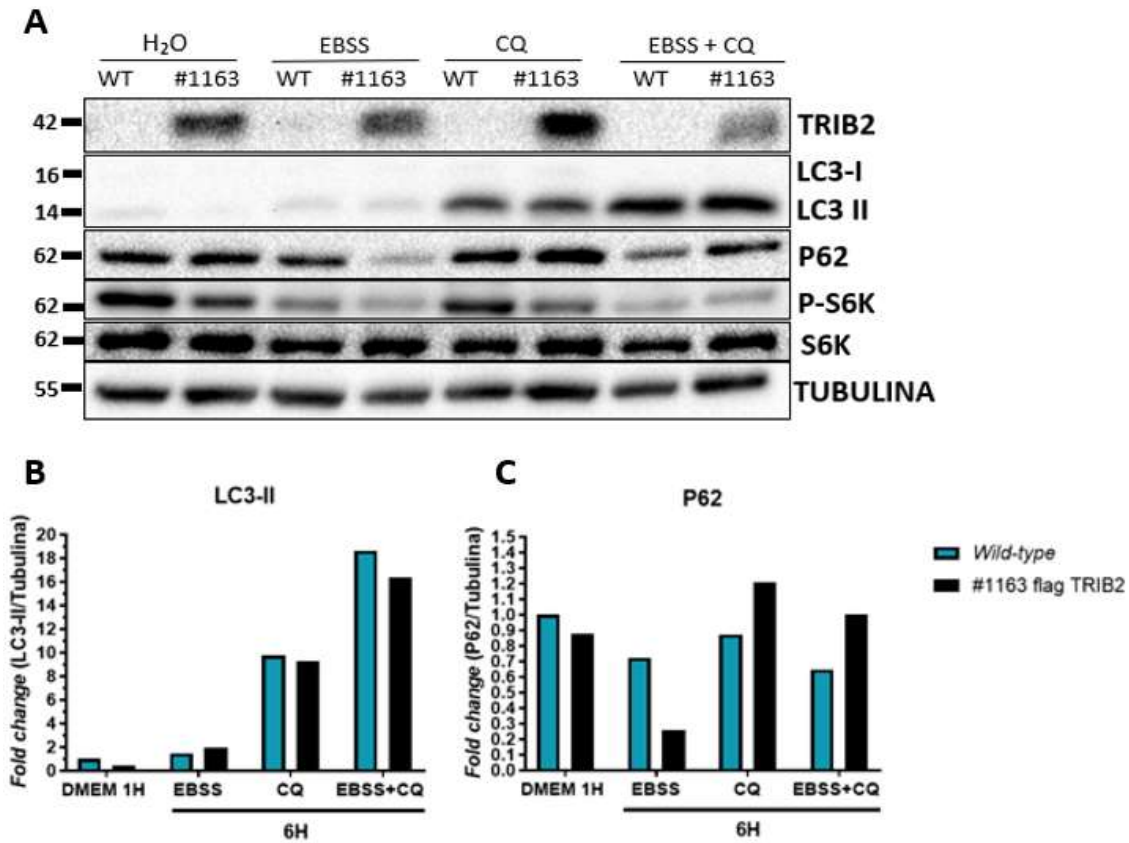
**Figura 3.9- Fluxo autofágico é alterado na presença de TRIB2 em condições de indução e bloqueio do fluxo com cloroquina.** As linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram plaqueadas 12 horas antes do início do tratamento. As células foram cultivadas com o controlo ( $\text{H}_2\text{O}$ ), EBSS, cloroquina e EBSS com cloroquina por um período de 16 horas. Após os tratamentos, as células foram recolhidas e procedeu-se à contagem celular usando o reagente *Trypan Blue* (1:2). A significância estatística foi determinada por *Sidak's multiple comparisons test*  $p\text{-value} < 0.0001$ \*\*\*\*. N=3 replicados biológicos.

Os nossos resultados demonstram que a linha celular que expressa TRIB2, foi mais vulnerável à morte celular, apresentando 60% de morte celular após tratamento com EBSS e cloroquina em comparação com 30% de morte celular induzida nas células U2OS *wild-type* (Figura 3.9). Este resultado representa uma diferença significativa entre ambas as linhas, caracterizado pelo dobro da morte celular na linha U2OS#1163. Estes dados são indicativos de

que, se TRIB2 induzir mais fluxo autofágico a inibição provocada pela cloroquina, reflete a acumulação de autofagossomas que não fundem com o lisossoma, o que se reflete nas percentagens de morte celular elevadas. No entanto, mais morte celular em células com TRIB2 pode ser indicativo de que, se TRIB2 bloquear o fluxo e uma vez que a cloroquina também bloqueia, ocorre uma dupla inibição que se reflete em mais morte celular nestas células.

### **3.8. Células com TRIB2 acumulam mais p62 e menos LC3-II em condições de indução e bloqueio do fluxo com cloroquina**

Com o intuito de perceber se a concentração a 100  $\mu$ M demonstrava diferenças mais evidentes nos marcadores autofágicos, repetiu-se a experiência em 3.4 com a concentração de cloroquina a 100 $\mu$ M (Figura 3.10). Para o efeito, as células foram expostas ao controlo contendo o veículo da cloroquina (H<sub>2</sub>O), indutor do fluxo (EBSS), inibidor do fluxo (Cloroquina) e indutor com o inibidor (EBSS com cloroquina) por um período de 6 horas de tratamento (Figura 3.10).



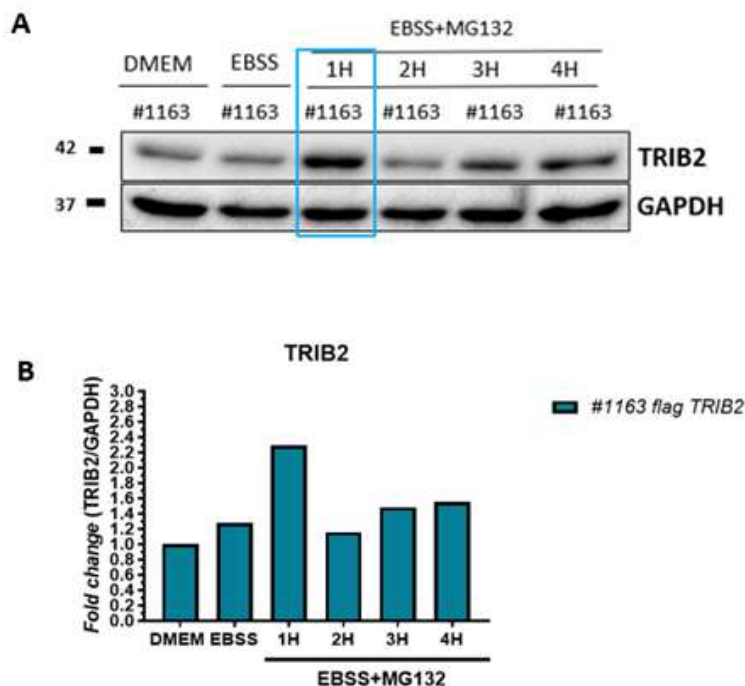
**Figura 3.10- Efeito de TRIB2 na expressão dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 após indução e bloqueio da autofagia com cloroquina a 100 $\mu$ M.** As células foram cultivadas com o controlo da cloroquina (H<sub>2</sub>O), EBSS (indutor da autofagia), cloroquina (inibidor do fluxo) e EBSS com cloroquina (indução e bloqueio da autofagia). A incubação consistiu num período de uma hora para o controlo e seis horas para os restantes tratamentos. O gel foi carregado com 80  $\mu$ g de proteína por poço. Quantificações de (B) LC3-II e (C) p62 de uma experiência independente foram normalizadas para o controlo (células *wild-type* em DMEM a uma hora). As quantificações foram normalizadas realizadas através do programa ImageJ. CQ-Cloroquina; EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*. N=1

Os nossos resultados mostram que, utilizando uma concentração de 100 $\mu$ M de cloroquina para a inibição do fluxo, observa-se maior acumulação de p62 e menor acumulação de LC3-II com a linha U2OS #1163 comparativamente com a linha U2OS *wild-type* (Figura 3.10). No entanto, quando o fluxo foi bloqueado com cloroquina a 20 $\mu$ M (Figura 3.5), verificou-se diferenças mais exacerbadas na redução da acumulação de LC3-II. Desta forma, estes dados indicam que embora o efeito de TRIB2 com as concentrações de 20 $\mu$ M e 100 $\mu$ M seja o mesmo, a concentração de 100 $\mu$ M é mais eficaz no bloqueio do fluxo autofágico.

### **3.9. Efeito do MG132 nos níveis da proteína TRIB2**

Como observado nos western-blots anteriores, os níveis da proteína de TRIB2 decrescem em condições de falta de nutrientes causada pelo EBSS. Sabe-se que TRIB2 é degradado via proteossoma, desta forma com o intuito de reduzir a degradação desta proteína via proteossoma e deste modo avaliar o seu efeito na acumulação de LC3 e p62, recorreu-se a um inibidor do proteossoma-MG132 (*Sigma Aldrich, USA*). Com o intuito de perceber se ao recuperar os níveis proteicos da nossa proteína de interesse, observamos diferenças na acumulação dos marcadores autofágicos.

Começamos por estabelecer qual o tempo com o inibidor do proteossoma para obter o efeito desejado (recuperação dos níveis de TRIB2) para uma concentração de 10 $\mu$ M, usada comumente em experiências com células cancerígenas<sup>129,130</sup>. Para esta experiência as células foram tratadas com meio completo (DMEM) e EBSS. As células foram incubadas durante seis horas em EBSS para a linha celular U2OS #1163. As células foram expostas ao MG132 por uma, duas, três e quatro horas respetivamente (Figura 3.11).



**Figura 3.11-Efeito do MG132 nos níveis da proteína de TRIB2.** As linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram incubadas durante uma, duas, três e quatro horas com o MG132 a 10  $\mu$ M em EBSS durante seis horas. Foi feito um controlo do nível de TRIB2 em EBSS e DMEM. O gel foi carregado com 60  $\mu$ g de proteína por poço. (B) A quantificação de TRIB2 de uma experiência independente foi normalizada para o controlo (DMEM a seis hora). EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*. N=1

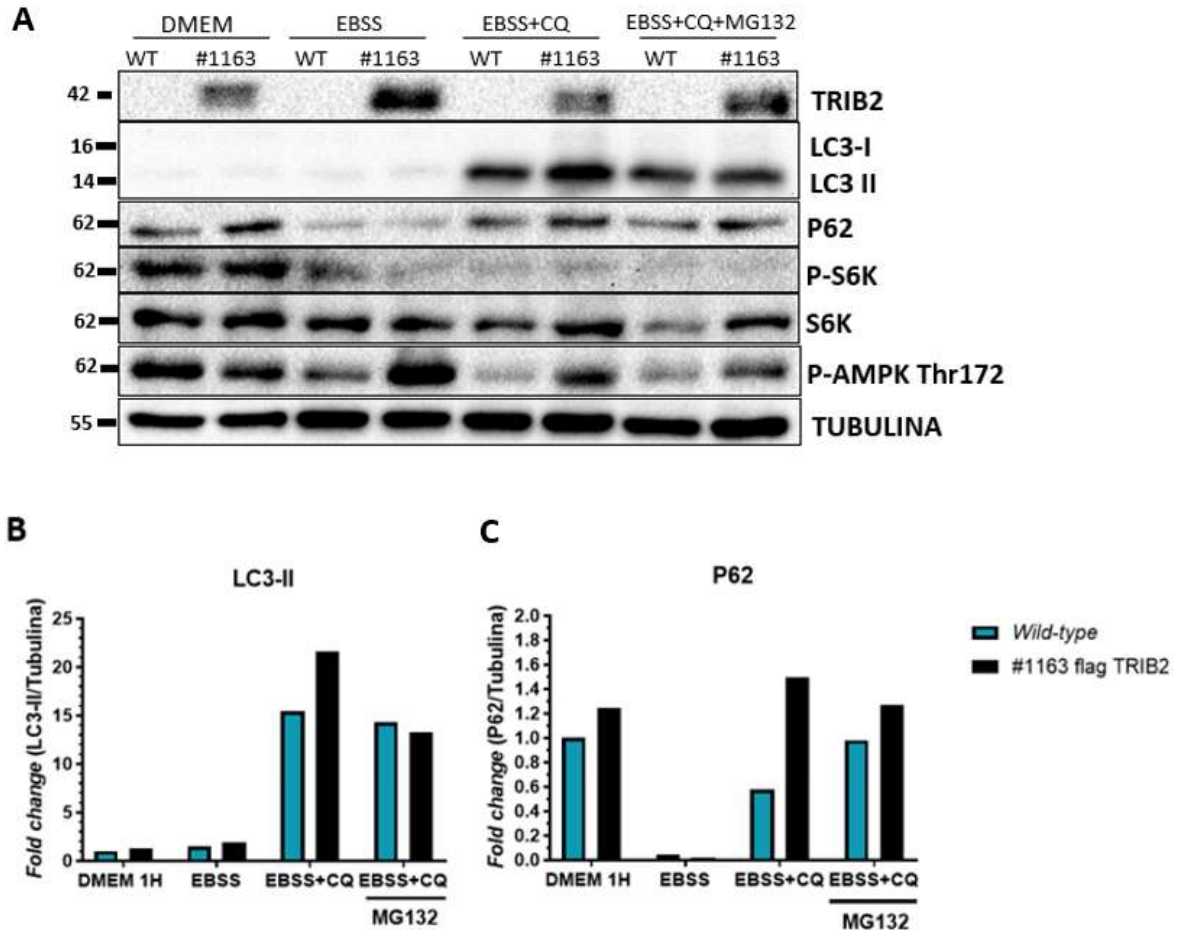
Este ensaio permitiu determinar que o tempo ideal de incubação com MG132 é de uma hora no qual se verifica níveis proteicos mais elevados de TRIB2 (Figura 3.11).

### 3.10. Expressão dos marcadores autofágicos com recuperação dos níveis de TRIB2

Uma vez estabelecido o tempo de MG132, procedeu-se à análise dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 em condições de indução (EBSS) e inibição do fluxo (cloroquina a 100  $\mu$ M) com a restauração dos níveis de TRIB2 via proteossoma.

As células U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram sujeitas a um tratamento com o controlo (DMEM), EBSS e EBSS com cloroquina. O indutor (EBSS) e o inibidor (cloroquina) foram utilizados por um período de seis horas (Figura 3.12). A última condição experimental

consistiu em EBSS com cloroquina durante o mesmo tempo de exposição e o MG132 foi utilizado durante uma hora de tratamento (Figura 3.12)



**Figura 3.12- Expressão dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 com recuperação dos níveis proteicos de TRIB2 após indução e bloqueio do fluxo autofágico.** As linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 foram incubadas com meio rico em nutrientes (DMEM), indutor do fluxo (EBSS), indução e bloqueio do fluxo autofágico (EBSS e cloroquina) e o mesmo tratamento com MG132. O tratamento para o controlo foi de uma hora e os restantes tratamentos de 6 horas. O gel foi carregado com 80 µg de proteína por poço. As quantificações de (B) LC3-II e (C) p62 foram normalizadas para o controlo (células *wild-type* em DMEM a uma hora). As quantificações foram realizadas através do programa ImageJ. MG132 10µM e Cloroquina 100µM (CQ)- EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*; DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. N=1

Os nossos resultados sugerem que contrariamente ao verificado nos *blots* anteriores (Figura 3.5 e 3.6.), não se observou redução dos níveis de TRIB2 em EBSS. No entanto, comparativamente com a terceira condição (EBSS com cloroquina), o MG132 parece ter

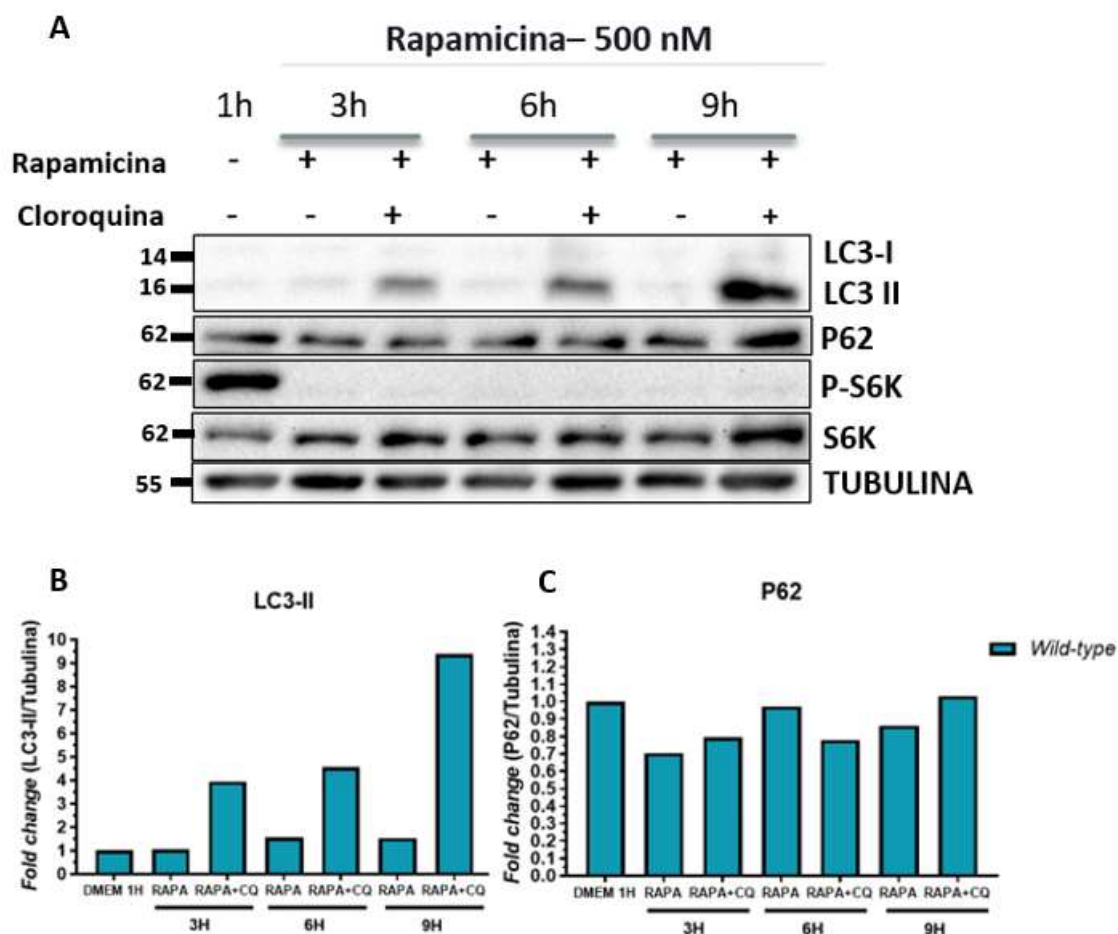
funcionado corretamente (Figura 3.12). Os marcadores autofágicos demonstraram diferenças na acumulação de LC3-II, assim como no p62 (Figura 3.12). Para ambos os marcadores autofágicos há uma redução da sua acumulação, quando as células são tratadas com MG132. Este resultado indica que a degradação de TRIB2 via proteossoma, interfere com a acumulação das nossas proteínas de interesse. A acumulação dos marcadores autofágicos é dependente de TRIB2.

### **3.11. Efeito de TRIB2 por indução a montante da via autofágica**

Um dos principais reguladores a montante da via da autofagia é a cinase mTOR que regula o metabolismo e o crescimento celular. Como supramencionado, a rapamicina tem como alvo direto o complexo 1 de mTOR, este complexo ao ser inibido diretamente, a autofagia é ativada<sup>131,132</sup>. Posto isto, fomos perceber se as diferenças observadas em LC3-II e p62 também se verificam quando a autofagia é induzida por rapamicina e inibida por cloroquina.

#### **3.11.1. Tempo estabelecido para o inibidor de mTORC1-Rapamicina**

Para a experiência com a rapamicina escolheu-se um tempo de tratamento que nos permitisse observar uma maior acumulação de p62 e LC3-II. A concentração de rapamicina foi de 500 nM, por ser comumente utilizada a esta concentração em linhas celulares cancerígenas<sup>125,131,132</sup>. Assim sendo, utilizou-se rapamicina e rapamicina com cloroquina (100 µM) durante 3, 6 e 9 horas em meio suplementado (DMEM). Todos os tratamentos foram realizados na linha U2OS *wild-type* (Figura 3.13).

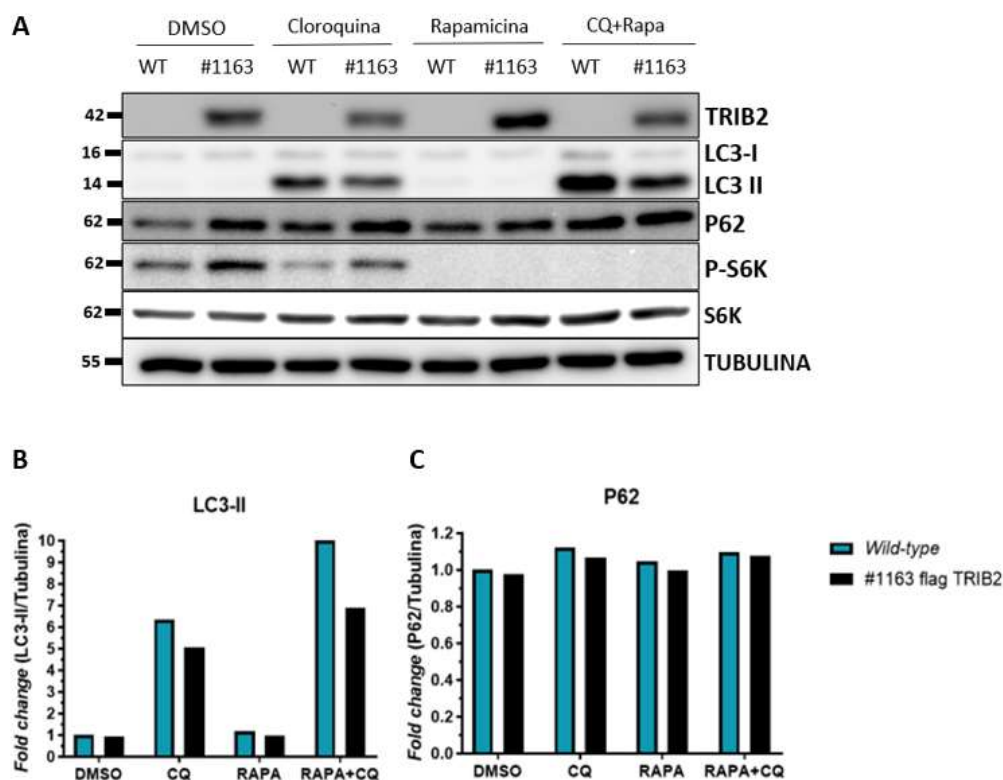


**Figura 3.13-Estabelecimento do tempo para a indução da autofagia com rapamicina.** A linha celular U2OS *wild-type* foi tratada com, cloroquina a 100 $\mu$ M, rapamicina a 500 nM e cloroquina com rapamicina nas mesmas concentrações durante um período de 3, 6 e 9 horas. O gel foi carregado com 80  $\mu$ g de proteína por poço. As quantificações de (B) LC3-II e (C) p62 de uma experiência independente foi normalizada para o controlo (células *wild-type* em DMEM a 1 hora). As quantificações foram realizadas através do programa ImageJ e os gráficos foram gerados no GraphPad. CQ-cloroquina; Rapa-rapamicina; DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. N=1.

Os nossos resultados mostraram que não há diferenças na expressão de p62 entre os diferentes tempos de incubação com o inibidor de mTORC1 (Rapamicina) (Figura 3.13 C), no entanto há maior acumulação de LC3-II às 9 horas de exposição das células com o indutor e inibidor do fluxo, Rapamicina e cloroquina respetivamente. Desta forma, o tempo de tratamento com o inibidor de mTORC1(Rapamicina) selecionado foi de 9 horas.

### 3.11.2. Impacto de TRIB2 na expressão dos marcadores autofágicos após o tratamento com rapamicina e cloroquina

Com o objetivo de perceber qual o efeito de TRIB2 na expressão dos marcadores autofágicos e uma vez que EBSS pode interagir com outras vias dependentes de nutrientes, induziu-se a via da autofagia através do tratamento com rapamicina. Para o efeito, nesta experiência as células foram tratadas com o inibidor do fluxo autofágico (cloroquina a 100  $\mu$ M), rapamicina a 500 nM e como última condição rapamicina com cloroquina nas mesmas concentrações. Para as três últimas condições os tratamentos foram de 9 horas (Figura 3.14).



**Figura 3.14-Análise dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 após indução do fluxo autofágico com rapamicina e inibição com cloroquina.** A incubação das linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 consistiu num período de uma hora no controlo com DMSO e nove horas nos restantes tratamentos em meio suplementado (DMEM). Foram utilizadas três condições, cloroquina a 100 $\mu$ M, rapamicina a 500 nM e cloroquina com rapamicina nas mesmas concentrações. O gel foi carregado com 80  $\mu$ g de proteína por poço. As quantificações de (B) LC3-II e (C) p62 de um replicado biológico foi normalizada para o controlo (células *wild-type* em DMEM a 1 hora). As quantificações foram realizadas através do programa ImageJ e os gráficos foram gerados no GraphPad. Cloroquina 100 $\mu$ M (CQ); Rapamicina 500 nM (RAPA); DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. N=1.

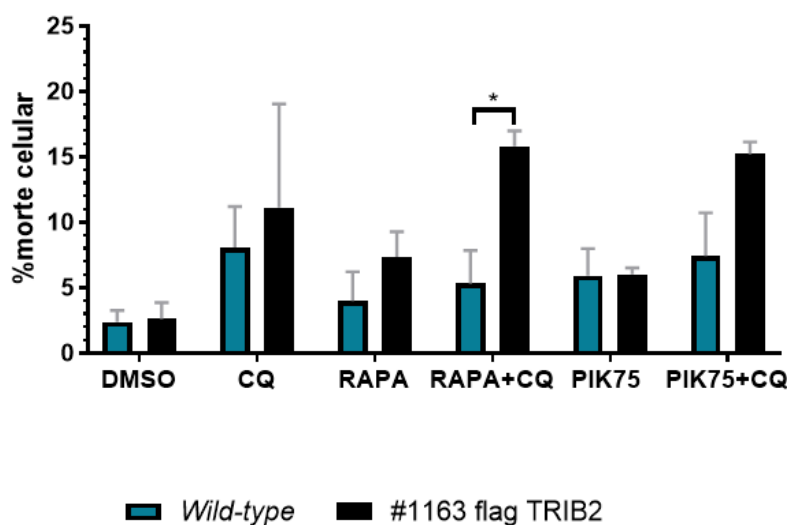
Os nossos resultados sugerem que quando o fluxo autofágico foi induzido com rapamicina e bloqueado com cloroquina, observou-se maior acumulação de LC3-II, comparativamente com a linha *wild-type* (Figura 3.14 A e B). Relativamente ao marcador autofágico p62, era esperado observar-se maior acumulação em células com TRIB2, para as mesmas condições. No entanto, não se observaram diferenças neste marcador entre as linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 (Figura 3.14 C).

A menor acumulação de LC3-II em condições de indução com rapamicina e bloqueio do fluxo com cloroquina em células com TRIB2, também foi observada quando o fluxo autofágico foi induzido com o EBSS e bloqueado com a cloroquina (Figura 3.5). Se TRIB2 induzir o fluxo autofágico, menor acumulação de LC3-II é indicativo de que a taxa de produção e degradação de autofagossomas é superior à linha *wild-type* e deste modo quando se inibe o fluxo, observa-se menos. No entanto, menos LC3-II pode ser indicativo de que estas células produzem menos autofagossomas e desta forma TRIB2 poderá estar a bloquear o fluxo autofágico.

### **3.12. Células com TRIB2 são mais vulneráveis à morte celular quando o fluxo é induzido com Rapamicina e PIK75 e inibido com cloroquina**

Como descrito anteriormente, a autofagia é uma via de sobrevivência celular. Quando a autofagia é inibida, acumulam-se autofagossomas que são produzidos, mas não são degradados. A acumulação de autofagossomas leva à que as células optem pela morte celular. Sabe-se que TRIB2 induz menos morte celular, conferindo sobrevivência às células cancerígenas. Dados anteriores de ensaios de morte celular, demonstraram que células com TRIB2 são mais suscetíveis à morte celular (Figura 3.9). Desta forma, fomos analisar se esse efeito se mantém quando a autofagia é induzida através da rapamicina (inibidor de mTOR) e PIK75 (inibidor da subunidade p110 de PI3K) e inibida por cloroquina. Para tal as condições foram: controlo com o veículo da rapamicina e de PIK75, cloroquina (100  $\mu$ M), rapamicina a (500 nM), rapamicina com cloroquina, PIK75 (100nM) e PIK75 com cloroquina. O tempo estabelecido para esta experiência foi de 16 horas (Figura 3.15).

Foram feitos dois ensaios independentes e avaliou-se o significado estatístico das percentagens de morte celular entre as linhas U2OS *wild-type* e U2OS#1163 (Figura 3.15).



**Figura 3.15-Análise estatística da indução de autofagia por rapamicina e PIK75 com inibição por cloroquina em células com TRIB2 (U2OS #1163).** As linhas celulares U2OS parental e U2OS com TRIB2 (#1163) foram plaqueadas 12 horas antes do tratamento. As células foram tratadas com o controlo (DMSO), cloroquina, rapamicina, cloroquina com rapamicina, PIK75 e PIK75 com cloroquina. A cloroquina foi utilizada a uma concentração de 100  $\mu$ M, rapamicina a 500nM e PIK75 a 100nM; DMSO-dimetilsulfóxido; CQ-cloroquina; RAPA-rapamicina. Para todos os tratamentos utilizou-se DMEM. Após 16 horas as células foram colhidas e contadas em uma câmara de Neubauer. O ensaio de morte celular foi realizado com *Trypan Blue* (1:2). Os resultados representam a média gerada a partir de três ensaios independentes. A significância estatística foi determinada por *Sidak's multiple comparisons test*  $p$ -value <0.05\*. N=2 replicados biológicos.

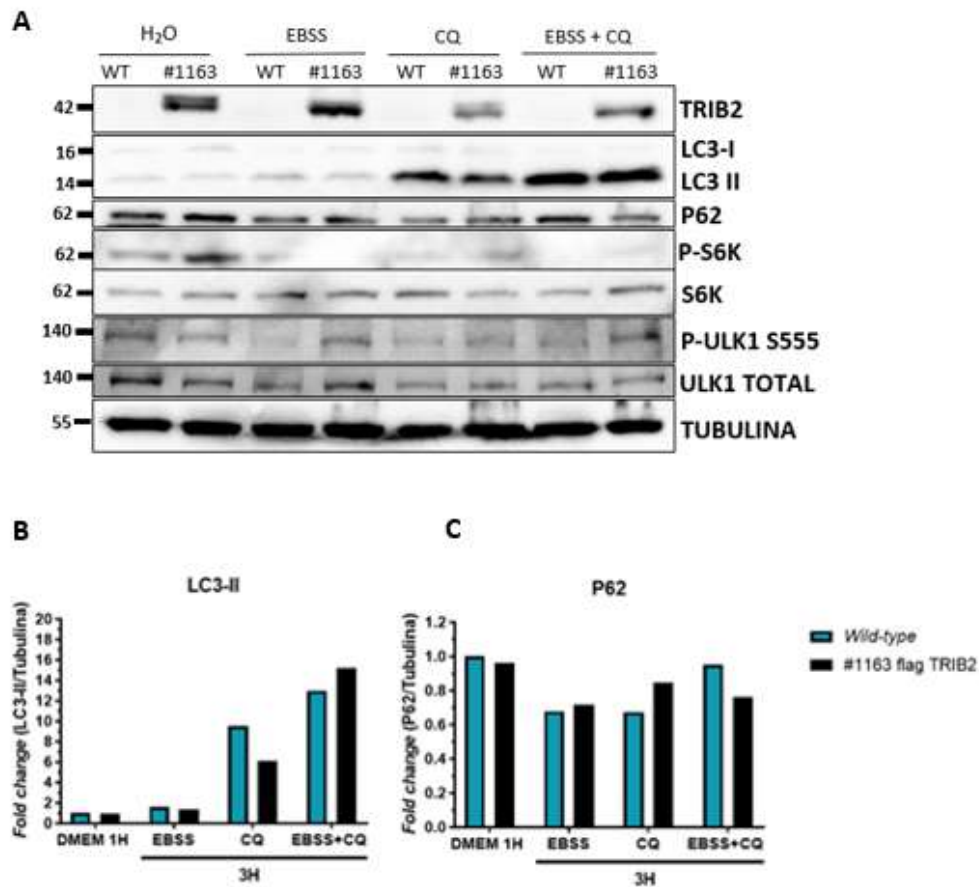
Os nossos resultados sugerem que às 16 horas de tratamento, a linha contendo TRIB2 foi mais vulnerável à morte celular, apresentando maior percentagem de morte celular (16%) em comparação à linha *wild-type* (5%) para o tratamento com rapamicina (500nM) e cloroquina a 100  $\mu$ M (Figura 3.15). Para a condição com PIK75 e cloroquina, embora se observem diferenças entre a linha com TRIB2 (15%) e a linha celular que não expressa TRIB2 (7%), os dados não são estatisticamente significativos (Figura 3.15). Considerando estes dados e uma vez que a autofagia é uma via de sobrevivência celular, este ensaio demonstra que ao inibir este fluxo, na presença de TRIB2 as células sobrevivem menos. TRIB2 poderá estar a induzir o

fluxo autofágico, produzindo mais autofagossomas que não se fundem com os lisossomas e desta forma estas células morrem mais. Contudo, TRIB2 também poderá ter um papel de inibidor do fluxo. Uma vez que a autofagia é bloqueada pela cloroquina e pelo TRIB2, ocorre uma dupla inibição, refletindo-se em mais morte celular.

### **3.13. TRIB2 altera o fluxo autofágico às 3 horas de tratamento**

A análise dos níveis de expressão de mRNA de genes autofágicos, demonstrou que a linha que não sobreexpressa TRIB2 (U2OS *wild-type*) tem maior expressão de genes que controlam o fluxo autofágico, comparativamente com a linha com sobreexpressão de TRIB2 (U2OS #1163) (Figura 3.3). Esta diferença indica que células que sobreexpressam TRIB2 não conseguem induzir a autofagia com a mesma eficiência que células que não expressam TRIB2. Desta forma, decidimos analisar os níveis de proteína dos marcadores autofágicos, LC3-II e p62 por meio de Western-blot.

Repetimos as experiências da Seccção 3.4 e 3.7 e tratamos as linhas U2OS *wild-type* e U2OS #1163 com EBSS de modo a induzir o fluxo autofágico, com cloroquina que permite inibir a via autofágica e tratamento conjunto de EBSS com cloroquina para induzir e bloquear a autofagia (Figura 3.16).



**Figura 3.16-Análise da expressão de LC3-II e p62 após indução da autofagia e bloqueio com cloroquina às 3 horas de tratamento.** As linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163, foram cultivadas em meio rico em nutrientes, meio com privação de nutrientes (EBSS), inibidor do fluxo (CQ) e indução e bloqueio do fluxo (EBSS+CQ). Os períodos de incubação consistiram em uma hora no controlo e seis horas nos restantes tratamentos. O gel foi carregado com 60 µg de proteína por poço. Quantificações de (B) p62 e (C) LC3-II de uma experiência, normalizada para o controlo (Células *Wild-type* em DMEM a 1 hora). A concentração de cloroquina para o bloqueio da autofagia foi de 100 µM. CQ-cloroquina; EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*; DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. N=1 replicados biológicos.

Nesta experiência era esperado observar-se a acumulação dos marcadores autofágicos em EBSS com cloroquina (EBSS+CQ), que estão a ser degradados quando induzimos apenas o fluxo autofágico (EBSS). Os nossos resultados demonstraram que após tratamento com EBSS e cloroquina ocorre maior acumulação LC3-II, de cerca de 2 vezes, e menor acumulação de p62 na linha U2OS #1163 que sobrepresa TRIB2 em comparação com a linha celular U2OS *wild-type*. Estes resultados são consistentes com os níveis de expressão de ARN mensageiro (Figura

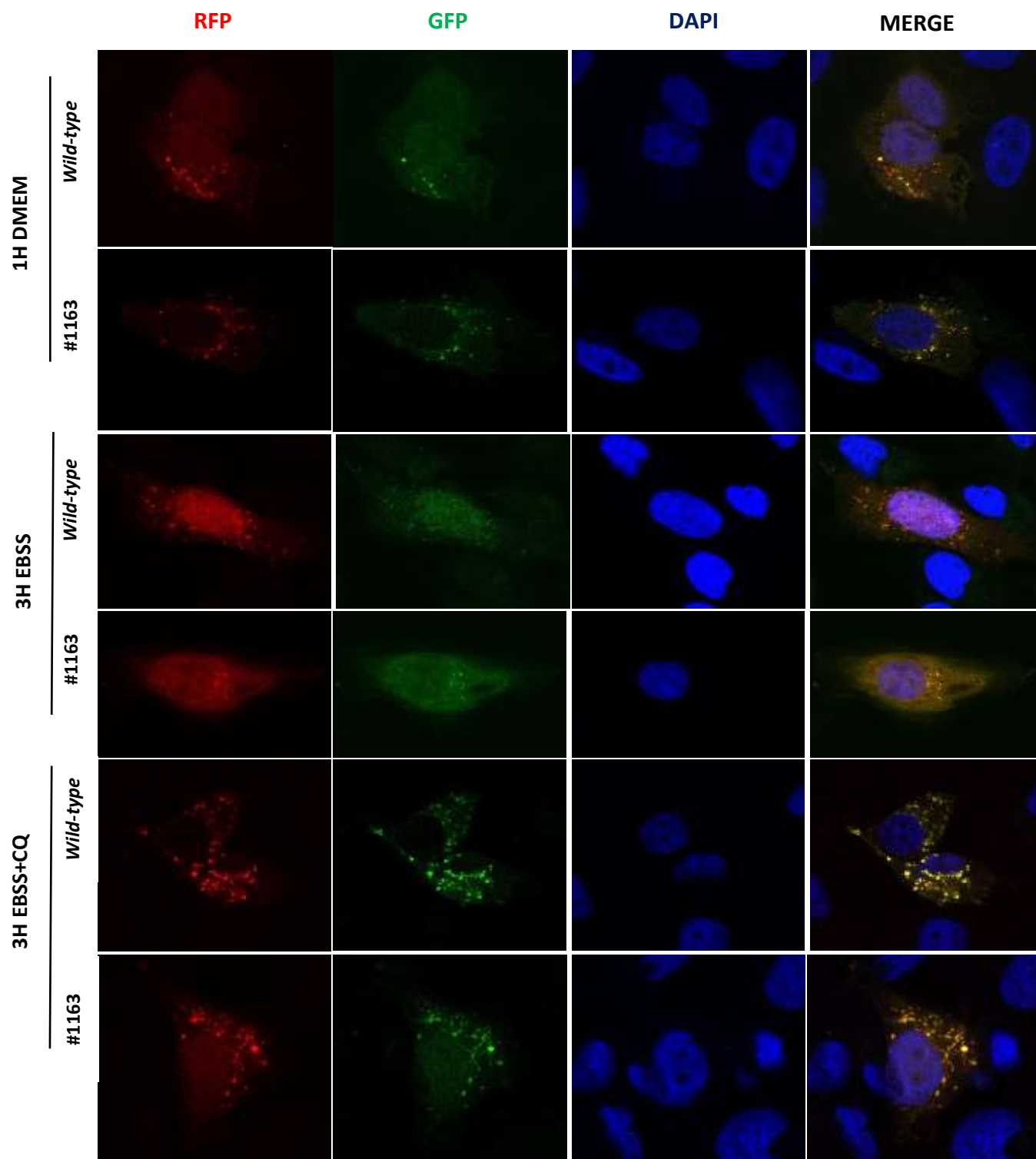
3.3), em que níveis elevados de TRIB2 estão associados a níveis de SQSTM1 (p62) inferiores. Este dado sugere que o fluxo pode estar a ser induzido em células com TRIB2, uma vez que maior acumulação de LC3-II é indicativo de maior produção de autofagossomas e menor acumulação de p62 indução do fluxo. Por outro lado, maior acumulação de LC3-II pode indicar maior acumulação de autofagossomas e menor acumulação de p62, menor produção desta proteína.

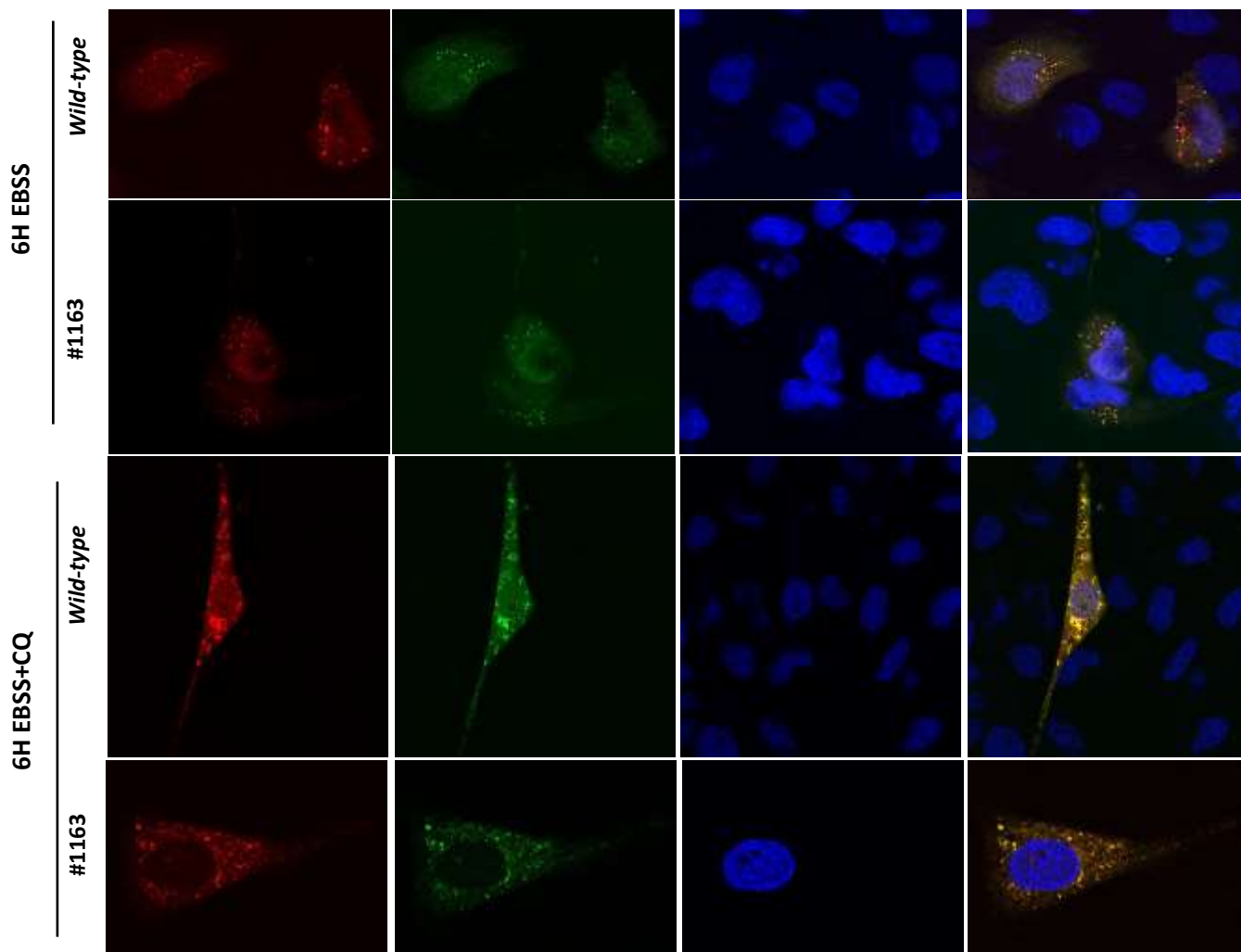
Em síntese, os nossos dados por *Western-blot* não nos permitem corroborar ou refutar a nossa hipótese, pelo que decidimos analisar o fluxo autofágico através do repórter RFP-GRP-LC3.

### **3.14. Células com TRIB2 acumulam mais autofagossomas em condições basais e de indução do fluxo autofágico**

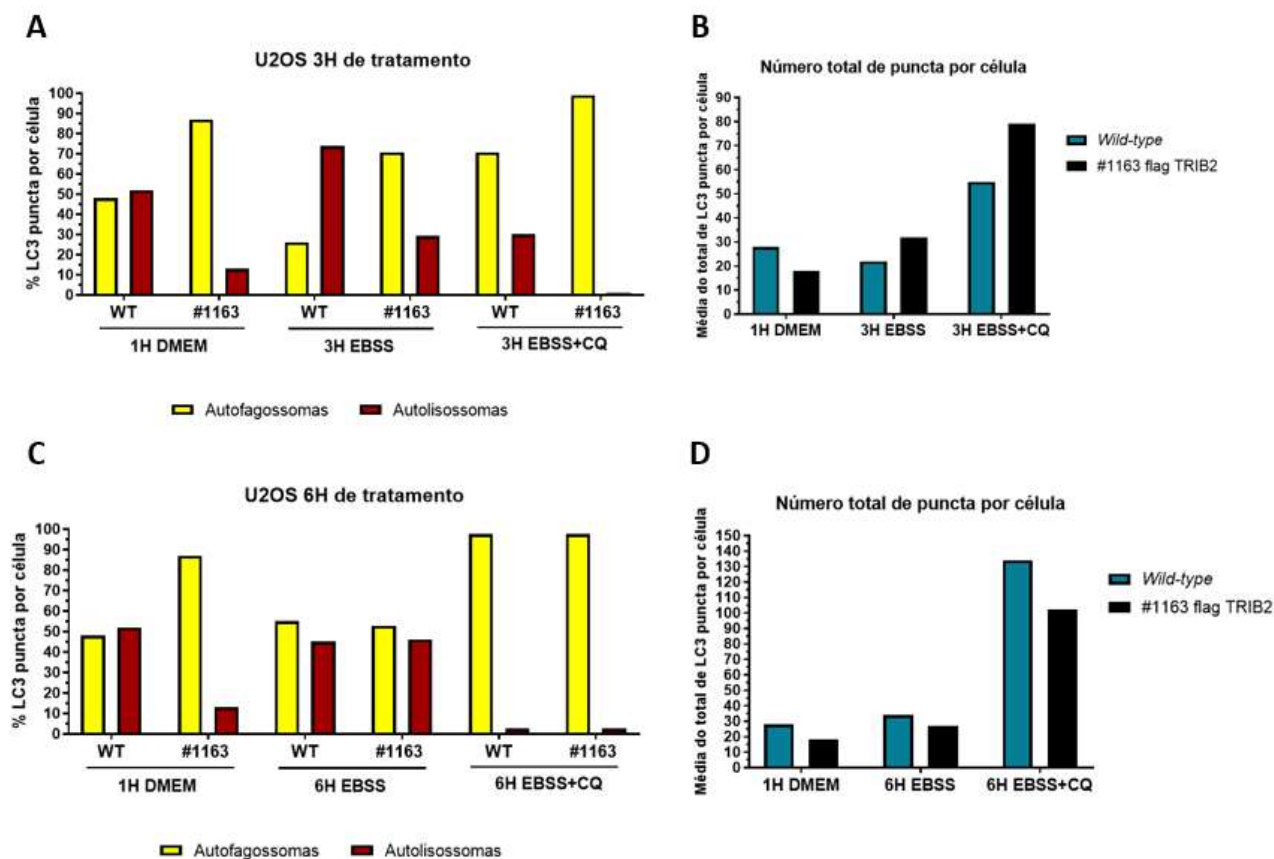
Os nossos dados por *Western-blot*, demonstrados na secção 3.4, 3.7 e 3.13, não nos permitiram concluir o efeito de TRIB2 na autofagia, uma vez que a análise dos marcadores autofágicos LC3-II e p62 podem indicar que células com sobreexpressão de TRIB2, induzem ou reprimem a autofagia. No entanto, a análise por RT-qPCR revelou que células com TRIB2 apresentam níveis reduzidos da expressão de genes autofágicos. Deste modo, com o intuito de perceber se níveis elevados de TRIB2, reprimem a autofagia, decidimos analisar o fluxo autofágico através do repórter RFP-GFP-LC3 e da microscopia de fluorescência. Após a indução da autofagia, em células transfectadas com este plasmídeo, o autofagossoma funde com o lisossoma e o ambiente torna-se ácido perdendo-se o sinal de GFP e mantendo-se o sinal vermelho de RFP. Desta forma, em condições de indução do fluxo é espectável que se observe maior número de punctas vermelhos, que é indicativo de que o fluxo autofágico está a decorrer. Por outro lado, quando ocorre a indução e inibição do fluxo através de um inibidor lisossomal como a cloroquina, é esperado que o número de autofagossomas que está a ser formado, em condições de indução, se acumule e desta forma se observe mais punctas amarelos.

De modo a analisar o efeito da sobreexpressão de TRIB2 na indução do fluxo autofágico, transfetararam-se as linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 com o plasmídeo RFP-GFP-LC3 e as células foram tratadas com EBSS, para induzir a autofagia e EBSS com o inibidor do fluxo autofágico-cloroquina.





**Figura 3.17-Análise por imunofluorescência do fluxo autofágico nas linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163.** As células foram transfetadas no dia anterior ao tratamento com o plasmídeo RFP-GFP-LC3. Os tratamentos consistiram no controlo (DMEM), meio de indução do fluxo (EBSS) e indução e bloqueio do fluxo (EBSS com cloroquina). As lamelas foram fixadas e os puncta foram observados ao microscópio confocal. A análise e tratamento destas imagens tal como as contagens dos respetivos “puncta” foram efectuados no *Software ZEN 3.2 (Lite) (ZEISS)*. Foram adquiridas 100 imagens por condição. Células com TRIB2 apresentam mais puncta amarelos, que refletem mais autofagossomas para condições basais e de indução do fluxo. EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*; DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; CQ=Cloroquina. N=1.



**Figura 3.18-Quantificação dos GFP-RFP-LC3 puncta e número médio total de puncta por célula para as linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS#1163 às 3 e 6 horas de tratamento com EBSS.** Gráficos representativos da % LC3 puncta por célula nas linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 às (A) 3 horas e (C) 6 horas de tratamento. Gráficos representativos do número médio total de puncta por célula para ambas as linhas celulares às (B) 3 horas e (D) 6 horas de tratamento. As células foram transfectadas no dia anterior ao tratamento com o plasmídeo RFP-GFP-LC3. Os tratamentos consistiram no controlo (DMEM 1H), EBSS e EBSS com cloroquina. O tempo de incubação utilizado foi de 3 e 6 horas. As lamelas foram fixadas e os puncta foram observados ao microscópio confocal. Foram contadas 100 células por condição. O número médio de punctas GFP-RFP e RFP foi convertido em percentagem. Foi realizado uma média do número total de puncta por célula. N=1

O número médio total de LC3 puncta por célula foi calculado, com o intuito de perceber se é induzida mais ou menos autofagia em cada linha celular. A nível basal a linha *wild-type* apresenta um número total de puncta de 28 por célula, enquanto a linha que sobreexpressa TRIB2 (U2OS #1163), revelou um número médio menor de 18 (Figura 3.17 e Figura 3.18 B). Este dado parece sugerir que células com TRIB2 fazem menos autofagia ao nível basal. No entanto, quando o fluxo foi induzido o número de punctas para a linha *wild-type* subiu para 22 enquanto a linha #1163 indicou 32 puncta (Figura 3.17 e Figura 3.18 B). Para a condição de indução e bloqueio da autofagia, ambas as linhas demonstraram cerca do dobro do número de

punctas (55 para U2OS *wild-type* e 79 para U2OS #1163) em comparação com a condição de indução (Figura 3.17 e Figura 3.18 B). Este resultado, consistentemente com as percentagens de autofagossomas, indicam-nos que o bloqueio está a ser eficiente, uma vez que os autofagossomas que são produzidos numa condição de indução acumulam-se.

O número médio de punctas não é suficiente para concluir, se ocorre mais ou menos fluxo autofágico, deste modo foram analisadas as percentagens de autofagossomas e autolisossomas para cada condição em ambas as linhas celulares.

Os nossos resultados mostraram que com a condição de meio rico em nutrientes, a linha *wild-type*, apresenta aproximadamente 48% de autofagossomas e 52% de autolisossomas caracterizado por um número de punctas total de 18 (Figura 3.18 A e B). No entanto, a linha U2OS #1163, indica 87% de autofagossomas e 12% de autolisossomas (Figura 3.17 e Figura 3.18 A). Nesta condição é esperado que o fluxo seja contínuo e deste modo o número de autofagossomas e lisossomas não diferem. Contudo, células que sobreexpressão TRIB2, têm um número muito superior de autofagossomas que é caracterizado por 18 punctas por célula (Figura 3.18 B), este dado revela que estas células têm uma repressão na autofagia basal, em comparação com as células que não sobreexpressam TRIB2 (U2OS *wild-type*).

Na condição de indução do fluxo, após 3 horas de tratamento, a linha U2OS *wild-type*, mostra uma percentagem de aproximadamente 26% de autofagossomas e 74% de autolisossomas (Figura 3.18 A). Estes dados demonstram indução do fluxo autofágico, uma vez que é esperado elevadas percentagens de autolisossomas, indicativos de que os autofagossomas fundem com os lisossomas e desta forma o fluxo é contínuo. Porém, para a mesma condição de indução, a linha celular U2OS #1163, mostra aproximadamente 70% de autofagossomas e 13% de autolisossomas (Figura 3.17 e Figura 3.18 A). Esta observação indica que numa condição de indução, células com TRIB2 promovem maior acumulação de autofagossomas e desta forma reprimem o fluxo autofágico, refutando a nossa hipótese. O número de punctas por célula também valida que a linha *wild-type* têm o fluxo contínuo, caracterizado pelo menor número de punctas (22) em comparação com a linha #1163 que apresenta maior número de punctas (32), representativo da acumulação de autofagossomas (Figura 3.18 C)

Quando o fluxo é induzido e posteriormente inibido com cloroquina, é espectável que os autofagossomas que estão a ser produzidos numa condição de indução, se acumulem e desta forma se observem mais punctas amarelos. A linha celular *wild-type* mostra aproximadamente 70% de autofagossomas e 30% de autolisossomas. Por outro lado, a linha celular U2OS #1163 indica aproximadamente 95% de autofagossomas e 5% de autolisossomas (Figura 3.17 e Figura

3.18 A). Este dado em conjunto com o número médio de punctas por célula, caracterizado pelo dobro do número de punctas em comparação com a indução, revela que está a ocorrer um bloqueio do fluxo. No entanto, este efeito é mais exacerbado na linha que sobreexpressa TRIB2 porque estas células inibem a indução e desta forma acumulam muito mais autofagossomas.

Decidimos também analisar o fluxo autofágico às 6 horas de tratamento com EBSS, uma vez que não só foi o tempo eleito para a análise dos marcadores autofágicos por *Western-blot*, como também nos permite perceber se estas linhas celulares apresentam o mesmo efeito que as 3 horas de tratamento a nível da autofagia.

Após 6 horas de indução do fluxo autofágico, ambas as linhas celulares U2OS *wild-type* e U2OS #1163 apresentam uma percentagem autofagossomas de aproximadamente 55% e 45% de autolisossomas (Figura 3.17 e 3.18 C) Para a mesma condição experimental, estas linhas celulares também revelaram aproximadamente o mesmo número de punctas por célula, caracterizado por 34 punctas para a linha *wild-type* e 27 na linha #1163 (Figura 3.18 D). Quando o fluxo foi induzido e inibido com cloroquina, observa-se 98% de autofagossomas e 2% de autolisossomas para ambas as linhas celulares (Figura 3.18 C) e o número médio de punctas na linha celular U2OS *wild-type* é de 134 e 102 na linha U2OS #1163.

Estes dados foram interessantes, uma vez que a linha *wild-type* responde da mesma forma que a linha que sobreexpressa TRIB2 (U2OS #1163) às 6 horas de tratamento, o que não era esperado. Os mesmos dados também sugerem que estas linhas celulares respondem rapidamente à indução da autofagia, demonstrando um efeito após 3 horas de tratamento.

## 4 DISCUSSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A autofagia é um processo catabólico intracelular que responde a condições de stress metabólico como privação de nutrientes, baixo níveis de energia e hipóxia<sup>39-42</sup>. Este mecanismo atua como supressor ou promotor tumoral dependendo do estádio do tumor<sup>56,59,63</sup>. Em fases iniciais do desenvolvimento do tumor, a autofagia responde ao stress proveniente do microambiente tumoral, diminuindo a acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e garantindo a estabilidade do genoma. Em estádios mais avançados do tumor este mecanismo promove a sobrevivência de células cancerígenas, respondendo às elevadas exigências metabólicas e energéticas. A morte celular por autofagia é vantajosa para células tumorais que apresentam resistência adquirida à apoptose, uma vez que a autofagia é uma via de sobrevivência celular. Por outro lado, elevados níveis de autofagia conferem resistência a compostos utilizados na clínica, por esta via promover a sobrevivência celular das células cancerígenas<sup>60,66,69,73</sup>.

Uma das vias de sinalização mais ativas no contexto tumoral, é a via de PI3K/Akt. Esta via, quando ativada, regula positivamente a cinase mTORC1 (Figura 1.3). Por sua vez, mTORC1 fosforila ULK1 (cinase responsável por induzir o processo autofágico) na serina 757, o que resulta na inibição do fluxo autofágico<sup>85</sup> (Figura 1.10).

No laboratório estamos interessados em desvendar a contribuição da pseudocinase TRIB2 na progressão tumoral e como mecanismo de resistência a terapias. TRIB2 faz parte de uma família de pseudocinases que engloba TRIB1 e TRIB3. Nos últimos anos, vários trabalhos demonstraram o papel da expressão de TRIB3 na modulação da autofagia. Os dados publicados até ao momento, demonstraram que TRIB3, favorece a inibição do processo autofágico em determinados contextos celulares<sup>109-111,113</sup>. TRIB3 regula negativamente este processo através da ligação direta a p62, impossibilitando a entrega dos substratos ubiquitinados a LC3-I na membrana do autofagossoma<sup>109,110</sup>. Uma vez que a célula não consegue degradar e reciclar os substratos ubiquitinados, ocorre a acumulação de p62 a nível celular, promovendo a progressão do tumor (Figura 1.12)<sup>109,112,113,133</sup>.

Vários artigos científicos confirmam que TRIB2 funciona como um oncogene em vários contextos tumorais<sup>92,93,101,102</sup>. Adicionalmente, dados do nosso laboratório e de outros

laboratórios demonstraram que elevados níveis desta proteína conferem resistência a vários fármacos comprometendo a sua eficácia<sup>106</sup>. Tendo estes dados em consideração, a nossa hipótese é que TRIB2 atua na sobrevivência e resistência destes tumores induzindo o processo autofágico.

Está descrito que em determinados contextos tumorais as proteínas TRIB3 e TRIB2 compensam a função uma da outra. Por este motivo e uma vez que a relação entre a família dos TRIBBLES não é muito explorada, decidimos analisar os níveis de expressão dos TRIBBLES para diferentes tempos de exposição a meio com privação de nutrientes, de forma a perceber se estes genes são afetados por este tratamento. Os nossos dados demonstraram que a expressão dos TRIBBLES aumenta progressivamente com os tempos de tratamento em EBSS (Figura 3.1). No entanto, às três horas de tratamento TRIB1 e TRIB3 na linha *wild-type* revelaram níveis de expressão mais elevados (Figura 3.1). Porém, não se observou compensação génica entre estes membros. Do ponto de vista biológico os TRIBBLES são modulados a nível transcrricional pela falta de nutrientes.

Decidimos analisar se os níveis de expressão destes genes se refletiam nos níveis de proteína para as mesmas condições experimentais. Os nossos resultados mostraram que a expressão das proteínas TRIB1 e TRIB3 é cíclica ao longo dos tratamentos com meio com privação de nutrientes (Figura 3.2). Assim, a expressão génica dos TRIBBLES não é traduzida em níveis equivalentes de proteína.

A autofagia é regulada através de modificações pós-translacionais que ocorrem num conjunto de proteínas que coordenam todo o fluxo desde a formação do autofagossoma até à fusão com o lisossoma. No entanto, em 2021, foi descrito que este processo também é regulado a nível do RNA, e que o RNA destes genes é sobre-expresso aquando indução da autofagia<sup>132</sup>. A fim de perceber se a modulação destes genes também é afetada em células com TRIB2, decidimos analisar a expressão de genes que estão descritos na literatura como genes associados à ativação da autofagia<sup>132</sup>. Analisamos a expressão de PINK1, SQSTM1, UVRAG, NBR1, ULK1 e ULK2. Os nossos dados demonstraram que a linha celular U2OS #1163 que sobre-expressa TRIB2 apresenta níveis de expressão de genes autofágicos inferiores à linha celular U2OS *wild-type* e estas diferenças foram mais evidentes para três horas de tratamentos com EBSS (Figura 3.3). Curiosamente, após seis horas de incubação em EBSS (tempo otimizado para analisar os marcadores autofágicos), não verificamos diferenças entre as linhas celulares para a expressão dos genes autofágicos. Este dado foi indicativo de esta linha celular responde rapidamente à indução da autofagia.

De modo a analisar a contribuição de TRIB2 na modulação do processo autofágico usámos as linhas celulares isogénicas U2OS wild-type (sem expressão de TRIB2) e U2OS #1163 (sobreexpressa TRIB2). Verificámos que a presença de TRIB2 leva à acumulação de LC3-I e p62 em condições ricas em nutrientes (Figura 3.5 e 3.6), onde as células não estão expostas a qualquer tipo de stress. Esta observação sugere que TRIB2 interage com a autofagia ao nível basal nesta linha celular. De acordo com a literatura, a acumulação de LC3-I e p62 indica que o fluxo está a ser reduzido<sup>41,45,110,122</sup>. Do ponto de vista do tumor, a autofagia em fases iniciais recicla organelos e proteínas que estão defeituosas de acordo com os insultos do microambiente tumoral durante a tumorigénese<sup>56,59,60</sup>. Os nossos dados sugerem que elevados níveis de TRIB2 contribuem para a inibição da autofagia em condições em que as células não se encontram em stress. Para mimetizar as condições de privação de nutrientes que ocorrem durante o desenvolvimento do tumor, nomeadamente no interior da massa tumoral, induzimos o fluxo autofágico ao cultivar as células em EBSS (meio com privação de nutrientes). Nestas condições, não observamos nenhuma acumulação dos marcadores para ambas as linhas celulares, o que era expectável porque as células estão a ser forçadas a fazer mais autofagia e, portanto, estão a degradar o que está a ser produzido (Figura 3.4 e 3.5). Curiosamente, observamos que o tratamento com EBSS, reduz os níveis de TRIB2, o que sugere que esta proteína está a ser consumida ou degradada em condições de privação de nutrientes (Figura 3.5 e 3.6).

Para perceber se TRIB2 é responsável por bloquear a autofagia, como verificamos em condições ricas em nutrientes, procedemos à inibição da via autofágica. Tratamos as células com cloroquina por ser um dos compostos mais utilizados na literatura para avaliar o fluxo autofágico. A cloroquina inibe o fluxo autofágico no momento da fusão do autofagossoma com o lisossoma através do aumento do pH lisossomal<sup>134,135</sup>. Os nossos dados demonstram que, quando o fluxo é induzido e posteriormente bloqueado pela ação da cloroquina, observa-se maior acumulação de p62 comparativamente com a linha sem TRIB2. Esta acumulação reflete o que está a ser produzido e degradado em condições de privação de nutrientes (EBSS) (Figura 3.4, 3.5 e 3.10). Contrariamente, temos menos acumulação de LC3-II na presença de TRIB2. De acordo com a literatura, esta menor acumulação de LC3-II pode significar menor produção de autofagossomas<sup>39,41,122-124</sup>. O facto de observarmos mais p62 é indicativo de que TRIB2 está a promover maior acumulação de p62 em comparação com células sem TRIB2. Esta análise dos marcadores autofágicos pode sugerir, de acordo com a literatura uma inibição do fluxo autofágico. Por outro lado, menor acumulação de LC3-II e maior acumulação de p62 podem

querer significar que a taxa de produção e degradação de autofagossomas em células que sobreexpressam TRIB2 é maior e portanto, quando se bloqueia vê-se menos.

Tratamos as células com dois compostos descritos na literatura, o SBI-0206965 e a Spautina-1 que inibem respetivamente ULK1 e Beclin-1 nas primeiras fases do fluxo respetivamente<sup>125-128</sup> (Figura 1.5). Os nossos resultados demonstraram que estes inibidores modulam os níveis de TRIB2 (Figura 3.6) à semelhança do que ocorre com o tratamento com EBSS. O ULK1 é um substrato direto de mTORC1 e de AMPK. Em condições ricas em nutrientes, mTORC1 torna-se ativo e inibe ULK1, o que resulta na inibição do processo autofágico. Por outro lado, em condições de privação de nutrientes, AMPK é ativado, o que resulta na inibição de mTOR e ativação de ULK1. Esta cascata de sinalização resulta na indução da autofagia em condições energéticas desfavoráveis<sup>85</sup>. TRIB2 atua como um oncogene e como mecanismo de resistência a fármacos, pelo que a redução dos níveis desta proteína após tratamento com o inibidor SBI-0206965 é de facto um resultado interessante sob o ponto de vista terapêutico. O mecanismo pelo qual o inibidor de ULK1 (SBI-0206965) pode estar a reduzir os níveis de TRIB2 é desconhecido. Uma possibilidade é que ULK1 regule os níveis de TRIB2. Esta hipótese está a ser estudada pelo nosso laboratório através do uso de *small interfering RNA* (siRNA) contra ULK1 e deste modo investigar se a redução dos níveis de ULK1 se refletem em níveis mais baixos de TRIB2 em condições de ausência de nutrientes.

Quando tratamos as células com MG132 (um inibidor do proteossoma), verificamos que os níveis de TRIB2 estavam a ser degradado via proteossoma após tratamento com EBSS. Para a experiência em que utilizamos o EBSS com cloroquina e MG132, os níveis de TRIB2 não foram reduzidos com EBSS (figura 3.12). Uma possível explicação para estes dados é o facto de o leitor de membranas ChemiDocTMXRS System (BioRad), ter apresentado problemas durante a realização desta experiência.

No entanto, comparativamente com a condição de indução do fluxo com EBSS e inibição com cloroquina, o MG132 parece ter funcionado corretamente e os marcadores autofágicos demonstraram redução da sua acumulação (Figura 3.12), validando que a acumulação destes marcadores autofágicos é dependente de TRIB2.

A ação da rapamicina está descrita como anticancerígena por diminuir a proliferação celular e induzir a autofagia através de inibição de mTOR em diversos contextos tumorais tais como glioblastoma, próstata e cancro cervical<sup>131,132,136,137</sup>. Induzimos a autofagia através da rapamicina com o intuito de perceber se os resultados obtidos nos marcadores autofágicos eram

semelhantes à indução do fluxo com EBSS. Para estas condições observou-se redução da acumulação de LC3-II e não se observou diferenças no marcador p62 em células com TRIB2 em comparação com linha celular *wild-type* (Figura 3.14). Porém, quando as células foram expostas à rapamicina esta demonstrou inibir mTOR, mas não houve redução de p62, o que significa que não houve uma indução eficiente do fluxo. Uma explicação para estes dados é que a concentração utilizada é suficiente para a inibição de mTOR, mas não é suficiente para uma forte indução do fluxo, pelo que necessita de ser otimizada (Figura 3.12).

Como referido anteriormente, a autofagia é uma via de sobrevivência celular que responde a insultos do microambiente do tumoral, como privação de nutrientes, baixos níveis de energia e hipóxia (redução dos níveis de oxigénio)<sup>44,59</sup>. A análise dos ensaios de morte celular após tratamento com cloroquina, revelaram que em condições em que as células são induzidas a fazer autofagia e o fluxo é inibido, a linha celular com TRIB2 tem o dobro da percentagem (60%) de morte celular comparativamente com a linha *wild-type* (30%) (Figura 3.9). Nós verificamos que quando tratamos as células com rapamicina e posteriormente cloroquina, observamos o mesmo efeito, as células com TRIB2 foram novamente mais vulneráveis à morte celular (Figura 3.15). Estes dados são indicativos de que, se TRIB2 induzir mais fluxo autofágico a inibição provocada pela cloroquina, reflete a acumulação de autofagossomas que não fundem com o lisossoma, o que se reflete nas percentagens de morte celular. Por outro lado, mais morte celular em células com TRIB2 pode ser indicativo de que, se TRIB2 inibir o fluxo autofágico, à semelhança de TRIB3 e uma vez a autofagia é uma via de sobrevivência e está bloqueada pela cloroquina, ocorre uma dupla inibição, refletindo-se em mais morte celular.

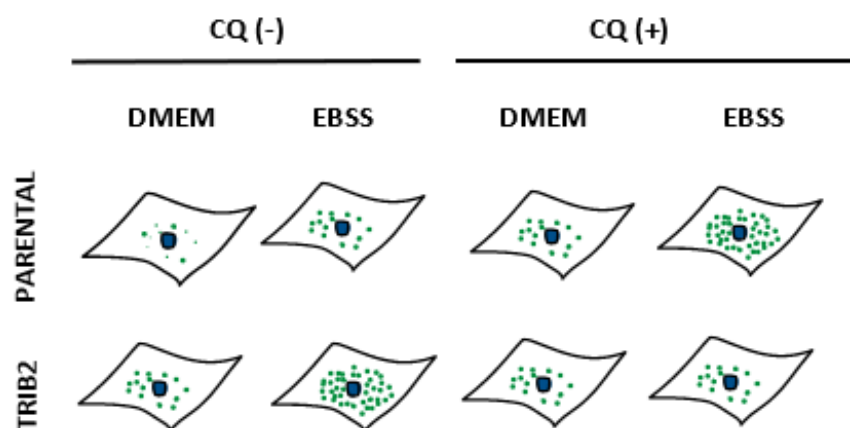
Posteriormente procurou-se analisar a expressão de marcadores autofágicos, LC3-II e p62 na presença de TRIB2, após indução e bloqueio da via da autofagia para um tempo de incubação de 3 horas. Os resultados por Western-blot demonstraram maior acumulação de LC3-II e menor acumulação de p62 quando o fluxo foi induzido e inibido com EBSS e cloroquina, respetivamente na linha com TRIB2 em comparação com a *wild-type* (Figura 3.16). Este dado sugere que o fluxo pode estar a ser induzido em células com TRIB2, uma vez que maior acumulação de LC3-II é indicativo de maior produção de autofagossomas e menor acumulação de p62, indução do fluxo. Por outro lado, de acordo com a literatura, maior acumulação de LC3-II pode indicar maior acumulação de autofagossomas e menor acumulação de p62, menor produção desta proteína.

Desta forma, uma vez que as análises dos marcadores autofágicos por meio de Western-blot não nos permitiram corroborar ou refutar a nossa hipótese, decidimos analisar o fluxo autofágico através de um repórter com RFP-GFP-LC3. Este método foi proposto por Kimura et al em 2014 e permite-nos seguir o fluxo autofágico, uma vez que as proteínas fluorescentes GFP e RFP respondem de diferentes formas ao pH<sup>120</sup>. A fluorescência de GFP é suprimida em condições ácidas, enquanto o RFP é mantido nestas condições (Figura 2.7). No processo autofágico, quando o autofagossoma funde com o lisossoma, o ambiente torna-se ácido, o que leva à perda do sinal de GFP e à manutenção do sinal vermelho de RFP (Figura 2.7). Desta forma, os canais de GFP e RFP de células marcadas mostram diferentes padrões de puncta, dependendo do tipo de tratamento (Figura 2.7). Quando induzimos o fluxo autofágico verificamos que células com TRIB2 apresentaram mais autofagossomas do que lisossomas na condição em que o fluxo é induzido, em comparação com a linha *wild-type*. Este efeito também foi observado em condições basais, cujas células têm todos os nutrientes disponíveis. Em seguida, verificamos se este efeito também era reproduzido às 6 horas de tratamento com EBSS. Observou-se que para este tempo de tratamento a linha celular *wild-type* comporta-se da mesma forma que a #1163.

A autofagia é um processo contínuo que é regulado dependendo das condições de stress, energia e nutrientes a que as células estão expostas. Estes dados, em conjunto com a análise da expressão dos genes autofágicos, confirmaram que células com TRIB2 inibem o fluxo autofágico, refutando a nossa hipótese inicial. Sabendo que TRIB2 tem um papel oncogénico, ao inibir a autofagia basal promove a proliferação e crescimento do tumor em estádios iniciais da tumorigénese<sup>59</sup>. No entanto, em condições em estádios mais avançados da tumorigénese, a autofagia tem um papel de promotora de tumor, auxiliando na sobrevivência celular<sup>59</sup>. Nestas condições TRIB2 ao bloquear o fluxo autofágico diminui a sobrevivência celular promovida pela autofagia.

Para consolidar a nossa hipótese de que TRIB2 induz o processo autofágico é necessário recorrer-se a experiências futuras. Um ensaio que poderá ser realizado é uma imunofluorescência de GFP-LC3. Este método permite-nos perceber se há maior produção de autofagossomas em células com TRIB2. Como TRIB2 bloqueia o fluxo autofágico será observado para condições de indução do fluxo autofágico com EBSS mais puncta verdes em comparação com a linha *wild-type* (Figura 4.1). Quando o fluxo é induzido e bloqueado espera-

se que o número de punctas acumule menos em comparação com a linha U2OS *wild-type*, assumindo que a taxa de produção de autofagossomas poderá ser menor (Figura 4.1).

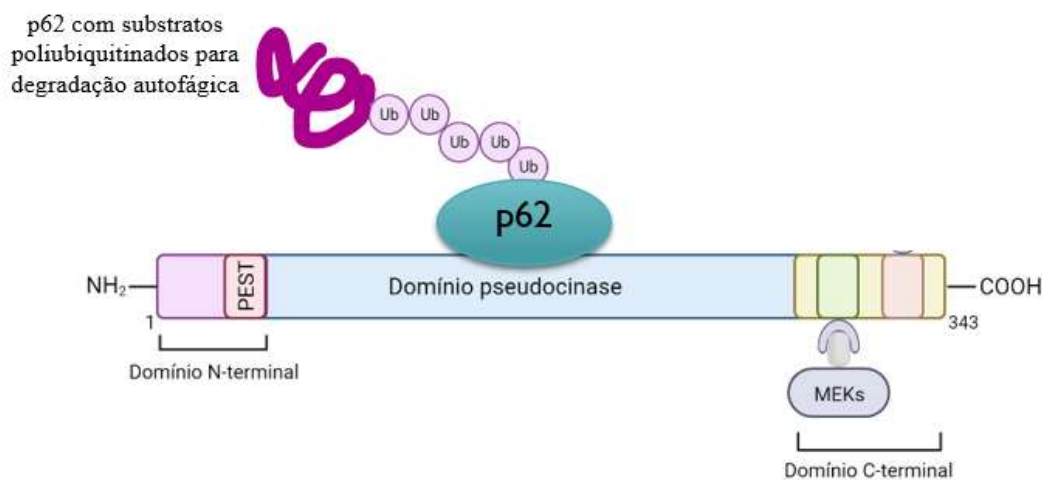


**Figura 4.1-Análise esperada para imunofluorescência com GFP-LC3.** Se TRIB2 inibe o fluxo autofágico, então em condições basais de indução do fluxo (EBSS) irá se observar mais puncta LC3 em comparação com a linha parental. Quando o fluxo é induzido e inibido, irá se observar menor número de punctas em comparação com a linha parental, uma vez que é produzido menos. CQ- cloroquina; DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*.

Sabendo que TRIB3 interage diretamente com o p62, inibindo a ligação deste com LC3-I e conseqüentemente o bloqueio da degradação autofágica<sup>110,113</sup>, seria importante perceber como é que TRIB2 pode estar a regular o processo autofágico e se está a ter um efeito semelhante a TRIB3. Para comprovar que existe uma interação direta entre TRIB2 e p62, à semelhança de TRIB3, seria necessário utilizar uma imunoprecipitação. Se TRIB2 tiver um papel semelhante a TRIB3 irá interagir *in vitro* com p62 e os resultados podem ser confirmados através de *Western-blot*.

Como descrito na introdução desta tese, TRIB2 têm três domínios: domínio N-terminal, domínio da pseudocinase e o Domínio C-terminal. Para perceber que domínio desta pseudocinase está a interagir com o p62, utilizaríamos mutantes desta proteína (TRIB2). Cada mutante tem um dos domínios retirados e permite-nos rastrear, qual o domínio de interação com a autofagia<sup>104</sup>. Sabe-se que os TRIBBLES são pseudocinases não funcionais que atuam como moléculas adaptadoras, que se ligam e bloqueiam a atividade de moléculas fundamentais em diversas vias de sinalização. Especula-se que o domínio que interage possivelmente com p62 seja o domínio da pseudocinase. Este domínio tem uma importante função de posicionamento

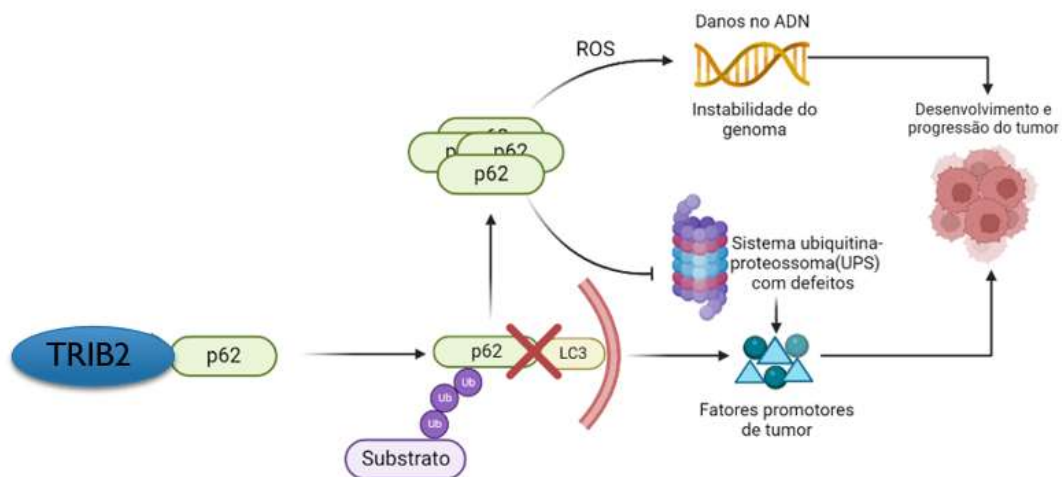
e regulação de potenciais substratos para ubiquitinação e degradação do proteossoma. Se este domínio for responsável por se ligar a p62, então o mesmo pode ser ubiquitinado e degradado pelo proteossoma. Por outro lado, pode ocorrer apenas a ligação desta proteína ao domínio de pseudocinase e a sua atividade fica bloqueada impossibilitando a sua ligação a LC3-I no autofagossoma (Figura 4.2).



**Figura 4.2-Ligação de p62 com substratos autofágicos poliubiquitinados ao domínio de pseudocinase de TRIB2.** Se TRIB2 inibe o fluxo autofágico ligando-se a p62 à semelhança de TRIB3, esse domínio poderá ser o da pseudocinase. O domínio de pseudocinase tem a função de posicionamento e regulação de potenciais substratos para degradação via proteossoma. TRIB2 pode se ligar a p62 por meio do domínio de pseudocinase, levando a sua degradação via proteossoma. Por outro lado, pode apenas se ligar e impossibilitar a sua atividade na via da autofagia.

A autofagia promove a angiogénese, metástase e invasão durante a tumorigénese. *Tang et al.* publicaram em 2020 que TRIB3 é sobreexpresso em glioblastoma e que a inibição do fluxo autofágico por esta proteína promove a invasão e proliferação de células de glioblastoma. À semelhança deste estudo seria interessante observar, se o mesmo acontece para TRIB2 na linha celular de osteossarcoma que sobreexpressa TRIB2 (#1163) em comparação com a linha *wild-type*. Para tal é necessário realizar ensaios de *Transwell* e *wound healing*. Para estes ensaios espera-se as células com TRIB2 migrem mais do que a linha sem a sobreexpressão de TRIB2.

Em suma, se TRIB2 inibe o fluxo autofágico à semelhança de TRIB3, então, uma vez que p62 não é degradado por autofagia a célula acumula espécies reativas de oxigênio (ROS) que por sua vez causam danos no ADN e instabilidade do genoma. De outra forma, esta acumulação também promove inibição e defeitos no sistema ubiquitina-proteossoma (UPS). Estes mecanismos conferem fatores promotores nas células que vão culminar no desenvolvimento e progressão do cancro (Figura 4.3). Sabendo que a autofagia é uma via que funciona como anti-tumoral em estádios iniciais do tumor, células que sobreexpressão TRIB2 vão inibir esta via, permitindo que o tumor se desenvolva.



**Figura 4.3-TRIB2 à semelhança de TRIB3 poderá interagir com p62 e inibe o processo autofágico.** Uma vez que p62 não é degradado via autofágica, acumula-se na célula e induz espécies reativas de oxigênio (ROS) que por sua vez causam danos no ADN e instabilidade do genoma. Por outro lado, esta acumulação também promove inibição e defeitos no sistema ubiquitina-proteossoma (UPS). Estes mecanismos conferem diversos fatores promotores da carcinogénese que vão culminar no desenvolvimento e progressão do tumor.

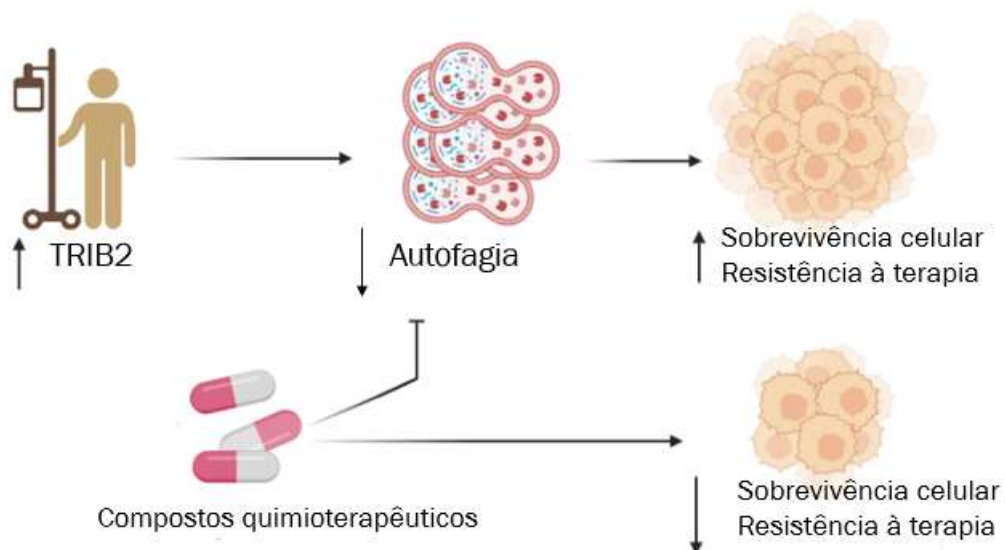
## 5 CONCLUSÃO

Pacientes com sobreexpressão de TRIB2 estão relacionados com maior sobrevivência celular e pior resposta às terapias. Na clínica, a expressão de TRIB2 tem sido modulada através de inibidores da via de PI3K/AKT/mTOR. A inibição desta via, promove a ativação do fluxo autofágico, conferindo sobrevivência celular às células cancerígenas. Desta forma, o nosso estudo teve como objetivo perceber o papel de TRIB2 no fluxo autofágico.

Os nossos resultados permitiram concluir que células com sobreexpressão de TRIB2, têm níveis de expressão de genes autofágicos reduzidos. Quando analisamos o fluxo autofágico, verificamos que estas células acumulam autofagossomas em condições de indução do fluxo e que este efeito já acontece em condições basais, ou seja, ricas em nutrientes. Estes dados indicaram que células com TRIB2 inibem o fluxo autofágico. Do ponto de vista citotóxico, esta inibição do fluxo revelou que a presença de TRIB2 tornou as células mais sensíveis ao bloqueio da autofagia e consequentemente apresentaram níveis de morte celular mais elevados.

Em suma, os nossos dados sugerem que em condições de stress metabólico e energético, cuja autofagia é promotora de tumor, TRIB2 bloqueia o fluxo autofágico.

O nosso estudo contribui para desvendar o papel de TRIB2 na regulação da autofagia visto ser uma via de sobrevivência implicada na resistência a quimioterapêuticos. Pacientes com níveis elevados de TRIB2, cujo tratamento incida em inibidores da via de PI3K/AKT/mTOR, podem beneficiar de inibidores que sejam alvos diretos da autofagia conferindo às células cancerígenas menor sobrevivência celular (Figura 5.1). Contudo, é necessário desvendar o mecanismo pelo qual ocorre a inibição do fluxo autofágico através de TRIB2, de forma a perceber o potencial desta proteína como biomarcador tumoral e a sua relação com a autofagia.



**Figura 5.1-Pacientes com níveis elevados de TRIB2 podem beneficiar de compostos que inibam tanto a via de PI3K/Akt como o fluxo autofágico.** Pacientes que apresentem a via de PI3K/Akt hiperativa associada a elevados níveis de TRIB2 cujos níveis autofágicos são inibidos apresentam tumores com maior resistência e sobrevivência celular. Compostos que inibam tanto o processo autofágico como a via de PI3K/Akt beneficiam de uma terapêutica mais eficaz, uma vez que as células apresentam níveis de morte celular superiores, reduzindo a resistência à terapia e a sobrevivência das células cancerígenas.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. NCI. Cancer Statistics. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
3. World Health Organization. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2022).
4. World Health Organization. Portugal Source: Globocan Incidence, Mortality and Prevalence. (2021).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer. *Cell Press* **100**, 57–70 (2000).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Strachan, T. O. M. & Read, A. Human Molecular genetics. *Gene Expr.* 786 (2011).
8. Weinberg, R. A. How cancer arises. *Sci. Am.* **275**, 62–70 (1996).
9. A. Weinberg, R. *The Biology of Cancer: Second Edition.* (Garland Science, 2013).
10. Lugano, R., Ramachandran, M. & Dimberg, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 1745–1770 (2020).
11. Wittekind, C. & Neid, M. Cancer invasion and metastasis. *Oncology* **69**, 14–16 (2005).
12. Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204–7218 (2018).
13. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
14. Kundu, J. K. & Surh, Y. J. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **659**, 15–30 (2008).
15. Gonzalez, H., Hagerling, C. & Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* **32**, 1267–1284 (2018).
16. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol.* **12**, 833–842 (2017).
17. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
18. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
19. Yuan, S., Norgard, R. J. & Stanger, B. Z. Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discov.* **9**, 837–851 (2019).
20. Merrell, A. J. & Stanger, B. Z. Adult cell plasticity in vivo: De-differentiation and

- transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 413–425 (2016).
21. Flavahan, W. A., Gaskell, E. & Bernstein, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science (80-. )*. **357**, (2017).
  22. Baylin, S. B. & Jones, P. A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
  23. Thomas, S. *et al.* The host microbiome regulates and maintains human health: A primer and perspective for non-microbiologists. *Cancer Res.* **77**, 1783–1812 (2017).
  24. Dzutsev, A. *et al.* Microbes and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 199–228 (2017).
  25. Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V. & Wargo, J. A. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat. Med.* **25**, 377–388 (2019).
  26. Nejman, D. *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science (80-. )*. **368**, 973–980 (2020).
  27. Birch, J. & Gil, J. Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes Dev.* **34**, 1565–1576 (2020).
  28. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
  29. Gorgoulis, V. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* **179**, 813–827 (2019).
  30. S, L. & CA, S. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell Biol.* **21**, (2019).
  31. Sever, R. & Brugge, J. S. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2015).
  32. Ersahin, T., Tuncbag, N. & Cetin-Atalay, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* **11**, 1946–1954 (2015).
  33. Fresno Vara, J. Á. *et al.* P13K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **30**, 193–204 (2004).
  34. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
  35. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. Cell Growth. *Mol. Basis Cancer Fourth Ed.* (2015) doi:10.1016/B978-1-4557-4066-6.00012-3.
  36. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3589–3594 (2009).
  37. Mossmann, D., Park, S. & Hall, M. N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 744–757 (2018).
  38. Cerniglia, G. J. *et al.* Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol. Pharmacol.* **82**, 1230–1240 (2012).
  39. Yoshii, S. R. & Mizushima, N. Monitoring and measuring autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–13 (2017).

40. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* **221**, 3–12 (2010).
41. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
42. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **12**, 814–822 (2010).
43. Parzych, Katherine R and Klionsky, D. J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism and regulation. 1–39.
44. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal.* **20**, 460–473 (2014).
45. Runwal, G. *et al.* LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
46. Nwadike, C., Williamson, L. E., Gallagher, L. E., Guan, J.-L. & Chan, E. Y. W. *AMPK Inhibits ULK1-Dependent Autophagosome Formation and Lysosomal Acidification via Distinct Mechanisms.* *Molecular and Cellular Biology* vol. 38 (2018).
47. Russell, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* (2013) doi:10.1038/ncb2757.
48. Wang, R. C. & Levine, B. Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett.* **584**, 1417–1426 (2010).
49. Lystad, A. H., Carlsson, S. R. & Simonsen, A. Toward the function of mammalian ATG12–ATG5–ATG16L1 complex in autophagy and related processes. *Autophagy* **15**, 1485–1486 (2019).
50. Hansen, M., Rubinsztein, D. C. & Walker, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 579–593 (2018).
51. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
52. Hikita, H., Sakane, S. & Takehara, T. Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res.* **2**, 120–124 (2018).
53. Eskelinen, E. L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**, 1–10 (2005).
54. Jahreiss, L., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**, 574–587 (2008).
55. Lőrincz, P. & Juhász, G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J. Mol. Biol.* **432**, 2462–2482 (2020).
56. Sridhar, S., Botbol, Y., MacIan, F. & Cuervo, A. M. Autophagy and disease: Always two sides to a problem. *J. Pathol.* **226**, 255–273 (2012).

57. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
58. Liang, C. *et al.* Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* **8**, 688–698 (2006).
59. Yun, C. W. & Lee, S. H. The roles of autophagy in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–18 (2018).
60. Kocaturk, N. M. *et al.* Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur. J. Pharm. Sci.* **134**, 116–137 (2019).
61. Du, J. *et al.* Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **302**, 383–391 (2012).
62. Lock, R. *et al.* Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol. Biol. Cell* **22**, 165–178 (2011).
63. Zhou, S. *et al.* Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett.* **323**, 115–127 (2012).
64. Tuloup-Minguez, V., Greffard, A., Codogno, P. & Botti, J. Regulation of autophagy by extracellular matrix glycoproteins in HeLa cells. *Autophagy* **7**, 27–39 (2011).
65. Galavotti, S. *et al.* The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* **32**, 699–712 (2013).
66. Sui, X. *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* **4**, 1–12 (2013).
67. Denton, D. & Kumar, S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* **26**, 605–616 (2019).
68. Ko, A. *et al.* Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ.* **21**, 92–99 (2014).
69. Sharma, K., Goehle, R., Beckta, J. M., Valerie, K. & Gewirtz, D. A. Autophagy and radiosensitization in cancer. *EXCLI J.* **13**, 178–191 (2014).
70. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
71. Salimi-Jeda, A. *et al.* Autophagy Modulation and Cancer Combination Therapy: A Smart Approach in Cancer Therapy. *Cancer Treat. Res. Commun.* **30**, 100512 (2022).
72. Han, W. *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells. *PLoS One* **6**, (2011).
73. Grácio, D., Magro, F., T. Lima, R. & Máximo, V. An overview on the role of autophagy in cancer therapy. *Hematol. Med. Oncol.* **2**, 1–4 (2017).
74. Alvarez-Meythaler, J. G., Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Kondoh, H. & LLeonart, M. E. Autophagy Takes Center Stage as a Possible Cancer Hallmark. *Front. Oncol.* **10**, 1–23 (2020).
75. Xiong, H. yan *et al.* Autophagic cell death induced by 5-FU in Bax or PUMA deficient human colon cancer cell. *Cancer Lett.* **288**, 68–74 (2010).

76. Qian, W., Liu, J., Jin, J., Ni, W. & Xu, W. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leuk. Res.* **31**, 329–339 (2007).
77. Josset, E., Burckel, H., Noël, G. & Bischoff, P. The mTOR inhibitor RAD001 potentiates autophagic cell death induced by temozolomide in a glioblastoma cell line. *Anticancer Res.* **33**, 1845–1851 (2013).
78. Weichhart, T. *Chapter 1 Mammalian Target of Rapamycin : A Signaling Kinase.* vol. 821 (2013).
79. Xie, Z. G., Xie, Y. & Dong, Q. R. Inhibition of the mammalian target of rapamycin leads to autophagy activation and cell death of MG63 osteosarcoma cells. *Oncol. Lett.* **6**, 1465–1469 (2013).
80. Cai, Y. *et al.* Diarylquinoline compounds induce autophagy-associated cell death by inhibiting the Akt pathway and increasing reactive oxygen species in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **29**, 983–992 (2013).
81. Yun, S. M. *et al.* Tanshinone IIA induces autophagic cell death via activation of ampk and erk and inhibition of mTOR and p70 S6K in KBM-5 leukemia cells. *Phyther. Res.* **28**, 458–464 (2014).
82. Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D. H. MTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1287–1295 (2010).
83. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
84. Paquette, M., El-Houjeiri, L. & Pause, A. mTOR pathways in cancer and autophagy. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
85. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* (2011) doi:10.1038/ncb2152.
86. Shackelford, D. B. & Shaw, R. J. The LKB1-AMPK pathway: Metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 563–575 (2009).
87. Shaw, R. J. *et al.* The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91–99 (2004).
88. van Nostrand, J. L. *et al.* AMPK regulation of Raptor and TSC2 mediate metformin effects on transcriptional control of anabolism and inflammation. *Genes Dev.* **34**, 1330–1344 (2020).
89. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
90. Eyers, P. A., Keeshan, K. & Kannan, N. Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease. *Trends Cell Biol.* **27**, 284–298 (2017).
91. Das, R., Sebo, Z., Pence, L. & Dobens, L. L. Drosophila tribbles antagonizes insulin signaling-mediated growth and metabolism via interactions with akt kinase. *PLoS One* **9**, (2014).

92. Yokoyama, T. & Nakamura, T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.* **102**, 1115–1122 (2011).
93. Ferreira, B. I., Santos, B., Link, W. & De Sousa-Coelho, A. L. Tribbles pseudokinases in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–19 (2021).
94. Yoshino, S. *et al.* Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9. *Blood* **137**, 75–88 (2021).
95. Shahrouzi, P. *et al.* Genomic and Functional Regulation of TRIB1 Contributes to Prostate Cancer Pathogenesis. *Cancers (Basel)*. **12**, 2593 (2020).
96. Mashima, T. *et al.* TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res.* **74**, 4888–4897 (2014).
97. Miyoshi, N. *et al.* Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: A novel marker for prognosis. *Br. J. Cancer* **101**, 1664–1670 (2009).
98. Zhou, H. *et al.* Knockdown of TRB3 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through regulation of Notch 1 expression. *Mol. Med. Rep.* **8**, 47–52 (2013).
99. Wennemers, M. *et al.* Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response. *Breast Cancer Res.* **13**, (2011).
100. Salazar, M. *et al.* Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. *Cell Death Differ.* **22**, 131–144 (2015).
101. Mayoral-Varo, V., Jiménez, L. & Link, W. The critical role of trib2 in cancer and therapy resistance. *Cancers (Basel)*. **13**, (2021).
102. Link, W. Tribbles breaking bad: TRIB2 suppresses FOXO and acts as an oncogenic protein in melanoma. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 1085–1088 (2015).
103. Grandinetti, K. B. *et al.* Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBP $\alpha$ . *Oncogene* **30**, 3328–3335 (2011).
104. Keeshan, K. *et al.* Transformation by Tribbles homolog 2 (Trib2) requires both the Trib2 kinase domain and COP1 binding. *Blood* **116**, 4948–4957 (2010).
105. Zanella, F. *et al.* Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene* **29**, 2973–2982 (2010).
106. Hill, R. *et al.* TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nat. Commun.* **8**, 1–9 (2017).
107. Kritsch, D. *et al.* Tribbles 2 mediates cisplatin sensitivity and DNA damage response in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **141**, 1600–1614 (2017).
108. Wang, J. *et al.* Combined elevation of TRIB2 and MAP3K1 indicates poor prognosis and chemoresistance to temozolomide in glioblastoma. *CNS Neurosci. Ther.* **26**, 297–308 (2020).
109. Zhang, X. W. *et al.* Disrupting the TRIB3-SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation. *Autophagy* **16**, 782–796 (2020).

110. Hua, F., Li, K., Yu, J. J. & Hu, Z. W. The TRIB3-SQSTM1 interaction mediates metabolic stress-promoted tumorigenesis and progression via suppressing autophagic and proteasomal degradation. *Autophagy* **11**, 1929–1931 (2015).
111. Li, K., Zhang, T. ting, Hua, F. & Hu, Z. wei. Metformin reduces TRIB3 expression and restores autophagy flux: an alternative antitumor action. *Autophagy* **14**, 1278–1279 (2018).
112. Hua, F. *et al.* TRB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
113. Tang, Z. *et al.* TRIB3 facilitates glioblastoma progression via restraining autophagy. *Aging (Albany. NY)*. **12**, 25020–25034 (2020).
114. Scientific, T. F. *CELL CULTURE BASICS Handbook*. (2016).
115. Otero, M. *et al.* Human Cell Culture Protocols. **806**, 301–336 (2012).
116. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 248–254 (1976) doi:10.1016/j.cj.2017.04.003.
117. Mahmood, T. & Yang, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–434 (2012).
118. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, A3.B.1-A3.B.3 (2015).
119. Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* **1**, 1559–1582 (2006).
120. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* **3**, 452–460 (2007).
121. Bordi, M. *et al.* A gene toolbox for monitoring autophagy transcription. *Cell Death Dis.* **12**, 1–7 (2021).
122. Mizushima, N. & Murphy, L. O. Autophagy Assays for Biological Discovery and Therapeutic Development. *Trends Biochem. Sci.* **45**, 1080–1093 (2020).
123. Jiang, P. & Mizushima, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods* **75**, 13–18 (2015).
124. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2007).
125. Egan, D. F. *et al.* Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol. Cell* **59**, 285–297 (2015).
126. Liu, J. *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147**, 223–234 (2011).
127. Shao, S. *et al.* Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *Int. J. Oncol.* **44**, 1661–1668 (2014).
128. Schott, C. R., Ludwig, L., Mutsaers, A. J., Foster, R. A. & Wood, G. A. The autophagy

- inhibitor spautin-1, either alone or combined with doxorubicin, decreases cell survival and colony formation in canine appendicular osteosarcoma cells. *PLoS One* **13**, 7–10 (2018).
129. Sun, F. *et al.* Proteasome inhibitor MG132 enhances cisplatin-induced apoptosis in osteosarcoma cells and inhibits tumor growth. *Oncol. Res.* **26**, 655–664 (2018).
  130. Jin, F., Xiao, D., Zhao, T. & Yu, M. Proteasome inhibitor MG132 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma-cell migration by increasing ESE3 expression. *Oncol. Lett.* **19**, 858–868 (2020).
  131. Yellen, P. *et al.* High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle* **10**, 3948–3956 (2011).
  132. Sun, C. Y. *et al.* Rapamycin and trametinib: A rational combination for treatment of nsclc. *Int. J. Biol. Sci.* **17**, 3211–3223 (2021).
  133. Hill, R. *et al.* A novel phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor directs a potent FOXO-dependent, p53-independent cell cycle arrest phenotype characterized by the differential induction of a subset of FOXO-regulated genes. *Breast Cancer Res.* **16**, 1–15 (2014).
  134. Mauthe, M. *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
  135. Bik, E. *et al.* Chloroquine-induced accumulation of autophagosomes and lipids in the endothelium. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–14 (2021).
  136. Rezazadeh, D. *et al.* Rapamycin reduces cervical cancer cells viability in hypoxic condition: Investigation of the role of autophagy and apoptosis. *Onco. Targets. Ther.* **13**, 4239–4247 (2020).
  137. Lin, X., Han, L., Weng, J., Wang, K. & Chen, T. Rapamycin inhibits proliferation and induces autophagy in human neuroblastoma cells. *Biosci. Rep.* **38**, (2018).

# ANEXO I



## ptfLC3 (Plasmid #21074)

### PURPOSE

Mammalian expression of rat LC3 fused to mRFP and EGFP

### DEPOSITING LAB

[Tamotsu Yoshimori](#)

### PUBLICATION

[Kimura et al. Autophagy. 3\(5\):452-60. \(How to cite ↓\)](#)

### SEQUENCE INFORMATION

[Sequences \(1\)](#)

### ORDERING

Item	Catalog #	Description	Quantity	Price (USD)	
Plasmid	21074	Standard format: Plasmid sent in bacteria as agar stab	1	\$75	<a href="#">Add to Cart</a>

This material is available to academics and nonprofits only.

### BACKBONE

Vector backbone: pEGFP-C1+mRFP

[\(Search Vector Database\)](#)

Backbone size w/o insert (bp): 5200

Vector type: Mammalian Expression

Selectable markers: Neomycin (select with G418)

### GROWTH IN BACTERIA

Bacterial Resistance(s): Kanamycin

Growth Temperature: 37°C

Growth Strain(s): DH5alpha

Copy number: Unknown

### GENE/INSERT

Gene/Insert name: microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta

Alt name: Map1lc3b

Alt name: LC3

Alt name: LC3b

Species: R. norvegicus (rat)

Insert Size (bp): 738

GenBank ID: U05784

Entrez Gene: [Map1lc3b](#) (a.k.a. (also known as) LC3B, Map1lc3, Mpl3, zbs559)

Tags / Fusion Proteins:

- mRFP (N terminal on backbone)
- EGFP (N terminal on backbone)

### CLONING INFORMATION

Cloning method: Restriction Enzyme

5' cloning site: BglII (not destroyed)

3' cloning site: EcoRI (not destroyed)

5' sequencing primer: N/A

[\(Common Sequencing Primers\)](#)

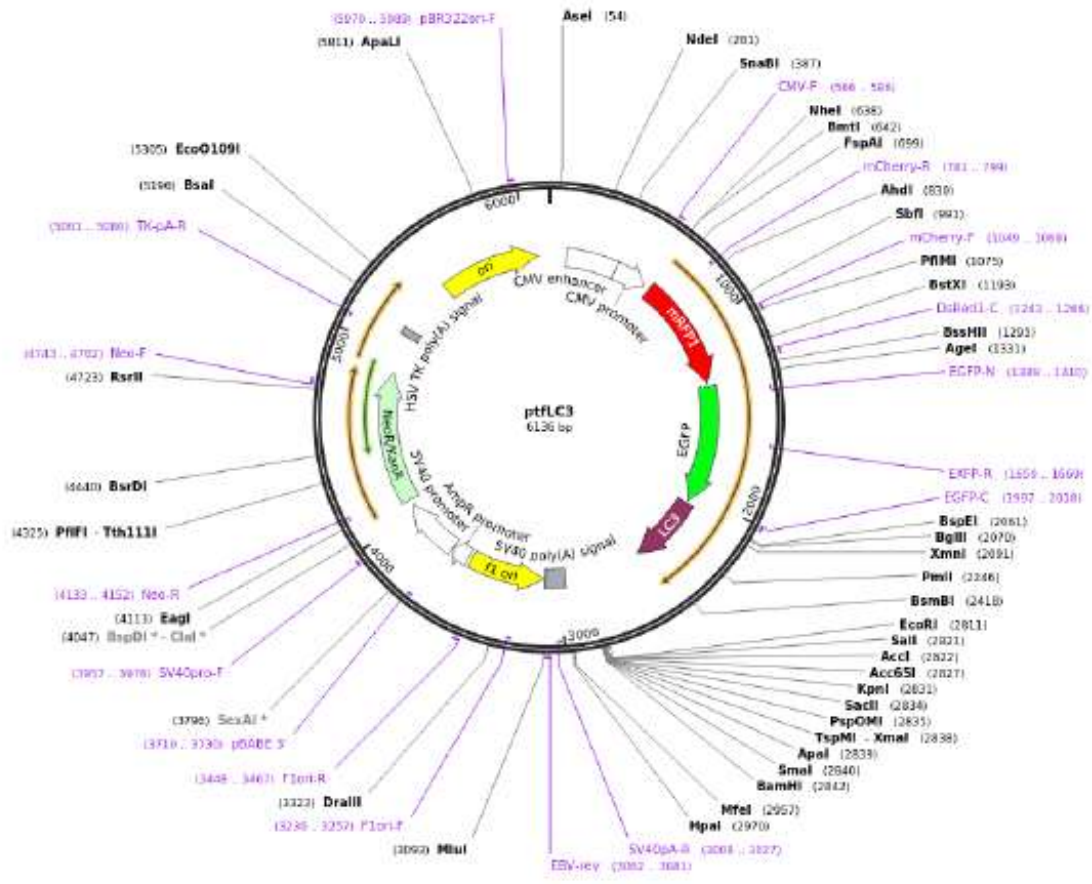
### RESOURCE INFORMATION

Terms and Licenses:

- [URMTA](#)
- [Ancillary Agreement for Plasmids Containing FP Materials](#)
- [Takara Bio Limited Use Label License \(formerly Clontech\)](#)

Industry Terms:

- Not Available to Industry



## ANEXO II



**Figura A2-Estabelecimento do tempo para meio com privação de nutrientes.** As células foram incubadas durante 1,3 e 6 horas respectivamente. O gel foi carregado com 60  $\mu$ g por poço. Foram utilizadas células de osteossarcoma Wild-type e células da mesma linha contendo flag para a TRIB2 (#1163). O inibidor lisossomal Cloroquina está uma concentração de 20 $\mu$ M; EBSS-*Earle's Balanced Salt Solution*. Fornecedores dos anticorpos primários: CST-*Cell Signaling Technology*; STB-*Santa Cruz Biotechnonology*; SA- *Sigma Aldrich*. N=2 replicados biológicos.