

**ANDREIA FILIPA LAMY SILVA**

**Descoberta de moduladores de FOXO para tratamentos  
anticancerígenos e antienvhecimento**



**UAAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Departamento de Medicina e Ciências Biomédica**

**2019**



**ANDREIA FILIPA LAMY SILVA**

**Descoberta de moduladores de FOXO para tratamentos  
anticancerígenos e antienvhecimento**



**UAAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Departamento de Medicina e Ciências Biomédica**

**2019**

**ANDREIA FILIPA LAMY SILVA**

**Descoberta de moduladores de FOXO para tratamentos  
anticancerígenos e antienvhecimento**

**Mestrado em Oncobiologia- Mecanismos moleculares do cancro**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**

**Prof. Dr. Wolfgang Link**

**Prof Dr<sup>a</sup>. Bibiana Ferreira**



**UAAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina**

**2019**

**ANDREIA FILIPA LAMY SILVA**

**Descoberta de moduladores de FOXO para tratamentos  
anticancerígenos e antienvhecimento**

**Mestrado em Oncobiologia- Mecanismos moleculares do cancro**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**

**Prof. Dr. Wolfgang Link**

**Prof Dr<sup>a</sup>. Bibiana Ferreira**



**UAAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina**

**2019**

**Descoberta de moduladores de FOXO para tratamentos anticancerígenos e antienvhecimento**

Declaração de autoria de trabalho

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

Copyright

ANDREIA FILIPA LAMY SILVA

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

## DEDICATÓRIA

«Um dia, quando começa, parece igual aos outros. A mesma luz que entra pela janela, ruídos de obras e automóveis, vozes... Mas o que nesse dia me falta é outra coisa: a tua voz, a surpresa de cada instante que me dás, uma luz diferente que não vem de fora, da mesma rua e do mesmo céu, mas de dentro de ti. Assim, o que faz a mudança do mundo e das coisas não é o mundo nem as coisas: somos nós, e a relação que nos prende um ao outro - isso que, não sendo nada para fora de nós, é tudo o que temos nesta vida.»

*Nuno Júdice* | "A pura inscrição do amor", pág. 35 |

**Agradeço ao meu querido e amado avô Joaquim António Pincho Lamy pela alegria, confiança, apoio e orgulho a que sempre me habituou. Por seres um ser humano incrível, inspirador, mas, acima de tudo, por seres o maior exemplo de alegria e força em pessoa que tenho em mim presente, dedico a ti, avô, este trabalho**

## **DEDICATÓRIA**

**Joaquim António Pincho Lamy**

**01.11.1938 - ∞**

A melhor forma de honrar alguém que nos aquece o coração é recordar que a sua passagem não foi em vão. Se pudermos juntar a vontade de ajudar, acabamos o dia a arrancar sorrisos há muito escondidos pelo sofrimento da vida e o mundo ganha um pouco mais de cor. Sou eternamente grata por ter conhecido um ser humano como tu.

Estaremos sempre à distância de uma estrela. Até já, avô.

## AGRADECIMENTOS

O espaço reservado para esta secção de agradecimentos não me permite, verdadeiramente, agradecer, na devida forma, a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha aprendizagem e realização pessoal em mais uma importante etapa da minha formação académica. Assim, deixo o meu sincero agradecimento pelo contributo, apoio e confiança das várias instituições e elementos envolvidos com os quais tive o enorme prazer de colaborar no decorrer deste mestrado.

Expresso, primeiramente o meu agradecimento ao Wolfgang Link, não só por permitir a minha integração numa investigação de elevada dimensão, assim como pelo apoio e disponibilidade demonstrados.

À consagrada Bibiana Ferreira, agradeço profunda e sinceramente pela orientação, apoio e aprendizagem de excelência ao qual fui submetida que, indubitavelmente, estimularam o meu desejo e vontade constante de aprofundar a temática em questão. Reconheço, com enorme gratidão, a confiança depositada, o sentido de responsabilidade e autonomia que me inculuiu.

À Susana Machado, agradeço profundamente pela transmissão de conhecimentos, pelo constante apoio, preocupação, companheirismo e disponibilidade sempre evidenciados.

Ao professor José Bragança, um agradecimento por toda a preocupação, amabilidade e disponibilidade demonstrados em dois anos de mestrado, tornando o meu percurso na UAlg, deveras, mais agradável.

Agradeço a todos os professores do ano letivo 2017/2018 do Mestrado em Oncobiologia pela aprendizagem proporcionada.

Agradeço, carinhosamente, aos auxiliares, enfermeiros e voluntários das Urgências da Unidade de Faro do Centro Hospitalar Universitário do Algarve, especialmente às voluntárias Ernestina, Maria Vitória Arenga e Natália, das quais nutro um enorme carinho, pelos ensinamentos e gargalhadas proporcionadas, tornando este percurso académico muito mais leve e alegre. À Catarina, à Kristina, à Inês Almeida, Rita Marinheiro e ao Roland Bumbuc um agradecimento gigante pela oportunidade de transmissão de valores humanos, compaixão, empatia e carinho que devemos nutrir pelo outro.

Agradeço de coração aos meus amigos, Adriana Arrulo, Carolina Vieira, Filipa Pereira, Inês Pais, Jéssica António, João Lopes, Leonardo Silva, Lizelle Correia, Micaela Santos, Rui Augusto e Vanessa Pires pelo companheirismo e apoio contantes, sendo impossível traduzir para palavras toda a minha gratidão, afeto e admiração para convosco.

Por fim, aos meus pais, irmão, tio e avós, um agradecimento por todo o amor, apoio incondicional e incentivo habituais no decorrer de mais um percurso académico e pela oportunidade de concretização pessoal.





## RESUMO

A localização subcelular aberrante de proteínas supressoras de tumor é uma característica de diversas doenças humanas, incluindo o cancro. FOXOs são fatores de transcrição que quando se encontram no núcleo, controlam a transcrição de genes envolvidos em processos biológicos fundamentais na proteção contra o cancro e envelhecimento. Estas proteínas pertencem à via de sinalização mais frequentemente ativa em cancros humanos- a via PI3K/Akt e encontram-se inativos e localizados no citoplasma em diversos cancros humanos devido a modificações pós-traducionais. Assim, a sua manipulação farmacológica pode ser benéfica no tratamento de cancro e de doenças associadas ao envelhecimento.

O nosso laboratório aplicou três abordagens distintas (bioinformática, *screening* e *candidate approach*) para descobrir e caracterizar diferentes compostos anticancerígenos e antienvelhecimento que modulem a localização de FOXO. Para isso, utilizámos um sistema celular previamente estabelecido que expressa de forma estável a proteína de fusão FOXO3a-GFP de forma a monitorizar a localização subcelular de FOXO. Por um lado, utilizámos uma ferramenta bioinformática, o cMAP, para obter uma lista de diferentes compostos com capacidade de produzir um perfil de expressão génica inverso ao de TRIB2, uma proteína repressora de FOXO. Harmina e Piperlongumina foram dois desses compostos e revelaram capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO-GFP e de afetar a transcrição dos seus genes-alvo (p21, p27 e PUMA). No caso de Piperlongumina, a modulação da ativação de FOXO é através do Akt. Por outro lado, testámos 32 extratos de microalgas (Alg1-Alg18) e de haloarqueas (Alg19-Alg32) e 3 péptidos (Pep1, Pep2, Pep3) e 10 deles mostraram capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO-GFP. Por fim, testámos fármacos com atividade e efeitos conhecidos, nomeadamente três inibidores de mTOR - Rapamicina, *Torin 1* e CID613034- e um inibidor de MEK1 e MEK2- Trametinib, que mostram que *Torin 1* induz a localização nuclear de FOXO-GFP.

**Palavras-chave:** cancros humanos; envelhecimento humano; inativação de FOXO; manipulação farmacológica; localização subcelular aberrante; translocação nucleocitoplasmática de proteínas

## ABSTRACT

The aberrant subcellular localization of tumour-suppressor proteins is a prominent feature of many human diseases as well as cancer. The FOXO family of proteins are transcription factors that need to be in the cell nucleus to regulate several biological processes essential for cancer and aging. FOXO proteins are part of the most frequently activated pathway in human cancer - the PI3K/Akt pathway and are inactive and located in the cytoplasm in several human cancers due to post-translational modifications. In addition, FOXO3 has been identified as the second most replicated genetic factor associated with extreme human longevity. Thus, their pharmacological manipulation might be beneficial for the treatment of cancer and other age-related diseases.

The Link lab has applied three different approaches (bioinformatic, screening and candidate approach) to discover and characterize anti-cancer and anti-aging drugs that modulate FOXO localization. Therefore, we used a previously established cellular system which stably expresses a FOXO3a-GFP fusion protein, allowing us to monitor FOXO subcellular localization. Using the bioinformatic tool connectivity MAP (cMAP), we obtained a list of candidate drugs including the natural products Harmine and Piperlongumine capable of producing a gene expression profile inverse to the profile induced by the FOXO repressor TRIB2. Accordingly, Harmine and Piperlongumine induced FOXO-GFP nuclear localization and affected the transcription of FOXO target genes (p21, p27 and PUMA). Piperlongumine modulates FOXO activation through Akt. We also tested 32 microalgae (Alg1-Alg18) and haloarchaea (Alg19-Alg32) extracts and 3 peptides (Pep1, Pep2, Pep3) for their capacity to induce FOXO-GFP nuclear localization. Ten extracts and one peptide were identified to induce the nuclear accumulation of FOXO. Finally, we analyzed known drugs with known activity and effects: three mTOR inhibitors - Rapamycin, Torin 1 and CID613034- and a MEK1 and MEK2 inhibitor -Trametinib and found that Torin 1 induces FOXO-GFP nuclear localization.

**Keywords:** human cancer; human ageing; FOXO inactivation; pharmacological manipulation; aberrant subcellular localization; nucleocytoplasmic transport of protein



## ÍNDICE GERAL

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>vii</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>xxxvii</b>
<b>ÍNDICE DE EQUAÇÕES .....</b>	<b>xxxix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xli</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<i>I.1. CANCRO E ENVELHECIMENTO .....</i>	<i>1</i>
I.1.1 Cancro .....	1
I.1.2. Envelhecimento.....	2
I.1.3. Relação entre cancro e envelhecimento.....	4
<i>I.2. FATORES DE TRANSCRIÇÃO FOXO .....</i>	<i>7</i>
I.2.1. Regulação de FOXO .....	9
I.2.1.1. Transporte núcleocitoplasmático de FOXO.....	10
I.2.2 Via de sinalização PI3K/Akt.....	12
I.2.2.1. Reativação de FOXO .....	14
<i>I.3. PROTEÍNAS TRIBBLES (TRIB).....</i>	<i>16</i>
I.3.1. TRIB2 .....	18
<i>I.3.2. TRIB2 e compostos naturais .....</i>	<i>19</i>
3.2.1. Harmina.....	19

I.3.2.2. Piperlongumina .....	21
<i>I.4. PROPRIEDADES ANTICANCERÍGENAS DE PRODUTOS NATURAIS</i> .....	23
<i>I.5. INIBIDORES DE MTOR</i> .....	25
I.5.1. Rapamicina .....	27
I.5.2. Torin 1 .....	28
I.5.3. CID613034.....	28
<i>I.6. TRAMETINIB</i> .....	29
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>III. HIPÓTESE</b> .....	<b>32</b>
<b>IV. Metodologia</b> .....	<b>33</b>
<i>IV.1. CULTURA DE CÉLULAS</i> .....	33
IV.1.1.....	33
Linhas celulares.....	33
IV.1.2. Descongelamento de células .....	34
IV.1.3. Manutenção e cultura das linhas células .....	35
IV.1.4. Contagem de células .....	35
IV.1.5. Tratamento com compostos .....	37
<i>IV.2. MIROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA</i> .....	40
IV.2.1 Fixação, marcação de células e preparação de lâminas .....	40
IV.2.2 Análise microscópica .....	41
IV.2.3 Quantificação .....	41
IV.2.4. Análise estatística.....	42
<i>IV.3. WESTERN BLOT</i> .....	43
IV.3.1. Extração de proteína total .....	43
IV.3.2. Quantificação de proteína total .....	44
IV.3.3. Preparação de amostras .....	45
IV.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	46
IV.3.5. Transferência para membrana .....	47

IV.3.6. Bloqueio .....	48
IV.3.7. Incubação com anticorpos (primário e secundário) .....	48
IV.3.8. Detecção quimioluminescente .....	50
<i>IV.4. RT-qPCR</i> .....	50
IV.4.1. Preparação de amostras .....	50
IV.4.2. Extração e quantificação de ARN total.....	50
IV.4.3. Síntese de cADN.....	51
IV.4.4. Reação de qPCR / PCR quantitativo.....	53
IV.4.5. Análise estatística.....	55
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<i>V.1. ABORDAGEM BIOINFORMÁTICA</i> .....	57
<i>Harmina e Piperlongumina</i> .....	57
V.1.1. Microscopia fluorescente .....	58
V.1.2. RT-qPCR .....	71
V.1.3. Western blot .....	74
<i>V.2. SCREENING</i> .....	76
V.2.1. Quantificação Manual .....	76
Extratos de microalgas (Alg1-Alg18) .....	76
V.2.2. Quantificação Automática.....	81
Extratos de microalgas (Alg5, Alg10- Alg12, Alg16 e Alg17) .....	81
Alg5, Alg11 e Alg12 .....	83
Frações de Alg11 (F1-F5) .....	84
Extratos de microalgas, de Haloarqueas e extratos proteicos, pigmentares e celulares destes microrganismos (Alg1-Alg32) .....	85
Fucoxantina .....	92
Péptidos .....	94
<i>V.3. CANDIDATE APPROACH</i> .....	97
Inibidores de mTOR.....	97
V.3.1. Microscopia fluorescente .....	97

Trametinib .....	102
V.3.1. Microscopia fluorescente .....	104
<b>VI. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<i>VI.1. ABORDAGEM INFORMÁTICA.....</i>	<i>105</i>
<i>VI.2. SCREENING.....</i>	<i>111</i>
<i>VI.3 CANDIDATE APPROACH .....</i>	<i>116</i>
<b>VII. CONCLUSÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>123</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
<b>X. ANEXOS E APÊNDICES.....</b>	<b>141</b>
<i>ANEXO 1 .....</i>	<i>141</i>
<i>ANEXO 2.....</i>	<i>143</i>
<i>ANEXO 3.....</i>	<i>144</i>
<i>ANEXO 4.....</i>	<i>150</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura I.1.- Representação esquemática das hallmarks do cancro.** Para uma célula se tornar cancerígena necessita de adquirir certas características, nomeadamente sustentação da sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogénese, ativação da invasão e metástase (hallmarks inicialmente propostas em 2000), mutações e instabilidade genómica, inflamação promotora de tumor (hallmarks adicionadas em 2011), reprogramação metabólica e evasão à destruição pelo sistema imune. Adaptado de Hanahan D. and Weinberg R., “The Hallmarks of cancer”, *Cell*, 2011 [8] ...1

**Figura I.2-Representação esquemática das hallmarks do envelhecimento.** Existem mecanismos celulares e moleculares que estão associados ao envelhecimento, nomeadamente a instabilidade genómica, o encurtamento dos telómeros, as alterações epigenéticas, a perda da proteostase, a desregulação das vias de deteção de nutrientes, a disfunção mitocondrial, a senescência celular, e a alteração da comunicação intercelular. Adaptado de *Otín C., Blasco M., Partridge L., Serrano M., and Kroemer G., “The Hallmarks of aging”, Cell, 2013* <sup>[11]</sup> .....4

**Figura I.3-Representação esquemática da estrutura das proteínas FOXO humano.** As proteínas FOXO são constituídas pelo DBD *forkhead box* (roxo), representado por FKH; pelo NLS, pela NES e pelo TAD. O domínio DBD permite a ligação de FOXO ao ADN e o TAD permite a ligação de FOXO a outras proteínas. As sequências NLS e NES marcam FOXO para ser importado ou exportado do núcleo, respetivamente. Adaptado de *Liu Y., Ao X., Ding W., Ponnusamy M., Wu W., Hao X., Yu W., Wang Y., Lil P. e Wang J., “Critical role of FOXO3a in carcinogenesis”, Molecular Cancer, 2018* <sup>[29]</sup> .....8

**Figura I.4-Genes-alvo de FOXO.** Os fatores de transcrição FOXO, quando se encontram no núcleo, regulam a expressão de genes-alvo envolvidos em diferentes processos celulares, nomeadamente o ciclo celular, stress oxidativo, reparação de ADN, metabolismo, apoptose,

autofagia e sistema imune. Adaptado de *Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., & Rishi, A. K., "Akt, FoxO and regulation of apoptosis", Biochimica et Biophysica Acta, 2011* <sup>[31]</sup>.....9

**Figura I.5-Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/FOXO.** A via PI3K, quando ativa, resulta na exportação e inativação de FOXO. A ativação desta via é iniciada através da ativação de RTKs pela ligação de ligandos extracelulares ao recetor. Quando os RTKs estão ativos existem várias proteínas intracelulares como PI3K que se podem ligar. PI3K fica ativa e fosforila PIP2, originando PIP3. Este fosfolípido liga-se a Akt, permitindo que este fique ativo ao ser fosforilado por outras proteínas. A ativação de Akt permite a sua **dissociação da membrana** plasmática, de forma a fosforilar diferentes substratos downstream como FOXO. A fosforilação de FOXO em três resíduos de aminoácidos por Akt promove a ligação da proteína 14-3-3. Seguidamente, ocorre a exportação nuclear do complexo FOXO-14-3-3, mediada por CRM1, para o citoplasma. Consequentemente, FOXO fica inativo pelo que não induz a transcrição de genes alvo. Adaptado de *Wilkin D., Brainard J. CK-12 Conceptos Biología, 2015* <sup>[46]</sup>. ..... 12

**Figura I.6-Esquema representativo das estratégias de reativação de FOXO.** A manutenção de FOXO nuclear e translocação de FOXO citoplasmático compreendem duas estratégias para garantir a localização nuclear e, conseqüente, ativação de FOXO. .... 15

**Figura I.7-Estrutura da família de proteínas TRIB.** As *TRIB* são constituídas pelo domínio N-Terminal, domínio pseudocinase central sem atividade catalítica (*kinase dead catalytic loop*) e domínio C-terminal. O domínio N-Terminal contém o *PEST motif* e o C-Terminal os sítios de ligação a MEK1 (*MEK1 binding site*) e COP1 (*COP1 binding site*), altamente conservados. Adaptado de *Johnston J. & Kiss-Toth E., «TRIB1 (Tribbles Pseudokinase 1). », Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2015.* <sup>[62]</sup>..... 17

**Figura I.8- Esquema representativo da relação entre três inibidores de mTOR (Rapamicina, Torin 1 e CID613034) e Akt.** A Akt pertence à via de sinalização PI3K/Akt e a sua ativação está dependente da fosforilação de PDK1 e de mTORC2. A ativação desta proteína resulta, por um

lado na ativação do complexo mTORC1 e, por outro lado, na exportação e inativação de FOXO. A Rapamicina, *Torin 1* e CID613034 são três inibidores de mTOR com alvos diferentes: a Rapamicina inibe mTORC1, CID613034 inibe mTORC2 e *Torin 1* inibe mTOR.....27

**Figura IV.9- Representação esquemática dos quadrantes da câmara de Neubauer.** A câmara de *Neubauer* possui 9 quadrantes que permitem a contagem do número de células. Cada quadrante tem uma área de 1 mm<sup>2</sup> (1 mm x 1mm). A profundidade da câmara é 0,1 mm. Neste estudo foi realizada a contagem do número de células viáveis nos quadrantes A, B, C e D. Os restantes quadrantes foram desprezados. No final, a média do número de células nestes 4 quadrantes foi calculada.....36

**Figura IV.10-Representação esquemática do método utilizado para quantificação manual de FOXO-GFP nuclear.** A quantificação de FOXO-GFP nuclear foi realizada ao rastrear a lamela na sua totalidade. Foram contadas 250 células individuais e foi feito um *scoring* das que apresentavam FOXO-GFP no núcleo.....42

**Figura IV.11-Preparação da reta padrão de BSA e das amostras de concentração desconhecida.** A reta padrão de BSA é obtida através de diluições em série de uma solução-mãe de BSA a 2000 mg/mL em H<sub>2</sub>O. As diferentes concentrações da reta padrão de BSA estão representadas de A a G. As amostras de concentração desconhecida também foram diluídas 1:10 em H<sub>2</sub>O (5 µL amostra + 45 µL H<sub>2</sub>O), representada por X. ....44

**Figura IV.12- Preparação de placa de 96 poços para ensaio de Bradford.** As diferentes soluções padrões (A<sub>1</sub>-G<sub>1</sub>) e amostras de concentração desconhecida (A<sub>2</sub>-G<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>-G<sub>3</sub>) foram adicionadas à placa de 96 poços. Foram adicionados 5 µL de cada uma e 250 µL de reagente de Bradford. As amostras de concentração desconhecida foram preparadas em duplicado. Este processo foi necessário para determinar a concentração das proteínas e a quantidade de amostra a ser carregada no gel de poliacrilamida. ....45

**Figura IV.13- Representação esquemática da separação de proteínas em SDS-PAGE.** O gel é composto por duas fases, o *stacking* gel e o *running* gel. As proteínas desnaturadas são carregadas no gel e quando a corrente elétrica é aplicada começam a corrida em direção ao polo positivo. Inicialmente ficam concentradas devido ao *stacking* gel e quando chegam ao *running* gel são separadas de acordo com o seu peso molecular. As proteínas de menor peso molecular migram mais facilmente através da rede formada pela poliacrilamida enquanto que as de maior peso molecular migram menos. Adaptado de *Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf). Acesso em: 15.05.19 <sup>[150]</sup> .....47

**Figura IV.14-Representação esquemática da transferência pelo método sanduíche.** No *western blot*, as proteínas separadas no gel são transferidas para uma membrana e existem diversos métodos de transferência. No método da sanduíche, a transferência ocorre com o material indicado (esponja, dois papéis de filtro, gel, membrana, dois papéis de filtro e esponja). Para isto, é aplicada uma corrente elétrica e as proteínas migram na direção do cátodo (polo positivo), para a membrana. ....48

**Figura IV.15- Representação esquemática do processo de RT-qPCR.** Nesta técnica, uma amostra de ARN é convertida em cADN de cadeia simples pela enzima transcriptase reversa. O cADN sintetizado é amplificado, posteriormente, por qPCR. Adaptado de *ThermoFisher Scientific*. ....52

**Figura V.16-Esquema representativo do funcionamento do cMAP.** A ferramenta bioinformática contém perfis de expressão de diferentes genes obtidos por experiências com 170 compostos à mesma concentração e tempo de incubação em 4 linhas celulares distintas. ....58

**Figura V.17- Harmina induz a localização de FOXO-GFP nuclear.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações de Harmina (50 nM, 500 nM, 1µM, 16 µM e 50 µM) durante 1 hora, foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo.

A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob  $**P < 0.01$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*. .....59

**Figura V.18- O efeito de Harmina na localização nuclear de FOXO-GFP diminui com o aumento do tempo de incubação.** As células U2OS FOXO, tratadas com Harmina a 16  $\mu$ M durante (A) 1h; (B) 6h; (C) 12h e (D) 24h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. (E) representa os diferentes tempos de incubação das células U2OS FOXO com Harmina a 16  $\mu$ M no mesmo gráfico. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*. .....61

**Figura V.19- Piperlongumina induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com Piperlongumina a diferentes concentrações (50 nM, 500 nM, 1 $\mu$ M, 13  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) durante (A) 1h; (B) 6h; (C) 12h e (D) 24h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. (E) representa os diferentes tempos de incubação das células U2OS FOXO com Piperlongumina a diferentes concentrações e tempos de incubação no mesmo gráfico. O A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização

nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnnett's multiple test comparison*. .....63

**Figura V.20- FOXO-GFP está distribuído uniformemente em células sem tratamento e localizado no núcleo em células tratadas com Leptomicina B. As células U2OS FOXO foram tratadas com DMSO, Leptomicina B e Etanol durante 1h.** A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....65

**Figura V.21- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com Harmina e Piperlongumina.** As células U2OS FOXO foram tratadas com Harmina e Piperlongumina. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....66

**Figura V.22- As células U2OS PARENTAL sem tratamento não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com DMSO que foi utilizado como controlo negativo. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência

Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.....67

**Figura V.23- As células U2OS PARENTAL tratadas com Harmina e Piperlongumina não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com DMSO Harmina e Piperlongumina. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....68

**Figura V.24-NES está localizado no citoplasma em células sem tratamento e localizado no núcleo em células tratadas com Leptomicina B.** As células U2OS NES foram tratadas com DMSO, Leptomicina B e Etanol durante 1h. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de NES-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.....69

**Figura V.25- NES-GFP está localizado no citoplasma de células tratadas com Harmina e Piperlongumina.** As células U2OS NES foram tratadas com Harmina e Piperlongumina. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem

AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....70

**Figura V.26- Harmina e Piperlongumina afetam a transcrição de genes-alvo de FOXO.** A análise foi obtida através de células U2OS PARENTAL tratadas com Harmina a 16  $\mu$ M e Piperlongumina a 13  $\mu$ M durante 6h. A Os níveis de expressão do mRNA de três genes-alvo de FOXO foram avaliados, nomeadamente o A) p21; B) p27 e C) PUMA, através da realização de RT-qPCR e a expressão génica é apresentada sob a forma de *fold change*. O DMSO foi utilizado como controlo negativo. As análises estatísticas foram obtidas com recurso ao programa Bio-Rad CFX Manager 3.0. O GAPDH foi utilizado como gene *housekeeping*. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnnett's multiple test comparison*. ....72

**Figura V.27- Níveis de p-FOXO3a aumentam em células que sobre-expressam FOXO-GFP tratadas com Piperlongumina.** A análise foi obtida através da realização de *western blot* a células U2OS FOXO tratadas com A) Harmina a 16  $\mu$ M e B) Piperlongumina a 13  $\mu$ M durante diferentes tempos de incubação (1h, 12h, 24h e 48h). O DMSO foi utilizado como controlo negativo e está representado por D. Harmina está representada por H e Piperlongumina por P. A percentagem de todos os *running géis* foi de 10%. Foi carregado 25 a 30  $\mu$ L de lisado de proteína total e 3  $\mu$ L do marcador NZY Blue Protein Marker, por poço. Os níveis de fosforilação de FOXO foram detetados através de um anticorpo específico anti-FOXO fosforilado (p-FOXO3a S253). Os níveis de fosforilação de Akt foram detetados através de um anticorpo específico anti-Akt fosforilado (p-Akt S473). FOXO3a TOTAL e Akt TOTAL foram utilizados como controlos da quantidade de proteína. GAPDH foi utilizado como controlo de *loading*. O sinal foi detetado através do Sistema de imagem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, EUA), acoplado ao programa Image Lab 4.0 para análise e deteção de imagens. ....75

**Figura V.28- Quantificação manual de FOXO-GFP nuclear em células tratadas com extratos de microalgas.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes extratos de microalgas (Alg5,

Alg10, Alg11, Alg12, Alg16 e Alg17) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação manual de 250 células individuais. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. ....77

**Figura V.29- FOXO-GFP está distribuído uniformemente em células sem tratamento e localizado no núcleo em células tratadas com Leptomicina B.** As células U2OS FOXO foram tratadas com DMSO, Leptomicina B e Etanol durante 1h. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....78

**Figura V.30- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....79

**Figura V.31- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg10, Alg16 e Alg17.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg10, Alg16 e Alg17 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização

subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....80

**Figura V.32- Comparação da quantificação manual e automática de FOXO-GFP nuclear em células tratadas com extratos de microalgas.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes extratos de microalgas (Alg5, Alg10, Alg11, Alg12, Alg16 e Alg17) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação manual de 250 células individuais. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5* (cinzento). Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. ....81

**Figura V.33- Os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12 não induzem a localização nuclear de FOXO-GFP.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações (0.1 ng/μL; 1 ng/μL; 10 ng/μL; 100 ng/μL e 1000 ng/μL) dos extratos de microalgas (A) Alg5; (B) Alg11; (C) Alg12; durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de duas experiências independentes ± SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*. ....83

**Figura V.34- A fração F4 de Alg11 induz a localização nuclear de FOXO-GFP.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes frações (F1, F2, F3 e F4) do extrato de microalga Alg11 (F5) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação **automática com recurso** ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.....85

**Figura V.35- Os extratos de microalgas Alg14 e Alg16 induzem a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes extratos de microalgas, de Haloarqueas e extratos proteicos, pigmentares e celulares destes mesmos microrganismos (Alg1- Alg-32) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.....87

**Figura V.36- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com os extratos de microalgas Alg3, Alg7 e Alg10 e Alg14.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg3, Alg7 e Alg10 e Alg14 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....88

**Figura V.37- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com os extratos de microalgas Alg15, Alg16 e Alg17 e Alg18.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg15, Alg16 e Alg17 e Alg18 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de **imagem AxioVision 4.8.2.** A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....89

**Figura V.38- As células U2OS PARENTAL tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16 não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.....90

**Figura V.39- Fucoxantina não induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com fucoxantina durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5.* Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os *P-values* são apresentados sob *Ns*= Não significativo. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM.....92

**Figura V.40- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com fucoxantina.** As células U2OS FOXO foram tratadas com fucoxantina durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....93

**Figura V.41- NES-GFP está localizado no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16.** As células U2OS NES foram tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....94

**Figura V.42- Quantificação da localização de FOXO-GFP em células tratadas com três péptidos.** As células U2OS FOXO, tratadas com os péptidos Pep1, Pep2 e Pep3 foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. ....95

**Figura V.43- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os péptidos Pep1, Pep2 e Pep3.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os péptidos Pep1, Pep2 e Pep3 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e

aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. ....96

**Figura V.44- Torin 1 induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações (0.1 nM, 1 nM, 10 nM e 100 nM) de três inibidores de mTOR (A) Rapamicina; (B) Torin 1 e (C) CID63034 durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. O A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.000$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*. ....98

**Figura V.45- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com Torin 1.** As células U2OS FOXO foram tratadas com três inibidores de mTOR: Rapamicina, Torin 1 e CID613034. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. .... 100

**Figura V.46- As células U2OS PARENTAL tratadas com Torin 1 não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com Torin 1. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada

através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. .... 101

**Figura V.47- NES-GFP está localizado no citoplasma de células tratadas com Torin 1.** As células U2OS NES foram tratadas com Torin 1. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji. .... 101

**Figura V.48- Trametinib não induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações (10 nM, 100 nM e 1000 nM) de Trametinib a (A) 1h; (B) 6h; (C) 12h e (D) 24h durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. O A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; e foram obtidos através de *Dunnnett's multiple test comparison*. .... 103

**Figura V.49- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com Trametinib.** As células U2OS FOXO foram tratadas com Trametinib. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara

fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....104

**Figura X.1. - FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg1, Alg2, Alg4 e Alg5. As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg1, Alg2, Alg4 e Alg5 durante 1h.** O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.....145

**Figura X.2. FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg6, Alg8 e Alg9 e Alg11.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg6, Alg8 e Alg9 e Alg11 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....146

**Figura X.3. FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg12, Alg13 e extratos de Haloarqueas Alg19 e Alg20.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg12, Alg13 e com os extratos de Haloarqueas Alg19 e Alg20. durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens

foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....147

**Figura X.4. FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg21, Alg22 e Alg24.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg21, Alg22 e Alg24 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....148

**Figura X.5. - FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg25-Alg28** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg25-Alg28 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....149

**Figura X.6.- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg29- Alg32.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg29- Alg32 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....150

**Figura X.7. - As células U2OS PARENTAL sem tratamento não apresentam fluorescência.**

As células U2OS PARENTAL foram tratadas com DMSO que foi utilizado como controlo negativo. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....151

**Figura X.8 - As células U2OS PARENTAL tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12 não apresentam fluorescência.**

As células U2OS PARENTAL foram tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.  
.....151

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela IV.1-Lista de linhas celulares utilizadas no presente estudo.** A origem, manipulação realizada, mutações e níveis de FOXO3a de cada uma das linhas celulares está indicado na lista. \*p-p38 refere-se a p38 no estado fosforilado. ....34

**Tabela IV.2-Lista de fármacos e compostos naturais utilizados no estudo.** O solvente e o fornecedor de cada composto e fármaco estão indicados. ....38

**Tabela IV.3-Lista dos extratos proteicos, pigmentares, celulares de Haloarqueas e dos extratos de microalgas e péptidos e frações de Alg11 utilizados no estudo.** O solvente, o fornecedor e a concentração dos péptidos e frações estão indicados. ....39

**Tabela IV.4-Lista de anticorpos primários e secundários utilizados nos *westerns blots* deste estudo.** O fornecedor, o número de catálogo, a diluição, a espécie e o solvente estão indicados. \* p-Akt e p-FOXO3a refere-se a Akt e FOXO3a no estado fosforilado, respetivamente. \*\* GAPDH= Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.....49

**Tabela IV.5-Valores de referência dos rácios entre Abs<sub>260</sub> e A<sub>280</sub> e rácios entre Abs<sub>260</sub> e Abs<sub>230</sub>.** A análise da pureza do ARN extraído de amostras é feita por comparação dos valores dos rácios Abs<sub>260</sub> e A<sub>280</sub> e dos rácios entre Abs<sub>260</sub> e Abs<sub>230</sub> obtidos com os valores de referência destes mesmos rácios. O valor do rácio Abs<sub>260</sub> /A<sub>280</sub> deve ser aproximadamente 2. O valor do rácio Abs<sub>260</sub> /A<sub>230</sub> deve estar entre 2 e 2,2. Se os valores obtidos forem inferiores a estes valores, o RNA está contaminado <sup>[151]</sup>. ....51

**Tabela IV.6-Lista dos iniciadores utilizados nos Rt-qPCRs deste estudo.** O sentido, sequência dos oligos, tamanho, fornecedor e concentração dos iniciadores utilizados estão indicados. ....54

**Tabela V.7-Compostos selecionados por cMAP.** A ferramenta bioinformática cMAP permitiu obter uma lista de compostos que promovem um perfil transcricional inverso ao de TRIB2 quando sobre-expresso. Estão apenas representados os compostos com melhores scores de enriquecimento e *P-value* <sup>[73,74]</sup>. Dados da tese de doutoramento da aluna Susana Machado. ....58

**Tabela X.1. - Dados de identificação dos extratos proteicos, pigmentares, celulares, de *Haloarqueas* e de microalgas utilizados no estudo.** O código original e código atribuído aos extratos de microalgas, assim como a espécie e o solvente de extração estão indicados..... 142

**Tabela X.2. - Dados de identificação das frações do extrato da microalga Alg11 utilizados no estudo.** O nome atribuído às frações, assim como a espécie e o solvente de extração do extrato da microalga Alg11 estão indicados.....143

**Tabela X.3. -Dados de identificação dos péptidos utilizados no estudo.** O nome original e código atribuído aos péptidos, assim como a sua espécie e o tamanho estão indicados.....144

**Tabela X.4. -Análise qualitativa dos extratos de microalgas Alg1-Alg18.** A observação de células U2OS FOXO tratadas com os extratos de microalgas Alg1-Alg18 através de microscopia fluorescente permitiu analisar a localização subcelular da proteína FOXO-GFP. As células também foram tratadas com o controlo positivo-Leptomomicina B- e com os controlos negativos- DMSO e etanol.....144

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

**Equação IV.1- Fórmula utilizada para o cálculo do número de células por mililitro de suspensão celular.** A concentração de células, ou seja, o número de células por mililitro de suspensão celular é calculado pela fórmula apresentada. O número de células nos quadrantes, é contado e dividido pelo número de quadrantes. Neste caso, contou-se o número de células nos quadrantes A, B, C e D e dividiu-se por 4. A média obtida é multiplicada pelo Fator de diluição. Neste caso, o Fator de diluição era 2 (10  $\mu$ L da mistura de 10  $\mu$ L de suspensão celular + 10  $\mu$ L de Azul de Tripano). No final, o valor é corrigido através do Fator de correção da câmara. Este Fator corresponde ao inverso do volume da câmara. O volume da câmara é 0,1 mm<sup>3</sup> (1mm x 1mm x 0,1mm), equivalente a 0,1  $\mu$ L ou 10<sup>-4</sup> mL. O inverso do volume da câmara é 1/10<sup>-4</sup> ou 10<sup>4</sup>. A fórmula aplicada neste caso foi ((A+B+C+D) / 4 x 2 x 10<sup>4</sup>). .....37



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### A

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGC	Proteínas Cinases A, B e C
AML	Leucemia Mieloide Aguda
APS	Peroxodissulfato de diamônio
ARN	Ácido Ribonucleico
ARN Seq	Sequenciação de ARN
ATP	Adenosina Trifosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

### B

b-g-p	$\beta$ -Glicerol Fosfato
BIM	Proteína 11 semelhante ao Bcl-2
BM	Medula óssea
BSA	Albumina de soro bovino

### C

CCMAR	Centro de Ciências do Mar
Cdc25	Ciclo de Divisão Celular 25
cADN	ADN complementar
CDK	Cinase dependente de ciclina
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C/EBP	Proteína de Ligação ao Intensificador CCAAT
CEIMAR	<i>Campus de Excelencia Internacional Global del Mar</i>
CNIO	<i>Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas</i>
cMAP	Mapa de Conectividade
CPNPC	Cancro do Pulmão de Células Não-Pequeñas
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbono
COP1	Proteína Fotomorfogénica Constitutiva 1
COX-2	Ciclo-Oxigenase-2
CRM1	Proteína de Manutenção da Região Cromossômica 1
CST	Tampão de Lise Celular
CT	C-terminal
CP	<i>Crossing Point</i>
CT	<i>Threshold Cycle</i>

## D

<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DBD</b>	Domínio de ligação ao ADN
<b>DEPC</b>	Dietil Pirocarbonato
<b>DEPTOR</b>	Proteína de Interação a mTOR que contém o domínio DEP
<b>DMEM</b>	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DYRK1a</b>	Cinase 1A de Dupla especificidade Regulada por Fosforilação de Tirosina

## E

<b>EBSS</b>	Solução salina equilibrada de <i>Earl</i>
<b>ECL</b>	Reagente quimioluminescente melhorado
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Ácido bis-(2-aminoetil) Etilenoglicol-NNN'N'-tetracético
<b>eIF4E</b>	Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica 1
<b>ERK</b>	Cinase regulada por Sinal Extracelular
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigénio
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América

## F

<b>FasL</b>	Ligando Fas
<b>FKBP12</b>	Proteína 12 de ligação ao FK506
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead transcription Factors of O class</i>

## G

<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GH</b>	Hormona de crescimento
<b>GDP</b>	Guanosina Difosfato
<b>GTP</b>	Guanosina Trifosfato

## H

<b>HRP</b>	Peroxidase de Rábano Silvestre
------------	--------------------------------

**H<sub>2</sub>O**                   Água  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**                 Peróxido de Hidrogénio

## **I**

**IGF-1**                   Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1  
**IL-1 $\beta$**                  Interleucina 1 $\beta$   
**iNOS**                   Óxido Nítrico-Sintase Induzível

## **J**

**JNK**                    Cinase c-Jun N-terminal

## **K**

**kDA**                    Kilo Daltons

## **L**

**LC3-II**                 Proteína 1 associada aos Microtúbulos de cadeia leve 3-II

## **M**

**Mac1**                    Antígeno do Macrófago-1  
**MAPKK**                Proteína Cinase Ativada por Mitogénio  
**mARN**                 ARN mensageiro  
**MDM2**                 *Mouse double minute 2 Homologue*  
**MEK**                    Cinase regulada por Sinal Extracelular Ativado por Mitogénio  
**MEK1**                 Cinase regulada por Sinal Extracelular Ativado por Mitogénio 1  
**MEK2**                 Cinase regulada por Sinal Extracelular Ativado por Mitogénio 2  
**MgCl<sub>2</sub>**                 Cloreto de Magnésio  
**mLST8**                Proteína 8 Letal em Mamíferos com Sec13  
**MMP**                   Metaloproteinase da matriz  
**mSIN1**                 Proteína de Interação da Cinase de Mamíferos Ativada por Stress 1

**mTOR** Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos  
**mTORC1** Complexo 1 do mTOR  
**mTORC2** Complexo 2 do mTOR

## N

**NaCl** Cloreto de sódio  
**NES** Sequência de Exportação Nuclear  
**NLS** Sinal de Localização Nuclear  
**NPC** Complexo de Poros Nucleares  
**NO** Óxido nítrico

## O

**OMS** Organização Mundial de Saúde  
**OVO4** Ortovanadato de Sódio

## P

**PBL** Leucócitos do Sangue Periférico  
**PBS** Tampão fosfato-salino  
**PDGF** Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas  
**PDK1** Proteína Cinase-1 Dependente de Fosfoinosítídeo  
**Pen/Strep** Penicilina/Estreptomicina  
**PFA**  
**PH** Homologia da Pleckstrina  
**PIC** Cocktail de Inibidores de Protéases  
**PIKK** Proteína Cinase Relacionada com PI3K  
**PIP<sub>2</sub>** Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato  
**PIP<sub>3</sub>** Fosfatidilinositol 3,4,5-Trifosfato  
**PI3K** Fosfatidilinositol-3-cinase  
**PKB** Proteína Cinase B  
**PKC** Proteína Cinase C  
**PPAR $\gamma$**  Recetor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma  $\gamma$   
**PRAS40** Substrato de Akt rico em Prolina, de 40 kDa  
**PTEN** Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato 3-Fosfatase  
**PUMA** Modelador de apoptose por sobre regulação de p53

## Q

**qPCR** PCR quantitativo

## R

<b>Raptor</b>	Proteína Reguladora Associada ao mTOR
<b>Recetor 5-HT2A</b>	Recetor de Serotonina 2A
<b>Rictor</b>	Proteína Companheira de mTOR Insensível à Rapamicina
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RTK</b>	Recetor Tirosina Cinase
<b>RT-qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa da Transcrição Reversa em Tempo Real

## S

<b>S6K1</b>	Proteína Cinase Ribossomal S6 $\beta$ -1
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SD</b>	Desvio padrão
<b>SDS-Page</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
<b>sGK</b>	Cinase Regulada por Soro e Glucocorticoides
<b>SEM</b>	Erro padrão da média
<b>Ser253/S253</b>	Serina 253
<b>Ser315/S315</b>	Serina 315
<b>Ser473/S473</b>	Serina 473
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SH3</b>	Homologia Src 3
<b>SMAD3</b>	Mães contra o homólogo decapentaplégico 3 4
<b>SMAD4</b>	Mães contra o homólogo decapentaplégico 4
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de Nucleotídeo Único

## T

<b>TAB</b>	Tecido Adiposo Branco
<b>TAD</b>	Domínio de transativação
<b>TBS-T</b>	Tampão Salino Tris com <i>Tween 20</i>
<b>TEMED</b>	N, N, N, N-Tetrametil-Etilenodiamina
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de Transformação do Crescimento $\beta$
<b>Thr32/T32</b>	Treonina 32
<b>Thr308/T308</b>	Treonina 308
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>TRAIL</b>	Ligando Indutor de Apoptose Relacionado com o TNF
<b>TRIB</b>	<i>Tribbles</i>
<b>TRIB2</b>	<i>Tribbles homolog2</i>
<b>TZD</b>	Tiazolidinediona

## U

**UE** União Europeia

## V

**VEGF** Fator de Crescimento Endotelial Vascular  
**V600E** Substituição da valina (V) localizada na posição 600 pela glutamina (E)  
**V600K** Substituição da valina (V) localizada na posição 600 pela lisina (K)

## X

**XPO1** Exportina 1  
**4E-BP1** Proteína 1 de ligação ao eIF4E  
 $\alpha$  Alfa  
 $\beta$  Beta



## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1. CANCRO E ENVELHECIMENTO**

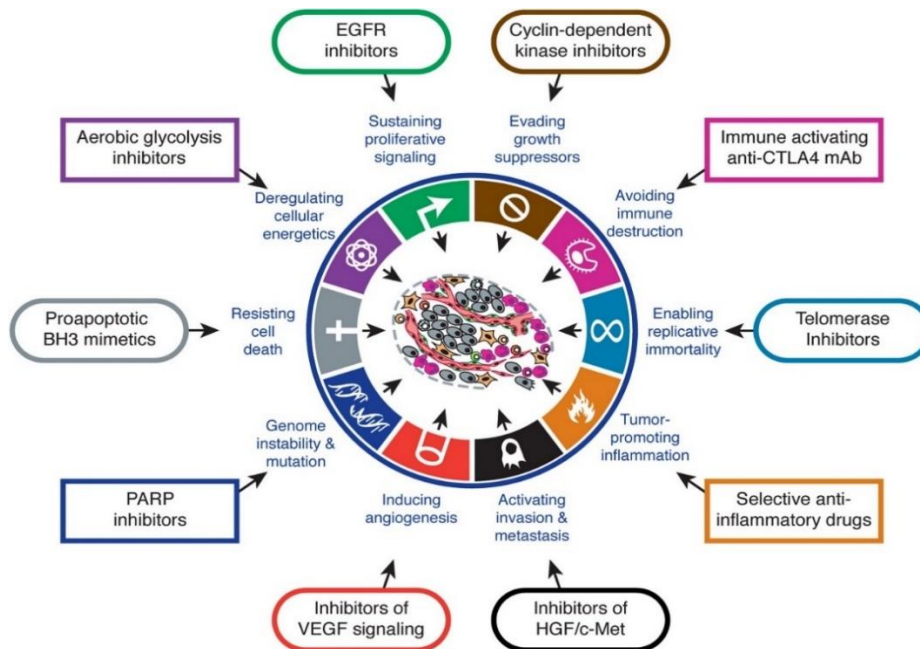
#### **I.1.1 Cancro**

O cancro consiste na segunda causa de morte mundial e, segundo as últimas estatísticas publicadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é a causa de 9,6 milhões de mortes em todo o mundo em 2018 <sup>[1]</sup>. Os dados anteriormente divulgados, em 2012, demonstravam que o cancro foi responsável por 8,2 milhões de mortes a nível mundial <sup>[1,2]</sup>.

As células são a unidade básica estrutural dos seres vivos e, no seu conjunto, formam os tecidos e órgãos de um organismo, cada um com uma função específica. Após o processo de formação dos tecidos e órgãos, existem células que mantêm a capacidade de crescer e dividir, o que possibilita a regeneração de tecidos e reparação de lesões <sup>[3-5]</sup>. Na divisão celular ocorre a replicação do Ácido Desoxirribonucleico (ADN) pelo que este processo é altamente controlado e regulado. Isto com vista a evitar erros na replicação do ADN e garantir o normal crescimento e divisão das células de um tecido. Quando ocorrem erros que não são detetados e corrigidos durante este processo, podem surgir mutações ativadoras ou inativadoras em genes que regulam o ciclo celular, nomeadamente em proto-oncogenes e/ou em genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes que promovem o ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor inibem o ciclo celular. Quando as células apresentam mutações que não são detetadas e/ou corrigidas pelos sistemas de reparação celulares, crescem e proliferam descontroladamente. Consequentemente, cada uma destas células pode transformar-se numa célula cancerígena e, eventualmente, resultar na formação de um tumor. Os tumores dividem-se em benignos e malignos. Os tumores benignos são constituídos por células bem diferenciadas e crescem localmente no tecido de origem. No entanto, os tumores malignos (cancro) possuem células pouco diferenciadas, com capacidade de migrar e invadir os tecidos adjacentes e, eventualmente, metastizar em locais distantes. No processo de metastização, as células cancerígenas são transportadas através da corrente sanguínea ou do sistema linfático para órgãos distantes do tumor primário, onde podem formar tumores secundários e afetar a normal estrutura e função do tecido onde se encontram <sup>[4-7]</sup>.

A transformação de células normais em cancerígenas é denominada carcinogénese, um processo complexo e progressivo que envolve vários passos <sup>[5-7]</sup>. Assim, o cancro é um crescimento e proliferação anormal de células e é definido como um conjunto de doenças, e não como uma

doença, dada a heterogeneidade intra e intertumoral que o definem [3-7]. Ainda assim, *Hanahan* e *Weinberg* descreveram a existência de características que são adquiridas por todas as células com fenótipo maligno. Estas características são designadas por *hallmarks* do cancro e consistem na sustentação da sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogénese, ativação da invasão e metástase, mutações e instabilidade genómica, inflamação promotora de tumor, reprogramação metabólica e evasão à destruição pelo sistema imune (Figura I.1) [8].



**Figura I.1.- Representação esquemática das *hallmarks* do cancro.** Para uma célula se tornar cancerígena necessita de adquirir certas características, nomeadamente sustentação da sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogénese, ativação da invasão e metástase (*hallmarks* inicialmente propostas em 2000), mutações e instabilidade genómica, inflamação promotora de tumor (*hallmarks* adicionadas em 2011), reprogramação metabólica e evasão à destruição pelo sistema imune. Adaptado de *Hanahan D. and Weinberg R., "The Hallmarks of cancer", Cell, 2011* [8]

### I.1.2. Envelhecimento

Como referido anteriormente, após a formação dos tecidos e órgãos, existem células que mantêm a capacidade de crescer e dividir e este processo é altamente controlado e regulado. As células contêm sistemas de controlo do ciclo celular, assim como sistemas de reparação de erros no ADN. Para além disso, quando os erros celulares são irreparáveis, as células entram em morte

celular [4-6]. Este controlo celular é extremamente importante uma vez que os organismos multicelulares são expostos a fatores internos, como produtos metabólicos, e externos, como dieta, hábitos, ambiente, que danificam as células. Assim, estes sistemas garantem o bom funcionamento do organismo. No entanto, as células vão envelhecendo e a eficácia destes mecanismos vai diminuindo gradualmente, o que resulta na acumulação de erros celulares a diferentes níveis [4,5,9, 10].

O envelhecimento é um processo complexo e multifatorial que ocorre em todos os organismos e resulta de uma deterioração progressiva dos processos metabólicos e da integridade fisiológica das células [4,6,9]. A origem deste processo está associada a nove mecanismos celulares e moleculares comuns nos diferentes organismos, designados por *hallmarks* do envelhecimento e que consistem na instabilidade genómica, no encurtamento dos telómeros, nas alterações epigenéticas, na perda da proteostase, na desregulação das vias de deteção de nutrientes, na disfunção mitocondrial, na senescência celular e na alteração da comunicação intercelular (Figura I.2) [10-12]. Estes mecanismos são influenciados, por um lado, por fatores genéticos e, por outro lado, por fatores ambientais.



**Figura I.1-Representação esquemática das *hallmarks* do envelhecimento.** Existem mecanismos celulares e moleculares que estão associados ao envelhecimento, nomeadamente a instabilidade genómica, o encurtamento dos telómeros, as alterações epigenéticas, a perda da proteostase, a desregulação das vias de deteção de nutrientes, a disfunção mitocondrial, a senescência celular, e a alteração da comunicação intercelular. Adaptado de *Otín C., Blasco M., Partridge L., Serrano M., and Kroemer G., “The Hallmarks of aging”, Cell, 2013* <sup>[11]</sup>

Os estudos realizados demonstraram que as nove *hallmarks* do envelhecimento ocorrem simultaneamente no organismo e que apresentam uma relação de dependência. No entanto, ainda não existe conhecimento relativamente à inter-relação existente entre os diferentes mecanismos, o que é essencial para desenvolver estratégias que confirmam proteção contra o envelhecimento <sup>[10-13]</sup>.

### **I.1.3. Relação entre cancro e envelhecimento**

Muitas células mantêm a capacidade de divisão após o processo de formação dos tecidos e órgãos estar terminado, permitindo a regeneração de tecidos e reparação de lesões. Em segundo lugar, durante a vida de um ser humano, acontecem cerca de  $10^{16}$  divisões celulares e, em cada uma delas podem ocorrer erros que, se não forem reparados, resultam em mutações genéticas. As células

envelhecem e, tal como explicado anteriormente, os mecanismos de reparação celular que impedem o desenvolvimento de células com mutações, perdem a eficácia ao longo do tempo, pelo que o número de erros nas células acumulados aumenta <sup>[4,5]</sup>. Como consequência, o risco de desenvolvimento de doenças como o cancro aumenta com o envelhecimento do organismo.

Neste sentido, o cancro é uma consequência colateral da capacidade de regeneração de tecidos e reparação de lesões que o organismo possui durante o seu tempo de vida. A prova disto é que animais com ciclos de vida curtos que são constituídos, quase exclusivamente, por células pós-mitóticas, perdem a capacidade de divisão celular após o processo de formação de órgãos e tecidos terminar e têm uma baixa probabilidade de desenvolver cancro. É o caso do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) que apresenta 959 células pós-mitóticas, tem um ciclo de vida de apenas cerca de 20 dias e não desenvolve cancro. Há apenas registo de alguns tumores na linha germinativa de *C. elegans*, porém é muito raro <sup>[5,12, 14]</sup>.

Neste seguimento, os mecanismos que impedem o aparecimento e acumulação de danos celulares podem conferir simultaneamente proteção contra o cancro e contra o envelhecimento <sup>[9,11,13]</sup>. Um destes mecanismos consiste na regulação do metabolismo das células, dado que uma das *hallmarks* do cancro e do envelhecimento é, respetivamente, reprogramação metabólica e disfunção mitocondrial <sup>[13]</sup>. A presença adequada de nutrientes para as células é fundamental para produzir energia e garantir a manutenção do organismo e isto é conseguido através de processos metabólicos. A mitocôndria é a principal responsável pelo fornecimento de energia às células, mas também é a maior fonte de produção de Espécies Reativas de Oxigénio (ERO). Estas espécies, em concentrações baixas, favorecem processos de sinalização e regulação das células, porém, em concentrações excessivas, podem provocar danos em macromoléculas como o ADN e favorecer o envelhecimento e desenvolvimento de cancro. Desta forma, a regulação do metabolismo celular é essencial para garantir o equilíbrio entre a produção destas espécies e a ação de agentes antioxidantes nas células, permitindo evitar um stress oxidativo, ou seja, uma produção excessiva de ERO <sup>[4-6,13]</sup>.

Neste sentido, existem diferentes mecanismos que permitem regular o metabolismo celular e diminuir a produção de ERO, e que, conseqüentemente, convergem na proteção contra o envelhecimento e contra o cancro. A diminuição da atividade da via de sinalização de Hormonas de Crescimento (GHs)/Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF1) é um exemplo disso

mesmo. Esta via promove a proliferação celular e a inibição da apoptose e a sua regulação foi o primeiro mecanismo a ser associado à longevidade animal [15,16].

Esta via de sinalização foi descoberta através de estudos genéticos no nematódeo anteriormente abordado, *C. elegans*, o que reflete a importância deste animal na área de investigação do envelhecimento. O nematódeo *C. elegans*, é um organismo pequeno (1 mm de comprimento) e de rápido desenvolvimento introduzido por *Sydney Brenner* em 1963 [15, 18].

Em 1970, *Michael Klass* e *David Hirsh* iniciaram estudos com este organismo modelo e, posteriormente, em 1983, *Klass* isolou oito mutantes de *C. elegans* que viviam mais (maior ciclo de vida) que os organismos não mutantes e este foi, na verdade, o primeiro estudo do envelhecimento com este organismo modelo. Em acréscimo, mostrou que *C. elegans* tem um ciclo de vida maior e menor descendência, quando submetida a restrição calórica ou a baixas temperaturas [15-17]. Paralelamente, outros investigadores como *Johnson T. et al* (1990), continuaram o trabalho de *Klass*, descobrindo mutantes com um ciclo de vida 40% maior, e começaram a utilizar este organismo para estudar genes envolvidos no envelhecimento [15,16,19].

Os estudos subsequentes permitiram a identificação da via de sinalização GH/IGF-1 que, como já referido, foi a primeira via de sinalização estabelecida que regula o envelhecimento [15].

A via GH/IGF-1 está associada à via de sinalização Fosfatidilinositol-3-cinase/ Proteína Cinase B (PI3K/PKB ou Akt) que regula a localização e atividade das proteínas FOXO. Existem estudos que demonstram que a atividade de Akt aumenta com a senescência celular e regula negativamente o tempo de vida útil de células endoteliais humanas cultivadas em laboratório [21,23].

Para além disso, também existem estudos em populações de humanos que demonstram que a presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em proteínas FOXO, como a FOXO3a, também estão associadas a um aumento da esperança de vida [13-24,25]. Estas variantes na sequência de FOXO3a conferem proteção contra insuficiência cardíaca congestiva e estão correlacionadas com menores níveis de insulina, menor risco de fraturas ósseas e maior capacidade física e cognitiva, o que resulta num melhor estado de saúde generalizado. No entanto, os alelos de FOXO3a associados à longevidade são intrónicos, o que significa que o efeito destas SNPs em FOXO3a é a nível da sua expressão génica e não da proteína. Há ainda dois SNPs em FOXO1 associados à esperança média de vida das mulheres [13, 22-24].

Em acréscimo, existem diversas investigações mais recentes que se focam no estudo do mecanismo responsável pelo efeito de FOXO3a na longevidade humana uma vez que ainda não se

encontra concretamente estabelecido. *Sanese. P. et al* (2019) foca-se no SNP rs2802292 que regula positivamente a expressão de FOXO e promove a resposta desta proteína a estímulos de stress. Assim, o estudo sugere que o mecanismo pelo qual SNP rs2802292 regula o efeito de FOXO3a na longevidade é através da expressão dinâmica do FOXO3 em resposta a estímulos ambientais, e não pela expressão constitutiva desta proteína [20].

As proteínas FOXO regulam a expressão de muitos genes envolvidos na apoptose, na proliferação e noutros processos celulares e, quando ativadas, conferem proteção não só contra o envelhecimento, como também contra o cancro. Por outras palavras, a ativação desta proteína é um mecanismo convergente, ou seja, com efeitos semelhantes no cancro e no envelhecimento, motivo pelo qual se desenvolvem fármacos e/ou estratégias terapêuticas que resultam na ativação de FOXO [11-13].

Existem também mecanismos divergentes, ou seja, mecanismos que protegem o organismo contra o cancro, mas simultaneamente impedem a longevidade. É o caso do encurtamento dos telómeros que tem como objetivo impedir a proliferação celular excessiva. Se por um lado, impede o desenvolvimento de células cancerígenas, por outro lado limita a regeneração a longo prazo e, consequentemente, a longevidade [11, 13, 22, 23].

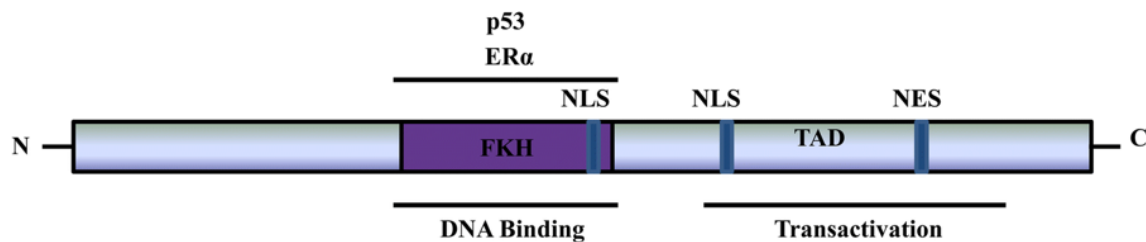
No entanto, o presente trabalho está focado nos mecanismos convergentes, mais concretamente, em compostos capazes de ativar FOXO para potencial aplicação futura em terapêuticas anticancerígenas e antienvhecimento.

## **I.2. FATORES DE TRANSCRIÇÃO FOXO**

As proteínas FOXO pertencem a uma família de fatores de transcrição, FOX, que se caracteriza pelo seu Domínio de Ligação ao ADN (DBD) altamente conservado, o *forkhead box*. Este domínio consiste numa sequência de cerca de 110 aminoácidos localizada na região N-terminal que permite a ligação desta proteína ao sítio de ligação do ADN [26-29]. Este subgrupo de proteínas em específico, em mamíferos, é constituído por quatro membros: FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6, que são expressos ubiquitivamente em mamíferos. Em particular, FOXO1 e FOXO4 são expressos de forma mais abundante no tecido adiposo e músculo-esquelético, enquanto FOXO3 é mais abundante no cérebro, coração, rim e baço. Relativamente a FOXO6, é expresso essencialmente no cérebro tanto em desenvolvimento como adulto [30,31].

Os quatro membros apresentam grande homologia a nível da sequência e, para além do DBD conservado, são compostos por mais três domínios funcionalmente diferentes: um Sinal de Localização Nuclear (NLS) localizado *downstream* do DBD, uma Sequência de Exportação Nuclear (NES) e um Domínio de Transativação (TAD) C-terminal [26-28,30]. A estrutura de FOXO está representada na Figura I.3.

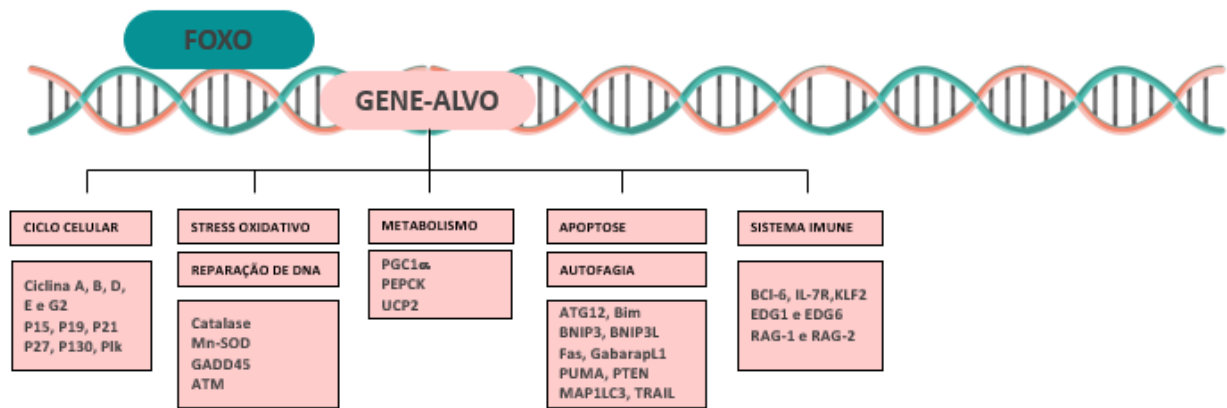
Os fatores de transcrição, como FOXO, são proteínas que têm a função de se ligar ao ADN de um gene-alvo e regular a sua transcrição. Os domínios DBD e o TAD são essenciais para este processo, dado que o primeiro reconhece uma sequência específica do ADN do gene-alvo, denominada por sítio de ligação do ADN e o segundo contém locais de ligação para outras proteínas, como co-reguladores de transcrição. No caso específico de FOXO, a expressão dos genes alvo é controlada através do seu DBD, o *forkhead box* [32-34]. No entanto, este processo só é iniciado quando FOXO está localizado no núcleo. Neste sentido, existe uma pequena sequência de aminoácidos que direciona a proteína para o núcleo, quando necessária: NLS. Existe ainda outra pequena sequência de aminoácidos, NES que, contrariamente à sequência NLS, marca a proteína para ser exportada do núcleo para o citoplasma da célula. Para além disso, o domínio NLS das proteínas FOXO não apresenta a estrutura clássica uma vez que está bipartido em dois *clusters* de resíduos de arginina e lisina [28,35,36].



**Figura I.2-Representação esquemática da estrutura das proteínas FOXO humano.** As proteínas FOXO são constituídas pelo DBD *forkhead box* (roxo), representado por FKH; pelo NLS, pela NES e pelo TAD. O domínio DBD permite a ligação de FOXO ao ADN e o TAD permite a ligação de FOXO a outras proteínas. As sequências NLS e NES marcam FOXO para ser importado ou exportado do núcleo, respetivamente. Adaptado de Liu Y., Ao X., Ding W., Ponnusamy M., Wu W., Hao X., Yu W., Wang Y., Lil P. e Wang J., “Critical role of FOXO3a in carcinogenesis”, *Molecular Cancer*, 2018 [29]

Portanto, estas proteínas funcionam como reguladores transcricionais uma vez que, quando se encontram no núcleo, controlam a transcrição de genes alvo envolvidos em diversos processos

biológicos, nomeadamente: diferenciação, metabolismo, longevidade, stress, apoptose, tumorigénese e proliferação, crescimento e sobrevivência celulares. Como consequência, FOXO é essencial na paragem do ciclo celular em G1, uma vez que ativa inibidores do ciclo celular (p21, p27); na proteção das células contra erros no ADN e na indução da morte celular dado que modula a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas (Proteína 11 semelhante ao Bcl-2 (BIM), Modelador de apoptose por sobre regulação de p53 (PUMA), ligando Fas (FasL) e Ligando Indutor de Apoptose Relacionado com o TNF (TRAIL)) [26-29,30,37]. Estes são apenas alguns exemplos de genes regulados por estas proteínas, estando os vários genes alvo de FOXO representados na Figura I.4.



**Figura I.3-**Genes-alvo de FOXO. Os fatores de transcrição FOXO, quando se encontram no núcleo, regulam a expressão de genes-alvo envolvidos em diferentes processos celulares, nomeadamente o ciclo celular, stress oxidativo, reparação de ADN, metabolismo, apoptose, autofagia e sistema imune. Adaptado de Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., & Rishi, A. K., “Akt, FoxO and regulation of apoptosis”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011 [31]

### I.2.1. Regulação de FOXO

Todos os processos biológicos controlados por FOXO são fundamentais na proteção contra o cancro e contra o envelhecimento, motivo pelo qual a sua atividade tem de ser altamente controlada. Este controlo é realizado através de ligação do ADN, degradação proteica e alteração da localização subcelular, sendo que a regulação de FOXO é principalmente realizada por modificações pós-traducionais- fosforilação, metilação, glicosilação, acetilação, desacetilação e mono ou poliubiquitinação [26-28,30].

Das diferentes modificações pós-traducionais enunciadas anteriormente, destaca-se a fosforilação pela Akt em resposta à insulina ou a fatores de crescimento, dado que é o principal mecanismo de inativação de FOXO. No entanto, estas proteínas também podem ser reguladas pela fosforilação não mediada pela Akt. Em condições de stress oxidativo, FOXO pode, ainda, ser desacetilado ou monoubiquitinado. O primeiro aumenta a capacidade de ligação de FOXO ao ADN e o segundo aumenta a atividade transcricional. Por fim, a poliubiquitinação de FOXO resulta na sua degradação proteica [28, 38].

A ativação desta proteína está dependente da regulação da sua localização subcelular que é mediada através da translocação nucleocitoplasmática.

### **I.2.1.1. Transporte núcleocitoplasmático de FOXO**

O genoma das células eucarióticas encontra-se separado do citoplasma por uma barreira física, o invólucro nuclear, a qual tem de ser atravessada para que ocorra transporte núcleocitoplasmático de macromoléculas. Os Complexos de Poros Nucleares (NPCs), estruturas proteicas que atravessam a membrana nuclear das células, são os responsáveis por este transporte [4,20].

As moléculas de pequeno peso molecular atravessam os poros nucleares de forma passiva. No entanto, as macromoléculas como o Ácido Ribonucleico (ARN) e proteínas como FOXO necessitam de auxílio de proteínas do NPC, as nucleoporinas. Estas proteínas reconhecem o NLS e o NES que se encontra na sequência de proteínas com peso molecular superior a 40 Kilo Daltons (KDa). O processo de importação e exportação é regulado por uma família de pequenas proteínas G que se ligam e hidrolisam a Guanosina Trifosfato (GTP), as Ran-GTPases [4, 39,40].

Na importação, o NLS da sequência de uma proteína é reconhecido por recetores de importação nuclear, as importinas, as quais se ligam e formam um complexo que atravessa o poro nuclear. No interior do núcleo, a proteína Ran-GTP liga-se ao complexo importina/substrato, o que resulta na libertação do substrato e na exportação do complexo importina/Ran-GTP para o citoplasma. Neste compartimento, ocorre a hidrólise de GTP, originando Ran-Guanosina Difosfato (GDP) que se dissocia da importina. A importina fica livre para uma nova importação e a proteína Ran-GDP regressa ao núcleo, onde troca GDP por GTP e fica novamente ativa [39-42].

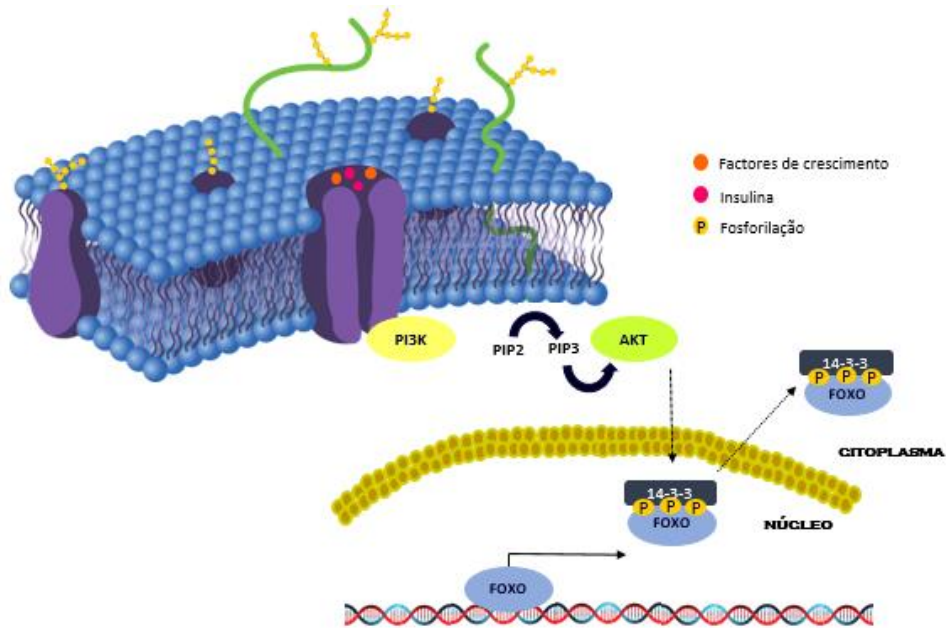
Na exportação, o mecanismo é semelhante. O NES é reconhecido por recetores de exportação nuclear, as exportinas. A principal exportina e melhor estudada é a Proteína de Manutenção da Região Cromossômica 1 (CRM1), também conhecida por Exportina 1 (XPO1) ou proteína de

exportação nuclear (CRM1). As exportinas, quando migram para o núcleo, ligam-se a Ran-GTP, que aumenta a afinidade à proteína a ser transportada e promove a ligação. O complexo exportina/substrato/Ran-GTP atravessa o NPC em direção ao citoplasma. De forma idêntica, ocorre a hidrólise de GTP e é originado Ran-GDP, que se dissocia do complexo. Simultaneamente, a proteína transportada também é libertada e a exportina fica livre para uma nova exportação [4, 28, 35,36, 39-43].

Face ao constante ritmo e importância do transporte núcleocitoplasmático, este processo é cuidadosamente controlado de forma a garantir que as proteínas são importadas para o núcleo quando necessárias e que, em situação contrária, estas são exportadas para o citoplasma. É o caso de fatores de transcrição como FOXO que estão localizados no citoplasma quando a sua função não é necessária para as células. Este controlo consiste numa estratégia celular para prevenir possíveis ativações aberrantes. No entanto, as células cancerígenas utilizam a localização aberrante de proteínas supressoras de tumores e de oncoproteínas para as inativar e ativar, respetivamente [4,28,35].

### I.2.2 Via de sinalização PI3K/Akt

FOXO são proteínas supressoras de tumor e fazem parte da via de sinalização mais frequentemente mutada em câncros humanos, a via PI3K/Akt (Figura I.5).



**Figura I.4--Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/FOXO.** A via PI3K, quando ativa, resulta na exportação e inativação de FOXO. A ativação desta via é iniciada através da ativação de RTKs pela ligação de ligandos extracelulares ao recetor. Quando os RTKs estão ativos existem várias proteínas intracelulares como PI3K que se podem ligar. PI3K fica ativa e fosforila PIP2, originando PIP3. Este fosfolípido liga-se a Akt, permitindo que este fique ativo ao ser fosforilado por outras proteínas. A ativação de Akt permite a sua dissociação da membrana plasmática, de forma a fosforilar diferentes substratos downstream como FOXO. A fosforilação de FOXO em três resíduos de aminoácidos por Akt promove a ligação da proteína 14-3-3. Seguidamente, ocorre a exportação nuclear do complexo FOXO-14-3-3, mediada por CRM1, para o citoplasma. Consequentemente, FOXO fica inativo pelo que não induz a transcrição de genes alvo. Adaptado de Wilkin D., Brainard J. *CK-12 Conceptos Biología*, 2015 [46].

A ativação desta via é iniciada através da ligação de ligandos extracelulares, como fatores de crescimento (IGF1) e hormonas (insulina), ao Recetor Tirosina Cinase (RTK) e consequente dimerização e transautofosforilação deste recetor. Por um lado, isto resulta na criação de sítios de ancoragem para diferentes proteínas e, por outro lado, resulta na atividade de cinase [25, 35,43, 45]. Quando os RTKs estão ativos existem várias proteínas intracelulares que se podem ligar. PI3K é um exemplo disso e liga-se aos resíduos de tirosina fosforilados do recetor do Fator de Crescimento

Derivado de Plaquetas (PDGF) através de um domínio SH2 no p85. Como consequência, a subunidade catalítica p110 de PI3K fica ativa e a sua proximidade ao substrato Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato (PIP<sub>2</sub>), que se encontra na membrana plasmática, permite fosforilá-lo, originando Fosfatidilinositol 3,4,5-Trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Por sua vez, este fosfolípido liga-se ao domínio de Homologia da Pleckstrina (PH) de Proteína Cinase-1 Dependente de Fosfoinosítídeo (PDK1) e Akt, ativa PDK1 e permite a aproximação na membrana plasmática destas duas proteínas. A proteína PDK1, quando ativa, fosforila a proteína Akt na Treonina 308 (Thr308). No entanto, a atividade de cinase de Akt só é ativa quando PDK2 ou mTORC2 fosforilam a sua Serina 473 (Ser473) [35, 41, 44, 56]. A ativação de Akt permite a sua dissociação da membrana plasmática, de forma a fosforilar diferentes substratos *downstream*. A Akt é uma cinase serina/treonina expressa ubiquitivamente nos diferentes tecidos que regula diferentes processos biológicos, nomeadamente o crescimento, proliferação e sobrevivência celulares, assim como o metabolismo do glicogénio. Esta regulação é feita não só a nível do desenvolvimento das células normais, como também na carcinogénese e é feita pela fosforilação dos substratos. Por sua vez, a principal forma de regular Akt é através da ativação do mensageiro secundário PI3K. A ativação de Akt por esta via, ativa a expressão de genes que promovem a sobrevivência e de genes anti-apoptóticos.

A regulação da sobrevivência celular por Akt envolve a inibição direta de proteínas pró-apoptóticas como *Bad* e FOXOs. A inibição consiste na fosforilação de FOXO em três resíduos da sequência de FOXO3a conservados em diferentes espécies: a Treonina 32 (Thr32), a Serina 253 (S253) e a Serina 315 (S315). A fosforilação destes resíduos introduz uma carga negativa em FOXO que afeta a função do domínio NLS e, simultaneamente, promove a ligação da proteína 14-3-3. Seguidamente, ocorre a exportação nuclear do complexo FOXO-14-3-3, mediada por CRM1, para o citoplasma. Consequentemente, FOXO fica inativo pelo que não induz a transcrição de genes alvo [30,45,46]. Como referido anteriormente, FOXOs medeiam a paragem do ciclo celular, reparação de ADN e apoptose pelo que quando esta proteína é fosforilada por Akt, fica inativa e acumulada no citoplasma, resultando na sobrevivência celular. Isto porque a fosforilação de FOXO por Akt provoca a diminuição da expressão de reguladores negativos do ciclo celular como p27 e p130 e de proteínas pró-apoptóticas como TRAIL [29,30].

Esta via, quando ativa, promove a proliferação e crescimento celular pelo que quando os recetores de tirosina cinase desta via, a PI3K, a Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato 3-Fosfatase (PTEN) ou a Akt estão mutados num cancro, a via está constitutivamente ativa e FOXO está

sequestrado no citoplasma. E, de facto, FOXO encontra-se no citoplasma e inativo em diversos tipos de cancros. No entanto, na ausência de insulina, de fatores de crescimento, ou sob condições de stress, Akt não se encontra ativa pelo que não fosforila FOXO, o que permite a sua translocação para o núcleo da célula de forma a ativar a transcrição de genes alvo [27, 28, 38, 45].

Esta via encontra-se frequentemente mutada em diferentes tipos de cancros e as mutações mais frequentes são na PTEN (proteína que desfosforila PIP<sub>3</sub>, convertendo-o em PIP<sub>2</sub>) e na subunidade catalítica de PI3K. Isto revela, não só a importância da via de sinalização PI3K/Akt no processo tumorigénico, mas também que, não só a Akt, como as proteínas *up* e *downstream* são potenciais alvos terapêuticos no cancro. Assim, a sua inibição consiste numa estratégia anticancerígena e, de facto, foram desenvolvidos diversos compostos que têm como alvos, componentes chave desta via para garantir a funcionalidade de FOXO [10,30,38,44].

### **I.2.2.1. Reativação de FOXO**

A subfamília FOXO tem um papel importante na manutenção da homeostase dos tecidos e existem evidências de que estas proteínas se encontram desreguladas no cancro. As primeiras descobertas neste sentido mostraram uma associação entre translocações cromossómicas responsáveis por cancros humanos e a perda de função de proteínas FOXO. O que sugere que a perda de função de FOXO pode ter um papel importante no processo carcinogénico [29,30,46]. Para além disso, existem estudos que revelam que a sobreexpressão e localização nuclear de proteínas FOXO inibe o crescimento e tamanho do tumor *in vivo* e *in vitro* uma vez que promove a paragem do ciclo celular, a apoptose e inibe a angiogénese. Por outro lado, existia uma correlação entre a presença de FOXO no citoplasma e baixa sobrevivência de pacientes com cancro da mama.

Como referido previamente, FOXO controla muitos processos biológicos. Em acréscimo, a inativação destas proteínas é uma característica de muitos cancros humanos. Na maior parte deles, FOXO encontra-se inativo devido, maioritariamente, à fosforilação de Akt e ativação excessiva da via de sinalização PI3K/Akt provocada por mutações em PTEN e PI3K, como abordado anteriormente, e na proteína Ras [30].

Desta forma, a reativação de FOXO é uma abordagem terapêutica anticancerígena importante que consiste em ativar a atividade biológica supressora de tumor de FOXO e, conseqüentemente, induzir a expressão dos seus genes alvo. Isto através da manipulação de reguladores desta proteína, ou seja, de repressores ou ativadores de FOXO [30,31,44].

Na verdade, existem duas formas de garantir que FOXO se encontra ativo no núcleo. A primeira consiste na translocação de FOXO citoplasmático para o núcleo enquanto a segunda consiste no aprisionamento de FOXO nuclear neste mesmo compartimento (Figura I.6) [28,30,31].



**Figura I.5-Esquema representativo das estratégias de reativação de FOXO.** A manutenção de FOXO nuclear e translocação de FOXO citoplasmático compreendem duas estratégias para garantir a localização nuclear e, conseqüente, ativação de FOXO.

A título exemplificativo, uma destas estratégias consiste na utilização de inibidores de PI3K e de Akt, proteínas que regulam negativamente FOXO e fazem com que esta proteína fique inativa no citoplasma das células. Assim, a inibição de PI3K e de Akt permite a translocação de FOXO para o núcleo. *Kau et al* identificou, através de uma triagem de alto conteúdo baseado em imagem, compostos com capacidade de manter FOXO1 no núcleo através da modulação do seu transporte nucleocitoplasmático. Dezanove dos compostos identificados consistiam em inibidores de exportação de proteínas que inibiam CRM1. Os restantes vinte e três compostos eram pequenas moléculas inibidoras que inibiam a via de sinalização PI3K/Akt/FOXO1 [27, 48].

Em acréscimo, diversos fármacos anticancerígenos demonstraram ter a capacidade de ativar FOXOs através da diminuição da atividade de Akt. O primeiro exemplo é o *paclitaxel* que, em linhas celulares MCF-7, sensíveis a este fármaco, aumentou a expressão de FOXO3a, dos níveis de ARN mensageiro (mARN) e proteína de um dos seus genes alvo, o BIM e da relocalização nuclear de FOXO3a. Esta última, através da inibição da via PI3K/Akt pela Cinase c-Jun N-terminal (JNK), dado que fosforila FOXO3A. Esta fosforilação diminui a interação entre FOXO3a e a proteína 14-3-3 pelo que não ocorre exportação nuclear desta proteína [49, 50]. O segundo exemplo

é KP372-1, um inibidor de cinases múltiplo, que ao inibir vias críticas para a sobrevivência de leucemia mielóide aguda (AML), como a via PDK1/Akt, aumenta a atividade de FOXO [30,51,52].

Assim, as proteínas FOXO são fundamentais para a ação de determinados fármacos anticancerígenos, o que significa que proteínas com a capacidade de reprimir a atividade de FOXO poderão conferir resistência a terapias anticancerígenas. *Tribbles homolog 2*, mais conhecida como TRIB2, é um exemplo de proteína descrita como repressora de FOXO [53].

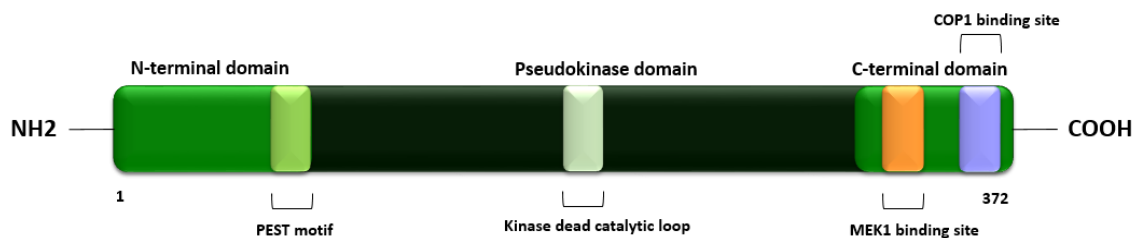
### I.3. PROTEÍNAS *TRIBBLES* (TRIB)

As proteínas são macromoléculas biológicas complexas responsáveis por inúmeras funções no organismo. Muitas proteínas encontram-se evolutivamente relacionadas, pelo que apresentam sequências e/ou características estruturais idênticas [4-6, 54]. A família de proteínas TRIB é um exemplo disto uma vez que são altamente conservadas entre espécies. Estas proteínas foram inicialmente descobertas em *Drosophila*, no ano 1990, devido à sua importância na morfogénese [46-48]. Isto é explicado pela capacidade das TRIB se ligarem a duas proteínas homólogas da fosfatase Ciclo de Divisão Celular 25 (Cdc25) - a *String* e a *Twine* - e induzirem a sua degradação pelo proteossoma. Consequentemente, as células ficam paradas na fase G2 do ciclo celular e a mitose é inibida [54,56,57]. Em acréscimo, interferem com a oogénese de *Drosophila* uma vez que controlam o *turnover* do Fator de transcrição *Slbo*, proteína homóloga de Proteína de Ligação ao Intensificador CCAAT (C/EBP), via ubiquitinação proteossómica. Esta proteína controla os níveis e atividade de fatores de transcrição, afetando a divisão, desenvolvimento e destino celulares.

Posteriormente, foram descobertas proteínas homólogas de TRIB de *Drosophila* em *Xenopus* (Xtrb2), nemátodos (Nipi-3) e em mamíferos ((TRIB1, c8fw ou SKIP1), (TRIB2, c5fw ou SKIP2) e (TRIB3, NIPK, SINK ou SKIP3)) [54,57-59].

A nível estrutural, são constituídas por uma região N-Terminal, um domínio central serina/treonina *cinase-like* e uma região C-terminal [54,57]. A região N-Terminal destas proteínas consiste numa região rica em serina e prolina de cerca de 60 a 80 resíduos de aminoácidos, o que permite a ligação do domínio de Homologia Src 3 (SH3) e do domínio WW, assim como a fosforilação dependente de prolina de outras proteínas [54, 60]. As diferentes proteínas da família TRIB divergem nesta região pois, embora TRIB2 apresente alguma conservação, TRIB1 e TRIB3 têm pouca homologia [54,57]. O domínio *cinase-like* é evolutivamente conservado, o que significa que é crucial para o funcionamento destas proteínas. Este domínio é extremamente semelhante ao

das cinases, possuindo a capacidade de se ligar a proteínas dependentes de cinases. No entanto, os 12 subdomínios do domínio *cinase-like* das TRIB apresentam diferenças do domínio cinase canónico. A principal diferença é a ausência de alguns aminoácidos conservados do centro catalítico das proteínas cinase no domínio de ligação à Adenosina Trifosfato (ATP) [61]. Por último, C-terminal consiste numa região de cerca de 35-45 resíduos, rica em aminoácidos com carga que é essencial para o estabelecimento de interações proteína-proteína [55,60]. Esta região tem duas sequências conservadas: Proteína Fotomorfogénica Constitutiva 1 (COP1) e um domínio de ligação à proteína Cinase regulada por Sinal Extracelular Ativado por Mitogénio 1 (MEK1). O primeiro domínio tem como função a ligação a ubiquitina ligases E3, enquanto que o segundo serve de intermediário à interação entre *TRIB* e múltiplas Proteínas Cinases Ativadas por Mitogénio (MAPKKs) [57,60]. A estrutura de *TRIB* está representada na Figura I.7. Em termos de homologia, TRIB1 e TRIB2 partilham 71%, TRIB1 e TRIB3 partilham 53% e TRIB2 e TRIB3 partilham 54% da sequência.



**Figura I.6-Estrutura da família de proteínas *TRIB*.** As *TRIB* são constituídas pelo domínio N-Terminal, domínio pseudocinase central sem atividade catalítica (*kinase dead catalytic loop*) e domínio C-terminal. O domínio N-Terminal contém o *PEST motif* e o C-Terminal os sítios de ligação a MEK1 (*MEK1 binding site*) e COP1 (*COP1 binding site*), altamente conservados. Adaptado de Johnston J. & Kiss-Toth E., «*TRIB1 (Tribbles Pseudokinase 1)*. », *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2015. [62]

Estas proteínas estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares pelo que são expressas ubiquitariamente em órgãos como o rim, o coração, a pele, Leucócitos do Sangue Periférico (PBL) e Tecido Adiposo Branco (TAB). Não obstante, TRIB1 é também expresso no fígado, no cérebro, no intestino delgado, na Medula Óssea (BM) e no pâncreas. Por outro lado, TRIB2 é expresso no cérebro, no timo, nos pulmões e no baço. Relativamente ao TRIB3, não só é expresso no timo, nos pulmões e no baço, como também no fígado, no intestino delgado, na BM,

na próstata, nos neurônios, no músculo esquelético e no estômago <sup>[57,63]</sup>. No que diz respeito à localização celular destas proteínas, TRIB1 e TRIB3 estão preferencialmente localizados no núcleo. No entanto, a localização de TRIB2 não é tão linear. Segundo a maioria dos estudos, TRIB2 encontra-se no citoplasma, porém existem alguns estudos que descrevem a presença de TRIB2 no núcleo das células. Assim, esta proteína encontra-se maioritariamente, mas não somente, no citoplasma <sup>[54, 57, 63,64]</sup>. No entanto, a interpretação destes dados deve ter em conta que os estudos relativamente à localização destas proteínas foram todos realizados com recurso a proteínas sobre-expressas artificialmente e não com os seus níveis endógenos.

O mecanismo de ação destas proteínas é pouco conhecido, mas sabe-se que funcionam como proteínas *scaffold* ou adaptadores e que facilitam a degradação por ubiquitinação de ubiquitina ligases E3 ligadas ao domínio COP1. Os mecanismos celulares nos quais estas proteínas estão envolvidas são a regulação de fatores de transcrição, metabolismo de lípidos e glucose, inflamação, stress celular, sobrevivência, apoptose, diferenciação e cancro <sup>[55,56, 58, 64-66, 68]</sup>.

Estas proteínas encontram-se sobre-expressas em diferentes tipos de cancros humanos, nomeadamente melanoma, cancro do pulmão, cancro do fígado e Leucemia Mieloide Aguda (LMA) <sup>[64,69]</sup>. No entanto, ainda estão a ser realizados estudos em vários modelos celulares com o objetivo de clarificar as bases moleculares desta associação. Por um lado, foi proposto que TRIB3 inibe Akt, aparentando funcionar como proteína supressora de tumor. Por outro lado, TRIB1 aparenta funcionar como oncogene na LMA <sup>[55, 60, 64, 65, 71, 72]</sup>.

### **I.3.1. TRIB2**

TRIB2 também funciona como oncogene na LMA, uma vez que medeia a degradação do Fator de transcrição C / EBP $\alpha$ , no cancro do pulmão e do fígado <sup>[58,66,68]</sup>.

Em acréscimo, o laboratório Link mostrou que existe uma correlação entre os níveis de TRIB2 e os estágios e progressão do melanoma. A sobreexpressão de TRIB2 tem a capacidade de promover o crescimento de células de melanoma e a tumorigénese *in vivo*. Consequentemente, o silenciamento contínuo desta proteína diminui o fenótipo maligno das células do melanoma e inibe a tumorigénese *in vivo* <sup>[53, 70]</sup>.

Este laboratório também identificou TRIB2 num *screening* genético de larga escala como repressor da atividade de FOXO. O estudo mostrou que níveis elevados de TRIB2 promovem o crescimento e sobrevivência de células de melanoma pela desregulação da atividade de FOXO.

Os níveis elevados de TRIB2 nos pacientes com melanoma estão correlacionados com maior ativação de Akt. Isto porque o domínio COP1 de TRIB2 se associa a Akt, resultando numa maior fosforilação da Ser473 de Akt via mTORC2 e, conseqüentemente, numa maior ativação de Akt e proliferação e sobrevivência celular. Por um lado, quando a Akt se encontra ativo, reprime FOXO3a uma vez que o fosforila e leva à sua degradação proteossômica. Por outro lado, ativa uma ubiquitina ligase E3: *Mouse double minute 2 Homologue* (MDM2) - que leva à degradação de p53. Assim, a apoptose mediada por p53 é inibida e pode resultar na proliferação descontrolada de células cancerígenas [29,30, 42, 72].

Paralelamente, TRIB2 confere às células resistência a inibidores de PI3K e/ou Akt como o BEZ235, onde inibe significativamente a eficácia do fármaco. Isto porque, como explicado anteriormente, o domínio COP1 de TRIB2 promove a ativação de Akt, independente de PI3K e, conseqüentemente, reprime FOXO3a e a atividade de p53 [50].

A translocação nuclear de FOXO é uma estratégia promissora para o tratamento de diversos cânceres e existem estudos que demonstram que esta translocação induz a apoptose em diversas linhas celulares *in vitro*. Uma vez que TRIB2 foi descrito como repressor de FOXO, repressores desta proteína constituem possíveis bons alvos para terapia anticancerígena [53,67].

### **1.3.2. TRIB2 e compostos naturais**

Neste sentido, existem dois compostos naturais, nomeadamente Harmina e Piperlongumina, que podem ter a capacidade de translocar FOXO para o núcleo. Isto porque, segundo a ferramenta bioinformática denominada Mapa de Conectividade (cMAP), apresentam potencial para induzir um perfil transcricional inverso ao de TRIB2 [73,74].

#### **3.2.1. Harmina**

Harmina é um alcalóide beta ( $\beta$ )-carbonílico fluorescente que, embora se encontre presente em diferentes organismos e plantas, foi inicialmente isolado das plantas *Peganum harmala* da região Mediterrânea Oriental e *Banisteriopsis caapi* do Sul da América [75- 77]. Este composto natural foi descoberto por ser um inibidor da monoamina oxidase A (MAO-A), um recetor de superfície celular, dado que se liga seletivamente à mesma. A MAO-A é responsável pela desaminação oxidativa de monoaminas, que incluem neurotransmissores, hormonas e diversos fármacos alucinogénios. A ligação de um inibidor a esta enzima impede este mecanismo pelo que

os inibidores de MAOS são frequentemente utilizados como antidepressivos [67-72]. Este composto interage com outros recetores, nomeadamente os recetores de imidazolina e o Recetor de Serotonina 2A (5-HT<sub>2A</sub>) [75, 80, 81].

Os estudos iniciais deste composto descrevem, ainda, a sua capacidade de regular a expressão de recetores ativados por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ s) através da inibição da via de sinalização Wnt. Os PPAR $\gamma$ s são os principais responsáveis pela regulação da diferenciação dos adipócitos, a adipogénese, e estão associados ao processo patológico de diversas doenças, nomeadamente, diabetes, obesidade, aterosclerose e cancro. Neste sentido, os estudos efetuados sugerem que a Harmina mimetiza os efeitos de agonistas de PPAR $\gamma$ s como a Tiazolidinediona (TZD) ao aumentar os níveis de glucose no sangue. Em acréscimo, Harmina promove uma resposta anti-inflamatória dos PPAR $\gamma$  ao reduzir a expressão de diferentes proteínas, como o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), a Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), o Óxido Nítrico-Sintase Induzível (iNOS), F4/80 e o Antígeno do Macrófago-1 (Mac1) [75, 73].

Na medicina tradicional, a planta *Peganum harmala* era utilizada no tratamento de doenças, cancro inclusive e existem muitos estudos que reportam diversos efeitos farmacológicos de Harmina [76-78]. Neste sentido, estudos preliminares revelaram que esta planta possui atividade citotóxica em diferentes linhas celulares [75, 76, 82]. Os estudos seguintes permitiram observar que Harmina, um dos componentes da planta, tem a capacidade de isoladamente inibir a topoisomerase do tipo I humana uma vez que contém a amina  $\beta$ -carbolina na sua estrutura [76, 78, 83]. Outros estudos, descrevem Harmina como um agente genotóxico e recombinante [68, 70, 76]. Em acréscimo, este composto foi também descrito como um inibidor específico de cinases dependentes de ciclinas (CDKs), nomeadamente a Cdk1/ciclina B, a Cdk2/ciclina A e a Cdk5/p25), assim como potente inibidor da proliferação celular [76, 78, 85]. Posteriormente, *Chen Q. et al*, *Jahaniani F. et al* (2005) e, mais recentemente, *Lamchouri F. et al* (2013) e *Li C. et al* (2017) descreveram que este composto apresenta, não só, elevada atividade citotóxica, como também, atividade anticancerígena [75, 76, 82, 86- 89].

Harmina tem, ainda, a capacidade de inibir a angiogénese, *in vitro* e *in vivo*, através da diminuição da formação, proliferação e migração de células endoteliais, assim como pela redução da expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogénicos como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o Óxido Nítrico (NO), a Ciclo-Oxigenase-2 (COX-2), as Metaloproteinases da matriz (MMPs), entre outros [76, 78, 89].

Por fim, existem estudos que demonstram que a capacidade de Harmina inibir a proliferação celular, em certas linhas celulares, deve-se ao seu efeito em vias de sinalização que envolvem Akt [90- 92]. Um dos estudos refere que este composto promove a paragem do ciclo celular e a apoptose mediada pela via mitocondrial em linhas celulares de cancro colorretal humano SW620 através da inibição das vias de sinalização de Akt e Cinase regulada por Sinal Extracelular (ERK). Foi observada uma diminuição, não só de ERK e Akt fosforilados (Ser473 e Thr308), mas também de alvos como FOXO3a [90, 91].

O segundo estudo descreve que derivados de Harmina promovem a apoptose em linhas celulares de cancro gástrico humano BGC-823 através da produção de ERO intracelular e inibição da via PI3k/Akt [91, 92].

Existe, também, um estudo que apresenta Harmina como um potente indutor de apoptose e autofagia justificada pela inibição da via Akt/mTOR/ Proteína Cinase Ribossomal S6  $\beta$ -1 (S6K1). No entanto, esta inibição está relacionada com os efeitos de Harmina nas proteínas *Beclin-1*, Proteína 1 associada aos Microtúbulos de cadeia leve 3-II (LC3-II) e p62 [88,91].

No que diz respeito a FOXO, há estudos que mostram que Harmina estimula a acumulação nuclear de FOXO1a e FOXO3a *in vitro*. Em 2007, Harmina foi descrita como inibidor potente e específico de Cinase 1A de Dupla especificidade Regulada por Fosforilação de Tirosina (DYRK1a), uma cinase que fosforila as proteínas FOXO (num sítio de fosforilação diferente de Akt) e, promove a sua saída do núcleo. Ao inibir DYRK1a, FOXO não é fosforilado e fica acumulado no núcleo [77, 91, 93-96].

Assim, de acordo com a ferramenta cMAP, Harmina é um composto com potencial para induzir um perfil transcricional inverso ao de TRIB2 [73,74]. É, ainda, um composto natural com diversas propriedades, nomeadamente, anticancerígenas que se devem, essencialmente, à amina  $\beta$ -carbolina presente na sua estrutura. Embora o mecanismo de ação deste composto ainda não seja conhecido, existe associação com a via PI3K/Akt/FOXO, pelo que pode servir como base para a síntese de diversos fármacos anticancerígenos para aplicação terapêutica [77, 90-92].

### **I.3.2.2. Piperlongumina**

Piperlongumina é um composto ativo biológico e natural isolado da planta *Piper longum*, a qual pode ser encontrada no sul da Índia e no sudeste da Ásia. Ainda assim, esta não é a única fonte natural deste composto uma vez que existem outras espécies de plantas das quais este composto

pode ser extraído [97-99]. Inicialmente, era utilizado em medicina tradicional para extrair a placenta das grávidas e no tratamento de diversas doenças como a malária, gonorreia, infecções respiratórias, tumores, entre outros.

A Piperlongumina foi isolada em 1961, porém as suas propriedades biológicas e farmacológicas só começaram a ser estudadas e conhecidas há relativamente pouco tempo. Algumas das propriedades deste alcalóide são: ansiolítico, antidepressivo, antidiabético, anti microbial, anti-inflamatório e antiplaquetário [97-100]. Não obstante, o principal interesse deste composto é a sua atividade anticancerígena em múltiplos tipos de cancros, propriedade descoberta através dum *screening de 5166* amostras realizado entre 2000 e 2007 [97,98,100].

A atividade anticancerígena de Piperlongumina está, essencialmente, associada a três mecanismos: inibição da exportação nuclear de proteínas, produção de ERO em células cancerígenas e inibição da via PI3K/Akt/mTOR, os quais estão relacionados [97-102,104-107].

O primeiro mecanismo ocorre porque Piperlongumina é um inibidor de proteínas envolvidas neste processo celular, é o caso de CRM1. Como referido anteriormente, CRM1 é a principal exportina envolvida na exportação nuclear pelo que, a sua inibição impede a exportação e subsequente inativação de proteínas supressoras de tumor para o citoplasma. Alguns estudos mostram que FOXO1, p21 e p53 são algumas das proteínas que ficam acumuladas no núcleo das células, quando tratadas com Piperlongumina [98, 100-102, 104].

O segundo mecanismo consiste nas propriedades citotóxicas e citostáticas deste composto, as quais são seletivas e foram observadas *in vitro* em diferentes linhas celulares como, as de cancro da mama, próstata, pulmão e cólon, e *in vivo* como ensaios com ratinhos. A indução de acumulação de ERO em células cancerígenas por Piperlongumina resulta na morte celular [91-93, 95]. Não obstante, o alcalóide também promove a morte celular através da regulação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR, p38/JNK, MAPK/ERK e NF-κB, que resulta na ativação de mecanismos celulares como a apoptose e a autofagia [97, 100, 101, 103, 105-107].

O terceiro mecanismo, à semelhança do anterior, resulta na apoptose de células cancerígenas. A via de sinalização PI3K/Akt/ mTOR tem um papel fulcral no crescimento, proliferação e sobrevivência celular e, como referido anteriormente, encontra-se frequentemente ativa e/ou mutada em diferentes tipos de cancro. Assim, a inibição desta via permite a ativação de diversas proteínas supressoras de tumor que induzem a apoptose. A título exemplificativo, estudos em linhas celulares de cancro cervical, de cancro da mama e de cancro gástrico mostram que

quando esta via é inibida por Piperlongumina, FOXO3a é desfosforilado e translocado para o núcleo, onde induz a apoptose de células cancerígenas mediada por BIM [97,99-101, 107].

Por fim, Piperlongumina é ainda um agente anti-metastático, inibindo a migração e capacidade invasiva de linhas celulares altamente metastáticas. Simultaneamente, apresenta propriedades anti-angiogénicas dado que diminui a expressão e/ou níveis proteicos de fatores essenciais no processo da angiogénese, nomeadamente o VEGF, proteínas da matriz extracelular e proteínas de adesão célula-matriz [98-101].

Em suma, Piperlongumina é um dos compostos com um perfil transcricional inverso ao de TRIB2 selecionado pelo cMAP [74,75]. À semelhança de Harmina, é um composto natural com diversas propriedades, nomeadamente, anticancerígenas. No entanto, alguns dos mecanismos de ação são conhecidos e estão associados à via PI3K/Akt/mTOR e inibição da exportação nuclear de proteínas supressoras de tumor. Assim, à semelhança de Harmina, este composto também pode servir como base para a síntese de diversos fármacos anticancerígenos para aplicação terapêutica [97, 99-101, 107].

Não obstante, existem outros compostos com propriedades anticancerígenas que apresentam elevado potencial de aplicação terapêutica, nomeadamente os produtos naturais.

#### **I.4. PROPRIEDADES ANTICANCERÍGENAS DE PRODUTOS NATURAIS**

Os produtos naturais são utilizados pelo homem, há muitos anos, no tratamento de diversas doenças. A medicina tradicional era baseada na utilização destes produtos e as plantas tiveram um papel central nesta área durante muito tempo. No entanto, no século XX, os produtos naturais começaram a ser utilizados pela indústria farmacêutica e, atualmente, mais de 50% dos fármacos comercializados têm origem na extração ou síntese química de fontes naturais [108-110]. A morfina, a aspirina e a penicilina são apenas alguns exemplos de fármacos muito utilizados que têm origem natural [109,110].

Por sua vez, o oceano é uma das principais fontes de produtos naturais dado que constitui 70% da superfície terrestre e tem uma biodiversidade única. E, de facto, existem cada vez mais compostos naturais de organismos marinhos utilizados clinicamente. É o caso das algas-microalgas e macroalgas- que são utilizadas não só na área da alimentação e cosmética, como na indústria farmacêutica [108, 109- 112]. São vários os estudos realizados em microalgas, extratos de microalgas ou componentes derivados de microalgas uma vez que têm muitas propriedades

farmacológicas, e muitas são importantes na área da investigação do cancro, nomeadamente atividade antioxidante, anti-proliferativa, anticancerígena, anti-inflamatória e citotóxica [112,113-118]. Polissacarídeos (*fluicodans*), pigmentos como a ficocianina, a clorofila, feotina, carotenoides (fucoxantina e sifonaxantina) são apenas alguns dos muitos compostos isolados com propriedades anticancerígenas e elevado potencial para estratégias terapêuticas [116-118].

Também as Haloarqueas ou Halobactérias são utilizadas na indústria farmacêutica. Estes microrganismos consistem numa das classes de *Euryarchaeota* e são considerados halófilos e extremófilos. Isto significa que se desenvolvem em ambientes com uma elevada concentração de sal [119,120, 121]. As condições em que as Haloarqueas vivem fizeram com que estas sofressem diversas adaptações metabólicas. Essas mesmas adaptações fizeram com que estes microrganismos sejam frequentemente utilizados em estudos uma vez que consistem numa fonte natural, promissora e inovadora de diferentes biomoléculas com bastante interesse e importância na área da biotecnologia. É o caso de enzimas resistentes a elevadas temperaturas, carotenoides, entre outros [119, 122, 123]. Como referido anteriormente, as microalgas também apresentam carotenoides, os quais estão descritos pelo seu potencial anticancerígeno. No entanto, existem poucos estudos referentes a carotenoides de organismos extremófilos comparativamente a organismos não extremófilos [121,123,124]. O principal carotenoide produzido pelas haloarqueas é a bacterioruberina e os estudos relativamente aos carotenoides isolados de haloarqueas revelam propriedades anticancerígenas, antioxidantes e anti-proliferativas em diversas linhas celulares cancerígenas, como é o caso de linhas celulares de cancro do fígado e linhas celulares de cancro da próstata [há, df]. *Haloterrigena turkmenica*, *Halogeometricum rufum*, *Halogeometricum limi*, *Haladaptatus litoreus*, *Haloplanus vescus* e *Halopelagius inordinatus* são algumas das espécies das quais foram identificados carotenoides com propriedades antioxidantes e anticancerígenas [121, 125].

Em acréscimo, estes microrganismos secretam diversos polissacarídeos com utilidade na indústria têxtil, do petróleo, tratamento de águas residuais e na produção de plásticos biodegradáveis [123].

Tal como referido anteriormente, o cancro consiste na segunda causa de morte mundial. Embora existam diversos fármacos anticancerígenos, estes não são aplicáveis a todos os tipos de cancro, dada a heterogeneidade característica desta doença. Em acréscimo, as células cancerígenas desenvolvem resistência a alguns fármacos anticancerígenos. Como consequência, continua a existir a necessidade de desenvolver novos agentes terapêuticos. O potencial anticancerígeno das

algas está a ser investigado desde 1980 e existem muitos estudos efetuados e outros a decorrer [108, 116, 118]. O potencial anticancerígeno das haloarqueas começou a ser investigado em 1960, porém existem poucos estudos comparativamente às algas [121, 123, 124].

Existe um projeto denominado AlgaRED+ que corresponde a uma cooperação entre especialistas espanhóis e portugueses que tem como objetivo principal o desenvolvimento de produtos inovadores com microalgas. O projeto está a ser desenvolvido numa área entre o Algarve e a Andaluzia influenciada pelo Oceano Atlântico uma vez que contém ecossistemas de grande riqueza e biodiversidade. Neste sentido, as microalgas deste projeto podem apresentar um potencial farmacológico em várias áreas de investigação, incluindo a do cancro e, mais concretamente, através da interferência na localização de FOXO.

Não obstante, existem fármacos anticancerígenos com atividade e efeitos conhecidos previamente que não apresentam estudos relativamente possível interferência na localização de FOXO. É o caso dos inibidores de mTOR que afetam a via PI3K/Akt/mTOR, a via de sinalização mais mutada em cancros humanos e da qual FOXO integra. No entanto, não existem estudos relativamente ao possível efeito destes fármacos na localização de FOXO [27,28,38, 118,126].

## **1.5. INIBIDORES DE MTOR**

O mTOR pertence à família de serina/treonina cinases, proteínas cinase relacionadas com PI3K (PIKKs) que é caracterizada por três regiões de homologia: domínio FAT, domínio catalítico PIKK e domínio FATC. A proteína mTOR possui, aditivamente, o domínio FRB que está situado entre o domínio FAT e o domínio catalítico. mTOR é a subunidade catalítica de dois complexos proteicos distintos, mas estruturalmente e funcionalmente conservados, complexo 1 do mTOR (mTORC1) e complexo 2 do mTOR (mTORC2) [126-129]. O mTORC1 é, ainda, constituído por outros dois componentes centrais, a proteína 8 Letal em mamíferos com Sec13 (mLST8) e a proteína reguladora associada ao mTOR (Raptor), que facilita o recrutamento do substrato e garante a correta localização do complexo. Em acréscimo, este complexo possui duas subunidades que interagem e inibem a atividade de mTOR, o substrato de Akt rico em prolina, de 40 kDa (PRAS40) e a proteína de interação a mTOR que contém o domínio DEP (DEPTOR) [126,127,130,131]. A principal função de mTORC1 consiste na ativação da síntese proteica, do metabolismo de lípidos, nucleótidos e glucose, assim como a regulação do *turnover* de proteínas. A síntese proteica é

ativada pelo mTORC1 através da fosforilação dos substratos S6K1 e proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 1 (eIF4E) (4E-BP1) [127, 128].

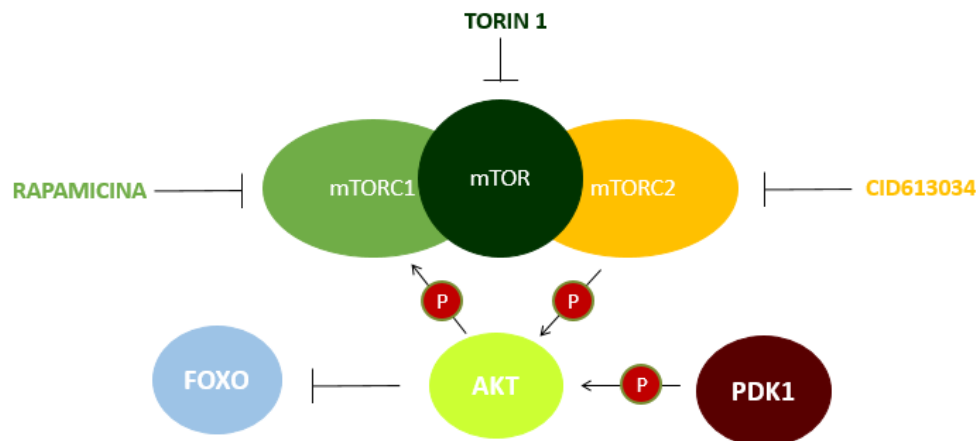
O mTORC2 contém, à semelhança de mTORC1, o mLST8 e o DEPTOR na sua estrutura. No entanto, contém um complexo com função idêntica ao Raptor, a proteína companheira de mTOR insensível à Rapamicina (Rictor) e a proteína de interação da cinase de mamíferos ativada por Stress 1 (mSIN1) [128-131]. Este complexo promove, essencialmente, a proliferação e sobrevivência celular. Isto porque fosforila e, conseqüentemente, ativa proteínas do grupo de Proteínas Cinasas A, B e C (AGC) como a Akt, cinase regulada por soro e glucocorticoides (sGK) e a proteína cinase C (PKC) as quais estão envolvidas na sobrevivência celular, anabolismo e progressão do ciclo celular. O mTORC2 fosforila a Akt na S473, uma das fosforilações necessária à sua ativação. A inativação do domínio Rictor deste complexo resulta na ausência de fosforilação da Akt em diversas espécies e em células humanas. No entanto, segundo estudos efetuados, a inibição de Akt só afeta alguns substratos, como FOXO1 e FOXO3 [130-133]. Como referido anteriormente, quando fosforilados pela Akt, estes substratos são exportados para o citoplasma, não promovendo a apoptose, e são uma estratégia frequentemente utilizada pelas células cancerígenas no processo carcinogénico [126, 127, 1231].

Assim, o mTOR encontra-se envolvido na via PI3K/ Akt /mTOR, onde se encontram os principais reguladores da sua atividade a montante, PI3K, Akt e PTEN. No entanto, existe outra via a montante importante na regulação de mTOR: MAPK/ERK. Ambas as vias estão associadas à carcinogénese [126, 131, 134].

No cancro, a ativação de mTOR pode derivar de vários mecanismos dado que a via na qual se encontra está desregulada em muitos tipos de cancro e a sua ativação constitutiva está associada à transformação e progressão tumoral [126, 128, 131, 135]. Efetivamente, como anteriormente referido, a via PI3K/ Akt, da qual FOXO também integra, é a via mais mutada nos cancros humanos e a Akt é uma das proteínas responsáveis pela inativação de FOXO. A Akt é fosforilada pelo PDK1 e, também, pelo mTORC2 e, por sua vez, fosforila mTORC1. Assim, à semelhança do que foi referido anteriormente, as proteínas *up* e *downstream* de Akt como mTORC2 e mTORC1 são potenciais alvos terapêuticos no cancro, sendo a sua inibição uma estratégia para garantir a funcionalidade de FOXO e, portanto, anticancerígena [129, 130, 133, 134].

Atualmente, existem inibidores de mTORC1 e mTORC2 bem definidos, a Rapamicina e Torin 1, respetivamente. Existem também derivados da Rapamicina: Everolimus, Deforolimus e

Temsirolimus [118, 126, 127, 135, 136]. Relativamente ao complexo mTORC2, é insensível à ação da Rapamicina e não existem inibidores bem definidos deste complexo. Não obstante, segundo Benavides-Serrato A. et al, CID613034 consiste num inovador inibidor de mTORC2 (Figura I.8) [137, 138].



**Figura I.7- Esquema representativo da relação entre três inibidores de mTOR (Rapamicina, Torin 1 e CID613034) e Akt.** A Akt pertence à via de sinalização PI3K/Akt e a sua ativação está dependente da fosforilação de PDK1 e de mTORC2. A ativação desta proteína resulta, por um lado na ativação do complexo mTORC1 e, por outro lado, na exportação e inativação de FOXO. A Rapamicina, Torin 1 e CID613034 são três inibidores de mTOR com alvos diferentes: a Rapamicina inibe mTORC1, CID613034 inibe mTORC2 e Torin 1 inibe mTOR.

### I.5.1. Rapamicina

A Rapamicina (sirolimus) é um macrólido sintetizado pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus* que foi descoberto em 1972 na ilha Rapa Nui. Este fármaco possui atividade antifúngica, imunossupressora e anticancerígeno [126, 139]. A Rapamicina liga-se à Proteína 12 de ligação ao FK506 (FKBP12), formando um complexo que inibe a atividade de mTOR ao interferir com o seu domínio FRB. A inativação de mTOR impede a ligação da proteína Raptor, necessária para a fosforilação e controlo da atividade dos fatores 4E-BP1 e S6K1. Estas proteínas são reguladoras tradicionais indispensáveis ao ciclo celular pelo que a sua desfosforilação resulta na paragem do ciclo celular em G1 [126,127, 130, 139]. Assim, este fármaco inibe diretamente o mTORC1 dado que não afeta o domínio Rictor de mTORC2. Não obstante, inibe o mTORC2 devido à

inacessibilidade de mTOR quando ligado a este fármaco. Ainda assim, existem efeitos de mTOR que não são totalmente inibidos pela Rapamicina [126-128, 136].

Os estudos efetuados mostram que a Rapamicina tem ação anticancerígena uma vez que inibe a progressão do ciclo celular, o crescimento celular e proliferação de linhas celulares cancerígenas (cancro do pulmão, glioblastoma, melanoma, entre outras) e induz a apoptose. Tem ainda a capacidade de inibir a angiogénese por diminuir um fator importante neste processo, o VEGF. No entanto, não existem estudos relativamente ao possível ou não efeito da Rapamicina na localização de FOXO [128, 135, 136].

### **I.5.2. Torin 1**

Torin 1 consiste num inibidor de mTOR extremamente potente e seletivo que compete pelo sítio de ligação do ATP. O mecanismo de ação deste fármaco permite a inibição completa tanto da fosforilação de mTORC1 como de mTORC2 e, conseqüentemente, dos substratos de mTOR [131, 133, 134, 137]. Este composto bloqueia a fosforilação de 4E-BP1 e a fosforilação de Akt na S473 mediada por mTORC2, o que permite inibir o crescimento, sobrevivência e proliferação de diversas linhas celulares cancerígenas. Em acréscimo, Torin 1 tem a capacidade de inibir os efeitos de mTOR não inibidos em células resistentes à Rapamicina. No entanto, a inibição por Torin 1, contrariamente à da Rapamicina, apresenta efeitos citotóxicos e citostáticos nas células [132, 137].

Por fim, no que diz respeito a FOXO, não existe muita informação disponível. Há estudos com linhas celulares de leucemia que, quando tratadas com Torin 1, apresentam menores níveis de expressão de genes pro-apoptóticos e menor fosforilação de FOXO1. No entanto, não foi estabelecida uma relação entre estes eventos e não existe informação sobre a localização de FOXO. Não obstante, o tratamento de linhas celulares de cancro do fígado com Torin 1 resultou num simultâneo aumento de FOXO1 nuclear e diminuição de FOXO. Neste estudo as células cancerígenas também foram tratadas com Rapamicina, a qual não teve efeitos na localização de FOXO1 [132, 136].

### **I.5.3. CID613034**

CID613034, também denominado JR-AB2-00, é um fármaco descoberto e descrito como inibidor de mTORC2. A descoberta de inibidores específicos de mTORC2 é relativamente recente

e foi desenvolvida devido a estudos em linhas celulares de glioblastoma. O glioblastoma corresponde ao cancro cerebral mais agressivo e apresenta resistência a diversas terapias anticancerígenas. No caso específico deste fármaco, foi descoberto através de um *screening* (sistema de duplo-híbrido em levedura) de pequenas moléculas com capacidade de inibir a interação entre mTOR e Rictor. O seu mecanismo de ação baseia-se na ligação ao domínio Rictor e, subsequente, inibição da sua ligação ao complexo. Este domínio é necessário para a atividade de mTORC2 pelo que a sua inibição compromete a atividade do complexo. Este inibidor demonstrou capacidade não só de inibir a atividade de cinase de mTORC2, como a sobrevivência, motilidade e capacidade de invasão de linhas celulares de glioblastoma *in vitro* [129, 138].

Posteriormente, foram desenvolvidos diversos fármacos análogos de JR-AB2-00, dos quais se destaca o JR-AB2-011. Um segundo inibidor de mTORC2, mais potente e sem efeitos de toxicidade significantes, comparativamente a CID613034 [138]. O mecanismo de ação é idêntico ao de CID613034 e os estudos efetuados permitiram observar a sua capacidade de retardar o crescimento de xenógrafos de glioblastoma *in vivo*, assim como o aumento da sobrevivência [129, 138].

Não obstante, o trametinib consiste noutra fármaco anticancerígeno com atividade e efeitos conhecidos previamente, mas que não apresenta estudos relativamente à possível interferência na localização de FOXO.

## **I.6. TRAMETINIB**

O trametinib é um inibidor não competitivo e altamente seletivo das proteínas MEK1 e MEK2. É utilizado no tratamento de melanoma metastático de pacientes que apresentam mutações caracterizadas pela substituição da valina (V) localizada na posição 600 pela glutamina (E) ou lisina (K) V600E/K do gene BRAF, respetivamente. O fármaco pode ser administrado sozinho ou em combinação com o dabrafenibe, um inibidor de BRAF. Estas mutações são frequentemente encontradas neste tipo de cancro e são caracterizadas pela substituição da valina (V) localizada na posição 600 pela glutamina (E) ou lisina (K) do gene BRAF, respetivamente [132,133,135]. Em acréscimo, é utilizado no tratamento de Cancro do Pulmão de Células Não-Pequenas (CPNPC) e no cancro da tiroide [140-144].

O mecanismo de ação do fármaco consiste em inibir a ativação e atividade de cinase, tanto de MEK1, como de MEK2. Os estudos demonstram que a proliferação celular das células

cancerígenas diminuí, ficam paradas na fase G1 do ciclo celular e entram em apoptose. No entanto, estes efeitos ocorrem não só nas células cancerígenas, como também nas normais [140, 141, 140].

MEK faz parte da via de sinalização da MAPK/ERK, a qual é responsável pela regulação de diversos processos celulares nomeadamente, diferenciação, sobrevivência, proliferação, angiogénese e migração [140, 141]. A via MAPK/ERK é composta por uma pequena proteína G -Ras- e por três cinases- Raf, MEK e ERK- e está frequentemente ativa de forma constitutiva em diversos tipos de cancro, incluindo o melanoma. As mutações nos constituintes desta via resultam na ativação constitutiva desta via e, conseqüentemente, na proliferação e sobrevivência de células cancerígenas. As mutações no gene RAF referidas anteriormente são um exemplo disso mesmo, porém, ainda que raramente aconteça, MEK também pode apresentar mutações [132, 136-138, 140].

A atividade de MEK é essencial para BRAF uma vez que ERK é o único substrato de ambas as isoformas de MEK- 1 e 2. A cascata de sinalização desta via é iniciada com a ativação da pequena proteína G, Ras, que transmite o sinal para BRAF, fosforilando-o e ativando-o. O BRAF, quando ativo, fosforila MEK1/2, o qual por sua vez fosforila ERK1/2 [140,144-146]. Este último ativa a transcrição de diferentes fatores de transcrição envolvidos nos processos celulares controlados nesta via enunciados anteriormente, como a proliferação. Assim, todas as proteínas desta via podem ser alvos de estratégias anticancerígenas [140-142, 147, 148].

Foi publicado um estudo por *Lin L. et al* (2018) onde diversos inibidores de MEK, incluindo o trametinib demonstraram ter capacidade de induzir a apoptose em células de cancro colorretal via expressão do PUMA dependente de FOXO. PUMA promove a apoptose e a sua atividade pode ser induzida através do p53 ou por outras proteínas como FOXO3a [142]. Isto significa que um dos mecanismos pelo qual o trametinib induz a apoptose de células cancerígenas está associado com a atividade de FOXO3a [141, 143, 149].

## **II. OBJETIVOS**

FOX é uma família de fatores de transcrição que, quando se encontram ativos no núcleo, controlam a transcrição de genes alvo envolvidos em diversos processos biológicos fundamentais na proteção contra o cancro e contra o envelhecimento. No entanto, esta proteína encontra-se no citoplasma e, conseqüentemente, inactiva em muitos cancros humanos.

Assim, a reativação de FOXO é importante uma vez que permite ativar a atividade biológica supressora de tumor de FOXO. A descoberta de compostos com esta capacidade de reativar a localização nuclear de FOXO pode consistir numa estratégia promissora no tratamento do cancro e de doenças associadas com o envelhecimento.

Neste sentido, o objetivo principal do presente trabalho consistiu na descoberta de diferentes compostos capazes de induzir a localização nuclear de FOXO para potencial aplicação futura em terapêuticas anticancerígenas e antienvhecimento.

### III. HIPÓTESE

Segundo o cMAP, os compostos naturais Harmina e Piperlongumina apresentam potencial para induzir um perfil transcricional inverso ao de TRIB2. A proteína TRIB2 é repressora de FOXO e existem estudos que demonstram uma associação entre Harmina e Piperlongumina e a via PI3k/Akt em algumas linhas celulares [77, 90-92, 97, 99-101, 107].

Por outro lado, as microalgas e as Haloarqueas consistem em fontes de compostos naturais com propriedades farmacológicas importantes em diversas áreas de investigação, incluindo a área do cancro. Muitos dos compostos isolados apresentam propriedades anticancerígenas e elevado potencial para estratégias terapêuticas [112,113, 116-118].

Por último, mTOR está associado ao Akt, uma cinase que inativa FOXO. O uso de compostos que inibem mTOR como a Rapamicina, Torin 1 e CID613034 são uma estratégia de terapia anticancerígena. Em acréscimo, o trametinib consiste num inibidor de MEK1 e MEK2 com atividade anticancerígena. Este fármaco induz a apoptose em células cancerígenas e um dos mecanismos descritos está associado com a atividade de FOXO3a.

Neste sentido, os compostos descritos anteriormente estão associados a FOXO e/ou à via de sinalização de FOXO, porém o potencial efeito destes compostos na localização de FOXO não se encontra definido.

Assim, de forma a cumprir o objetivo anteriormente enunciado, estabeleceu-se a hipótese que todos os compostos referidos anteriormente induzem a localização nuclear de FOXO.

## IV. METODOLOGIA

O presente estudo foi dividido em 3 abordagens diferentes: uma abordagem bioinformática, um *screening* e uma *candidate approach*, de forma a cumprir o objetivo enunciado previamente no capítulo II [13,22-24].

A abordagem bioinformática consistiu no uso de ferramentas bioinformáticas para a seleção de compostos com efeito terapêutico no contexto cancerígeno- Harmina e Piperlongumina e subsequente estudo funcional.

O *screening* foi executado com diferentes extratos de microalgas no contexto da colaboração com o Centro de Ciências do Mar (CCMAR) no projeto AlgaRED+. O *screening* foi também executado com diferentes extratos de Haloarqueas e de extratos proteicos, extratos pigmentares e extratos celulares destes mesmos microrganismos no contexto da colaboração com o *Campus de Excelencia Internacional Global del Mar* (CEIMAR) da Universidade de Huelva.

A *candidate approach* consistiu na seleção de fármacos com atividade e efeitos conhecidos, nomeadamente três inibidores da Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) - Rapamicina, *Torin 1* e CID613034- e ao Trametinib.

### IV.1. CULTURA DE CÉLULAS

Com o objetivo de estudar a capacidade de os compostos utilizados neste estudo induzirem a translocação de FOXO para o núcleo, recorreremos a um modelo celular. A cultura de células consiste num conjunto de técnicas que permite a manutenção e crescimento de linhas celulares em condições artificiais e foi utilizada no presente estudo para viabilizar a monitorização da localização subcelular da proteína FOXO.

Esta técnica requer condições controladas para evitar a introdução de microrganismos e garantir um ambiente estéril, pelo que todos os procedimentos foram executados numa câmara de fluxo laminar *biosafety class II cabinet* (Telstar®, Reino Unido), com os materiais a serem utilizados previamente autoclavados e desinfectados com etanol a 70%.

#### IV.1.1. Linhas celulares

No presente estudo foi utilizada a linha celular U2OS (linha celular de osteossarcoma humano) facultada pela *American Type Culture Collection* (ATTC). Para a linha celular U2OS,

possuímos diversas linhas isogénicas, estáveis (U2OS #770, U2OS FOXO e U2OS NES), as quais foram geradas anteriormente no laboratório e se encontram descritas na Tabela IV.1.

**Tabela IV.1-Lista de linhas celulares utilizadas no presente estudo.** A origem, manipulação realizada, mutações e níveis de FOXO3a de cada uma das linhas celulares está indicado na lista. \*p-p38 refere-se a p38 no estado fosforilado.

Linha celular	Origem	Manipulação	Mutação	Níveis de FOXO3a
U2OS PARENTAL	Osteossarcoma	-	-	Endógenos
U2OS #770	Osteossarcoma	Sobreexpressão de GFP	-	Endógenos
U2OS FOXO	Osteossarcoma	Sobreexpressão de FOXO-GFP	-	Elevados (endógeno + exógeno)
U2OS NES	Osteossarcoma	Sobreexpressão de NES-GFP	-	Endógenos

#### IV.1.2. Descongelamento de células

As linhas celulares utilizadas estavam congeladas a  $-150^{\circ}\text{C}$  em 100  $\mu\text{L}$  de Dimetilsulfóxido (DMSO-*Fisher Chemical*, Reino Unido) e 900  $\mu\text{L}$  de Meio *Eagle* Modificado por *Dulbecco*, com Ultraglutamina, 4,5 g/L de Glucose (DMEM/HIGH GLUCOSE-HyClone, Logan) e suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF -*Biowest*, América do Sul) e 1% de Penicilina/Estreptomicina 100X (Pen/Strep-PanReac *AppliChem*, Portugal). Este meio suplementado (DMEM completo) foi utilizado na cultura das linhas celulares ao longo deste projeto. Assim, o processo de descongelamento consistiu na rápida colocação do(s) tubo(s) criogénico(s) em banho termostático (*Clifton*, Reino Unido) a  $37^{\circ}\text{C}$  e posterior transferência das células para uma placa de cultivo celular de 35 mm x 10 mm com 7 mL de DMEM completo pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ . As placas foram mantidas em cultura numa incubadora *Thermo Electron Corporation 311 (AVANTEC)*, Canadá) a  $37^{\circ}\text{C}$  e com 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por meio

DMEM completo dada a citotoxicidade associada aos vestígios de DMSO que poderiam estar presentes.

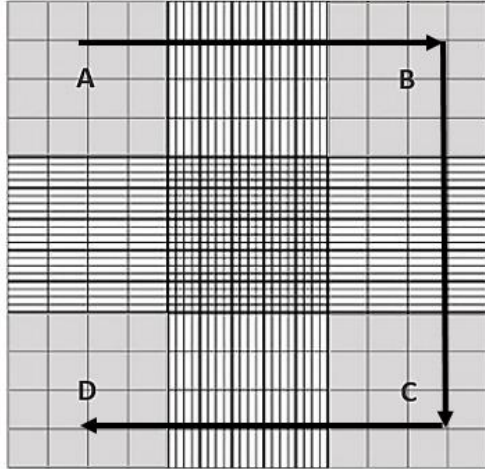
#### **IV.1.3. Manutenção e cultura das linhas células**

As células foram observadas ao Microscópio Invertido de Fluorescência (*Carl Zeiss*, Estados Unidos da América), diariamente, de forma a garantir que tinham nutrientes suficientes e o pH correto ao seu crescimento, observável pela mudança de cor do meio. Quando uma placa estava entre 80% a 90% coberta de células em monocamada, ou seja, 80% a 90% confluenta, procedeu-se à sua passagem para uma nova placa. A confluência refere-se à percentagem da superfície da placa de cultura que está coberta de células. Neste procedimento, aspirou-se o meio antigo e lavou-se as células duas vezes com cerca de 3 mL de Tampão Fosfato-Salino 1X (PBS-*VWR CHEMICALS*, Reino Unido). Este passo é extremamente importante dado que nos permite eliminar qualquer vestígio de SBF presente no meio. O SBF, quando presente, anula a ação da enzima tripsina utilizada no passo seguinte para descolar as células da superfície das placas, assim como separá-las umas das outras, sem alterar a sua forma, estrutura e metabolismo. Assim, procedeu-se à incubação a 37°C durante 5 minutos com 1 mL de tripsina 1.5 X (*Sigma Aldrich*, Estados Unidos da América (EUA)) diluída em PBS 1X. O processo de tripsinização foi interrompido através da adição de DMEM completo às células em suspensão, o qual contém SBF. As células foram recolhidas para um tubo falcon de 15 mL e centrifugadas numa centrífuga (*VWR*, Taiwan) a 1000 rotações por minuto (rpm) durante 4 minutos. Seguidamente, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio e semeadas em placas de 35 mm x 10 mm com 7 mL de meio.

Quando necessário, plaqueou-se um número exato de células de acordo com a experiência a realizar e, para o efeito, procedeu-se à contagem de células.

#### **IV.1.4. Contagem de células**

A contagem de células foi realizada com recurso a uma câmara de *Neubauer* (Blau brand, Alemanha) que é o método de quantificação direta mais utilizado em cultura de células.



**Figura IV.8- Representação esquemática dos quadrantes da câmara de Neubauer.** A câmara de Neubauer possui 9 quadrantes que permitem a contagem do número de células. Cada quadrante tem uma área de  $1 \text{ mm}^2$  ( $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ ). A profundidade da câmara é  $0,1 \text{ mm}$ . Neste estudo foi realizada a contagem do número de células viáveis nos quadrantes A, B, C e D. Os restantes quadrantes foram desprezados. No final, a média do número de células nestes 4 quadrantes foi calculada.

A câmara de *Neubauer* consiste numa lâmina de vidro dividida em 9 quadrantes externos, por sua vez constituídos por 16 quadrados internos cada. Após a centrifugação das células, retirou-se  $10 \mu\text{L}$  de suspensão de células e adicionou-se  $10 \mu\text{L}$  de Azul de Tripano (*Sigma Aldrich*, Reino Unido). O Azul de Tripano é um corante utilizado para distinguir as células viáveis e as não viáveis. As células viáveis não ficam coradas porque têm a membrana plasmática intacta e, conseqüentemente, impermeável ao corante.

No entanto, as células danificadas e/ou mortas (não viáveis), cuja membrana é permeável ao corante, apresentam coloração azul. Desta mistura, pipetou-se  $10 \mu\text{L}$  na depressão central da câmara de *Neubauer*, a partir da qual se procedeu à contagem celular por análise microscópica. Contaram-se os 4 quadrantes externos (A, B, C e D) representados no esquema da Figura IV.9 e calculou-se o número de células viáveis de acordo com a equação IV.1.

**Equação IV.1- Fórmula utilizada para o cálculo do número de células por mililitro de suspensão celular.** A concentração de células, ou seja, o número de células por mililitro de suspensão celular é calculado pela fórmula apresentada. O número de células nos quadrantes, é contado e dividido pelo número de quadrantes. Neste caso, contou-se o número de células nos quadrantes A, B, C e D e dividiu-se por 4. A média obtida é multiplicada pelo Fator de diluição. Neste caso, o Fator de diluição era 2 (10  $\mu$ L da mistura de 10  $\mu$ L de suspensão celular + 10  $\mu$ L de Azul de Tripano). No final, o valor é corrigido através do Fator de correção da câmara. Este Fator corresponde ao inverso do volume da câmara. O volume da câmara é 0,1 mm<sup>3</sup> (1mm x 1mm x 0,1mm), equivalente a 0,1  $\mu$ L ou 10<sup>-4</sup> mL. O inverso do volume da câmara é 1/10<sup>-4</sup> ou 10<sup>4</sup>. A fórmula aplicada neste caso foi ((A+B+C+D) / 4 x 2 x 10<sup>4</sup>).

$$\text{Número de células/mL} = \frac{x}{Nq} \times Fd \times Fcc$$

*x* = Soma do número de células nos quadrantes contabilizados (A, B, C, D)

*Nq* = Número de quadrantes (4)

*Fd* = Factor de diluição (2)

*Fcc* = Factor de correção da câmara (10<sup>4</sup>)

#### IV.1.5. Tratamento com compostos

Como anteriormente referido, neste estudo foram realizadas três abordagens distintas: uma abordagem bioinformática, um *screening* e uma *candidate approach*. Neste contexto, as linhas celulares foram tratadas com diferentes fármacos (BEZ235, CID613034, Leptomicina B, Rapamicina, *Torin 1*, Trametinib), pigmentos fotossintéticos (Fucoxantina), compostos naturais (Harmina, Piperlongumina), extratos de microalgas (Alg1-Alg18), extratos de Haloarquea (Alg19-Alg22 e ALg26-Alg29) e extratos proteicos (Alg23 e Alg30), extratos pigmentares (Alg24 e Alg31) e extratos celulares (Alg25 e Alg32) de Haloarquea e péptidos (Pep1, Pep2, Pep3). Em acréscimo, as linhas celulares foram tratadas com diferentes frações da Alg11 (F1-F4 e EPS). Todos estes compostos, assim como o solvente e fornecedor correspondentes estão descritos nas Tabelas IV.2 e IV.3.

**Tabela IV.2-Lista de fármacos e compostos naturais utilizados no estudo.** O solvente e o fornecedor de cada composto e fármaco estão indicados.

Composto	Solvente	Fornecedor
CID613034	<b>DMSO</b>	<i>Vitasmlab, Hong Kong</i>
Fucoxantina	<b>DMSO</b>	<b>CCMAR</b>
Leptomicina B	<b>Etanol</b>	<b>Sigma, EUA</b>
Rapamicina	<b>DMSO</b>	<b>CalbioChem, Alemanha</b>
Torin 1	<b>DMSO</b>	<b>Tocris BioScience, Reino Unido</b>
CID613034	<b>DMSO</b>	<b>Sigma, EUA</b>
Harmina	<b>DMSO</b>	<i>Acros Organics, Índia</i>
Piperlongumina	<b>DMSO</b>	<i>Cayman Chemical, EUA</i>

**Tabela IV.3-Lista dos extratos proteicos, pigmentares, celulares de Haloarqueas e dos extratos de microalgas e péptidos e frações de Alg11 utilizados no estudo. O solvente, o fornecedor e a concentração dos péptidos e frações estão indicados.**

Composto	Solvente	Fornecedor	Concentração (ng/ $\mu$ L)
Alg1	DMSO	CCMAR	39,4
Alg2	DMSO	CCMAR	66
Alg3	DMSO	CCMAR	42,8
Alg4	DMSO	CCMAR	32,2
Alg5	DMSO	CCMAR	24,6
Alg6	DMSO	CCMAR	43
Alg7	DMSO	CCMAR	34,8
Alg8	DMSO	CCMAR	84,2
Alg9	DMSO	CCMAR	31,2
Alg10	DMSO	CCMAR	40,2
Alg11	DMSO	CCMAR	51
Alg12	DMSO	CCMAR	28,4
Alg13	DMSO	CCMAR	19,4
Alg14	DMSO	CCMAR	47,4
Alg15	DMSO	CCMAR	15,8
Alg16	DMSO	CCMAR	17,8
Alg17	DMSO	CCMAR	42,6
Alg18	DMSO	CCMAR	59,8
Alg19	DMSO	CEIMAR	500
Alg20	DMSO	CEIMAR	500
Alg21	DMSO	CEIMAR	500
Alg22	DMSO	CEIMAR	500
Alg23	DMSO	CEIMAR	500
Alg24	DMSO	CEIMAR	200
Alg25	DMSO	CEIMAR	500
Alg26	DMSO	CEIMAR	500
Alg27	DMSO	CEIMAR	500
Alg28	DMSO	CEIMAR	500
Alg29	DMSO	CEIMAR	500
Alg30	DMSO	CEIMAR	500
Alg31	DMSO	CEIMAR	200
Alg32	DMSO	CEIMAR	500
F1	DMSO	CCMAR	500
F2	DMSO	CCMAR	500
F3	DMSO	CCMAR	500
F4	DMSO	CCMAR	416,67
EPS	DMSO	CCMAR	500
Pep1	DMSO	CEIMAR	10
Pep2	DMSO	CEIMAR	10
Pep3	DMSO	CEIMAR	10

Após o tratamento, as células foram analisadas a nível da localização subcelular de FOXO3a, da proteína (análise proteica) e do mRNA (análise transcriptómica) através de metodologias diferentes, nomeadamente Microscopia de Fluorescência, *Western Blot* e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) da Transcrição Reversa em Tempo Real (RT) (RT-qPCR). A localização subcelular de FOXO3a foi acedida de modo a clarificar o efeito dos diferentes compostos nesta proteína. A análise proteómica foi realizada com o objetivo de observar o estado de fosforilação de Akt e FOXO3a. A análise transcriptómica foi executada de forma a expressão genética dos genes alvo de FOXO3a nas células, quando tratadas com diferentes compostos.

## **IV.2. MIROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

A microscopia de fluorescência é uma técnica que permite a monitorização da localização subcelular e dinâmica de proteínas de interesse em diversos contextos. Isto através da marcação da proteína de interesse com sondas fluorescentes ou da produção de proteínas de fusão, constituídas pelo gene de interesse e pela proteína fluorescente. A identificação de estruturas celulares fluorescentes pela microscopia de fluorescência revela, assim, a presença de uma determinada proteína em estudo.

### **IV.2.1 Fixação, marcação de células e preparação de lâminas**

Para os ensaios de fluorescência, foram plaqueadas 40 000 células em placas de 24 poços cobertas com lamelas (VWR, Bélgica). No dia seguinte, as células foram incubadas com os respetivos compostos e meio DMEM novo durante o tempo especificado para cada experiência. No final do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 100 µL de paraformaldeído (PFA-*Fisher Scientific*, Reino Unido) 4% durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS e armazenadas a 4°C para posterior análise. No dia seguinte, as lamelas foram montadas em lâminas (*Thermo Scientific*, Alemanha) utilizando o meio de montagem aquoso UltraCruz® (*Santa Cruz Biotechnology*, Portugal). O meio de montagem contém 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), um marcador fluorescente que possibilita a visualização do núcleo das células uma vez que se liga a regiões do ADN ricas em adenina-timina. Quando ligado a estas regiões produz fluorescência

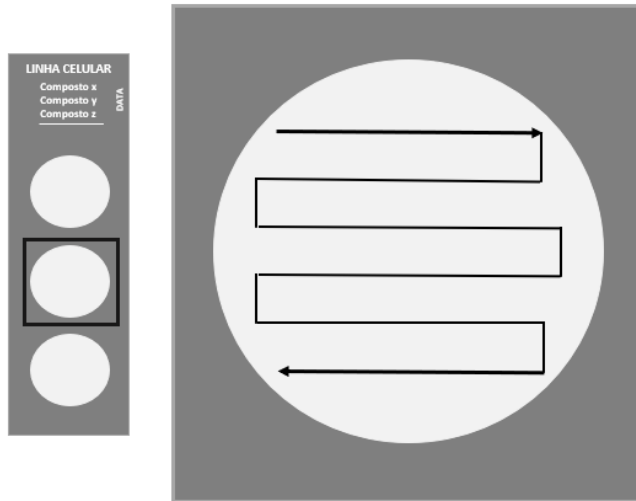
azul. As lamelas (VWR, Bélgica) foram seladas com verniz transparente e guardadas a 4°C, após secagem.

#### **IV.2.2 Análise microscópica**

A localização subcelular de FOXO-Proteína Verde Fluorescente (GFP) nas células foi monitorizada através da observação das preparações nos canais GFP (verde) e DAPI (azul) ao Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado *Axiomager Z2* (*Carl ZEISS*, Alemanha) com câmara fotográfica (*AxiocamHR3*) acoplada ao sistema de análise de imagem *AxiVision 4.8.2*. O canal GFP permite visualizar a proteína de interesse dado que as linhas celulares com proteínas de fusão de um gene de interesse e GFP apresentam fluorescência verde nos locais onde esta se encontra. O canal DAPI permite visualizar o núcleo através da observação de fluorescência azul. Assim, através destes dois canais observou-se a localização nuclear e/ou citoplasmática de FOXO-GFP nas células. A capacidade dos diferentes compostos induzirem a translocação nuclear de FOXO-GFP foi determinada pela análise, aquisição de imagens dos dois canais e, posterior, quantificação das células com localização nuclear e/ou citoplasmática de FOXO-GFP. A observação e aquisição de imagens das preparações foi realizada com recurso às objetivas 20X e 40X. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de *imagem Image J 1.52*, acoplado à extensão *Fiji*.

#### **IV.2.3 Quantificação**

A localização subcelular de FOXO-GFP analisada ao microscópio foi confirmada pela quantificação, por dois métodos distintos, das células. Inicialmente, rastreou-se a lamela, de acordo com a Figura IV.10, de modo a contar 250 células individuais para cada condição experimental. As células foram distribuídas de acordo com três categorias: nuclear, citoplasmática e nuclear e citoplasmática. O número de células contadas foi convertido em gráficos com a percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo. A contagem das lamelas representativas de uma experiência foi realizada no mesmo dia, com o objetivo de garantir a fiabilidade dos resultados.



**Figura IV.9-Representação esquemática do método utilizado para quantificação manual de FOXO-GFP nuclear.** A quantificação de FOXO-GFP nuclear foi realizada ao rastrear a lamela na sua totalidade. Foram contadas 250 células individuais e foi feito um *scoring* das que apresentavam FOXO-GFP no núcleo.

Numa fase posterior, procedeu-se à quantificação automática de células com FOXO-GFP nuclear de forma a reduzir a variabilidade humana. Este método consistiu na aquisição de cerca de 15 imagens por lamela. As imagens foram, seguidamente, quantificadas automaticamente com o auxílio do Dr. Diego Megías, diretor da Unidade de Microscopia Confocal do *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (CNIO) com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Inicialmente, o programa identifica e segmenta o núcleo das células no canal DAPI. Posteriormente, simula o citoplasma na área circundante ao núcleo. Quando ambos os compartimentos estão definidos, o programa quantifica o sinal de GFP e calcula a razão da intensidade do sinal no núcleo e no citoplasma. A razão da intensidade do sinal destes compartimentos nas células tratadas com o controlo negativo foi calculada de forma a estabelecer um valor limite. Este valor permitiu identificar e quantificar as células com FOXO no núcleo nos diferentes tratamentos.

#### IV.2.4. Análise estatística

Todas as experiências foram realizadas independentemente três vezes, à exceção das experiências com os extratos de microalgas, extratos de Haloarqueas, extratos proteicos, extratos pigmentares e extratos celulares de Haloarqueas, péptidos, pigmento fotossintético (realizado uma vez) e frações da Alg11 (realizado duas vezes). Os valores resultantes da quantificação foram expressos em média e desvio padrão (SD) ou erro padrão da média (SEM), de acordo com os replicados em questão. Os valores expressos foram, então, convertidos em gráficos. As análises estatísticas foram realizadas com recurso ao programa *GraphPad Prism 7*.

### IV.3. WESTERN BLOT

O *western blot* é uma técnica utilizada para detetar proteínas específicas de um complexo proteico, assim como modificações pós-traducionais em proteínas. A análise microscópica e quantificação das células demonstrou que alguns dos compostos analisados induzem a translocação nuclear de FOXO-GFP. Como anteriormente referido, a regulação de FOXO é principalmente realizada por modificações pós-traducionais. Assim, o *western blot* foi utilizado com o objetivo de analisar uma das modificações pós-traducionais, a fosforilação, de FOXO e Akt após o tratamento com diversos compostos. O processo é baseado na separação das proteínas pelo seu peso molecular através de eletroforese, seguida de transferência para uma membrana e na utilização de anticorpos específicos para deteção da(s) proteína(s) de interesse.

#### IV.3.1. Extração de proteína total

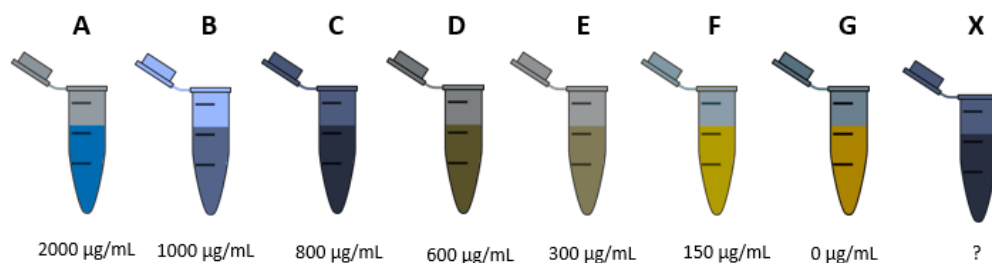
Para os ensaios de *western blot*, foram plaqueadas duas placas de 35 mm x 10 mm para cada composto utilizado, de forma a extrair a proteína total. Quando as placas apresentavam a 70% de confluência, mudou-se o meio para meio Solução salina equilibrada de *Earl* (EBSS), nos casos em que isto se aplicou. No dia seguinte, o meio foi substituído por meio DMEM completo e as células foram incubadas com os respetivos compostos durante o tempo especificado para cada experiência.

No final do tratamento, lavaram-se as células com 2 mL de PBS 1X e adicionou-se 100  $\mu$ L de tampão de lise celular (CST) preparado de fresco, o qual é composto por Água (H<sub>2</sub>O); Tris 1M pH 7.5 (*Fisher Scientific*, EUA); Cloreto de sódio (NaCl) 5M (*Merck*, Alemanha); Triton X-100 5% (*Amresco*, Ohio); NaF 1M (VWR, União Europeia (UE)); Ácido etilenodiaminotetracético 0.5M (EDTA- *Sigma Aldrich*, EUA); Ácido bis-(2-aminoetil) etilenoglicol-NNN'N'-tetracético 0.5M (EGTA- *AppliChem*, Alemanha); Pirofosfato 200 mM (Santa Cruz, Dallas);  $\beta$ -Glicerol Fosfato 1M (b-g-p- Santa Cruz, Dallas); Ortovanadato de sódio 100 mM (OVO4- *Sigma Aldrich*, EUA); Caliculina A 100  $\mu$ M (Santa Cruz, Dallas) e Cocktail de Inibidores de Protéases (PIC- *Sigma Aldrich*, EUA). Este tampão tem como função romper a membrana citoplasmática das células de forma a obter lisados proteicos. As placas foram raspadas e os lisados proteicos transferidos para tubos *ependorfs* de 1,5ml. Os tubos com os lisados foram incubados a 4°C durante 15 minutos num agitador orbital (*Labnet International*, EUA) e posteriormente centrifugados numa centrífuga (VWR, Japão) a 4°C durante 15 minutos, a uma velocidade máxima

de 215 000 g. Após este intervalo de tempo, procedeu-se à recolha do sobrenadante para novos tubos *ependorfs*. Os procedimentos anteriores foram efetuados em gelo com vista a garantir a integridade das proteínas extraídas.

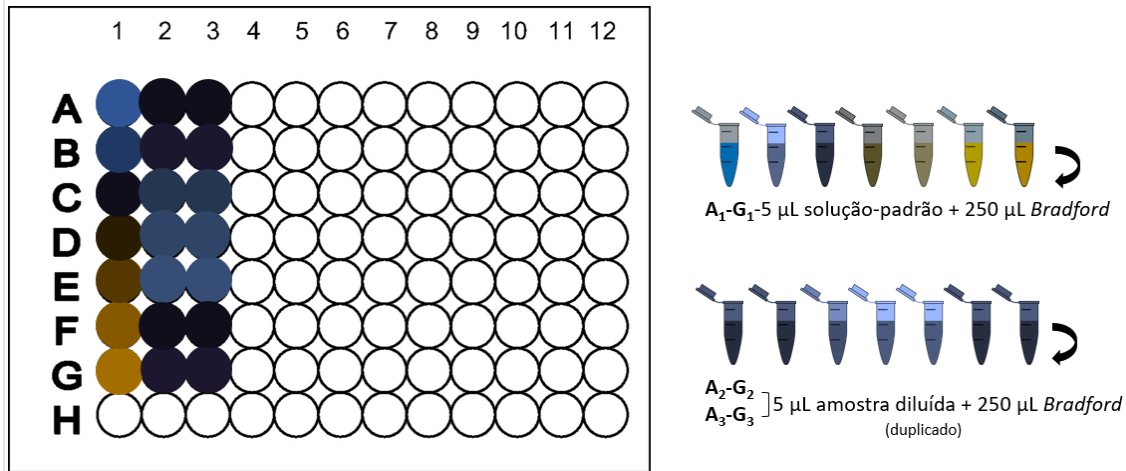
#### IV.3.2. Quantificação de proteína total

A quantificação de proteína total das amostras foi realizada pelo ensaio de *Bradford* (NZYTech, Portugal). Este ensaio é um método colorimétrico que se baseia na alteração de uma cor acastanhada do corante azul brilhante de *Coomassie* G-250, quando em solução ácida, para uma cor azulada na presença de proteína. A quantificação das proteínas é realizada através da preparação de uma curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) (*ThermoFisher Scientific*, EUA), uma proteína com concentrações conhecidas (Figura IV.11).



**Figura IV.10-Preparação da reta padrão de BSA e das amostras de concentração desconhecida.** A reta padrão de BSA é obtida através de diluições em série de uma solução-mãe de BSA a 2000 mg/mL em H<sub>2</sub>O. As diferentes concentrações da reta padrão de BSA estão representadas de A a G. As amostras de concentração desconhecida também foram diluídas 1:10 em H<sub>2</sub>O (5 µL amostra + 45 µL H<sub>2</sub>O), representada por X.

Esta reta representa a concentração de BSA (y) em função da absorvância (x) pelo que a substituição dos valores de absorvância das amostras na recta  $y=mx + b$  permite obter a sua concentração. Para isto, seguiu-se o esquema apresentado na Figura IV.12, onde se começou por diluir 5 µL de cada amostra de concentração não conhecida em 45µL de H<sub>2</sub>O (1:10). Posteriormente, foram adicionados 5 µL de cada solução-padrão e de cada amostra de concentração não conhecida, em duplicado, e 250 µL de reagente de *Bradford* numa placa de 96 poços (Figura IV.12). As absorvâncias foram lidas a 595 nM num Luminómetro Glo-Max (*Promega*, EUA) e calculou-se a concentração total das amostras através da reta-padrão.



**Figura IV.11- Preparação de placa de 96 poços para ensaio de Bradford.** As diferentes soluções padrões (A<sub>1</sub>-G<sub>1</sub>) e amostras de concentração desconhecida (A<sub>2</sub>-G<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>-G<sub>3</sub>) foram adicionadas à placa de 96 poços. Foram adicionados 5 µL de cada uma e 250 µL de reagente de Bradford. As amostras de concentração desconhecida foram preparadas em duplicado. Este processo foi necessário para determinar a concentração das proteínas e a quantidade de amostra a ser carregada no gel de poliacrilamida.

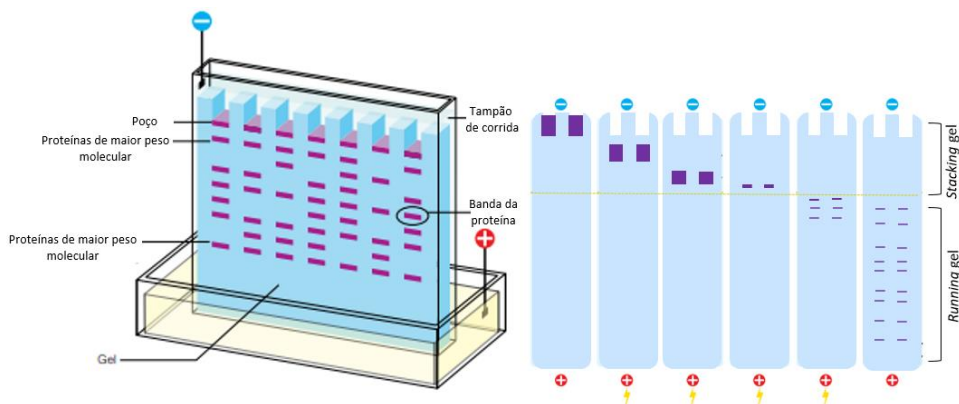
### IV.3.3. Preparação de amostras

Todas as amostras foram ajustadas à mesma concentração com tampão de *Laemmli* 6X (TrisHCl 0.2 M pH 6.8 (*Sigma Aldrich*, EUA), glicerol 40% (*Sigma Aldrich*, EUA), azul de bromofenol 0.04% (*Santa Cruz*, Dallas), Dodecil Sulfato de sódio (SDS) 0.3M (*Applichem*, Alemanha), β-Mercaptoetanol 20% (*Sigma Aldrich*, Steinheim)) e CST. O tampão de *Laemmli* é um tampão de corrida, composto por β-Mercaptoetanol que reduz as ligações dissulfido intra e inter-moleculares. O SDS desnatura as proteínas, conferindo uma carga negativa que permite a separação das proteínas pelo seu peso molecular, ao migrarem para o polo positivo. O azul de bromofenol permite observar a corrida das amostras e o glicerol confere densidade às amostras para que possam ser depositadas no respetivo poço. Por fim, as amostras foram desnaturadas ao serem aquecidas a 100°C durante 5 minutos num bloco térmico *Thermo-Shaker* (*Biosan*, UE). A desnaturação das amostras permite a migração das proteínas no gel após a aplicação de corrente elétrica.

#### IV.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

SDS-PAGE é uma técnica utilizada para separar as proteínas de uma amostra de acordo com o seu peso molecular. O gel tem duas fases, a de concentração (*stacking*) e a de corrida ou resolução (*running*). A primeira garante que as proteínas pipetadas em cada poço do gel ficam concentradas, fazendo com que a corrida no *running* gel se inicie ao mesmo tempo e aumentando a resolução das proteínas separadas. A segunda serve para as proteínas migrarem e se separarem de acordo com o seu peso molecular.

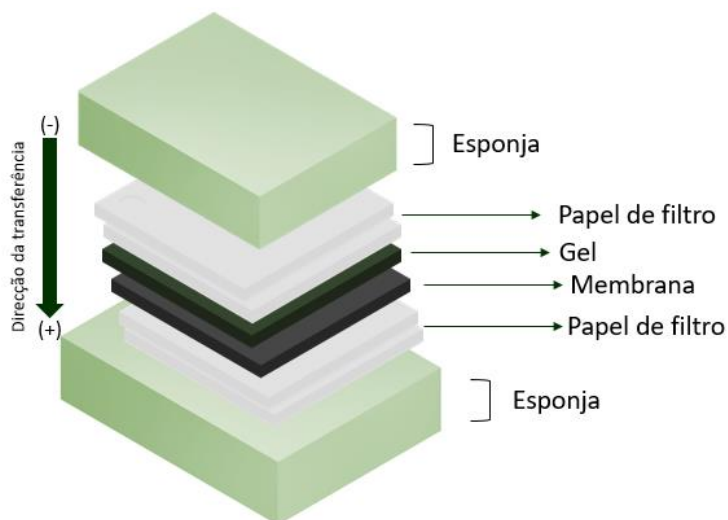
Inicialmente, o *stacking* gel ( 312.5 µL de Tris 1 M, pH 6.8 (*Sigma Aldrich*, EUA), 312.5 µL de Solução de Acrilamida: Bis-acrilamida 29:1 (*Fisher Scientific*, EUA), 2. mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 25 µL de SDS 10% (*Applichem*, Alemanha), 12.5 µL de Peroxodissulfato de diamónio 25% (APS- *Sigma Aldrich*, EUA) e 7.5 µL de N, N, N, N-Tetrametil-Etilenodiamina (TEMED- *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas)) e o *running* gel foram preparados (3 mL de Tris 1 M, pH 8.8 (*Sigma Aldrich*, EUA), 2 mL de Solução de Acrilamida: Bis-acrilamida 29:1 (*Fisher Scientific*, EUA), 2.9 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 80 µL de SDS 10% (*Applichem*, Alemanha), 32 µL de APS 25% (*Sigma Aldrich*, EUA) e 12 µL de TEMED (*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas)), sendo que a percentagem do *running* gel utilizada foi de 10%. A percentagem adequada do *running* gel de um western blot depende do tamanho da(s) proteína(s) de interesse em questão. Assim, as quantidades dos reagentes do *running* gel enunciadas anteriormente são referentes à percentagem utilizada neste trabalho. Em acréscimo, as quantidades dos reagentes do *stacking* gel enunciadas anteriormente são referentes a uma unidade de *stacking* gel. O APS é um agente oxidante que inicia a polimerização de acrilamida a bis-acrilamida. É usado juntamente com o TEMED, o qual catalisa a reação de polimerização. Numa fase seguinte, carregou-se 25 a 30 µL por poço das amostras e 3 µL do marcador NZY Blue Protein Marker (*NZYtech*, Portugal) foram carregados no gel. Iniciou-se a Eletroforese em SDS-PAGE numa câmara submersa em tampão de corrida 1X (Tris (*Sigma Aldrich*, EUA), Glicina (*Sigma Aldrich*, Bélgica), SDS (*Applichem*, Alemanha), H<sub>2</sub>O Mili-Q) ligada a uma fonte de energia da *Bio-Rad*. Por fim, aplicou-se uma corrente elétrica inicial de 75 V e, quando as proteínas estavam no *running* gel, subiu-se para 150 V. O procedimento está representado na Figura IV.13.



**Figura IV.12- Representação esquemática da separação de proteínas em SDS-PAGE. O gel é composto por duas fases, o *stacking gel* e o *running gel*.** As proteínas desnaturadas são carregadas no gel e quando a corrente elétrica é aplicada começam a corrida em direção ao polo positivo. Inicialmente ficam concentradas devido ao *stacking gel* e quando chegam ao *running gel* são separadas de acordo com o seu peso molecular. As proteínas de menor peso molecular migram mais facilmente através da rede formada pela poliácridamida enquanto que as de maior peso molecular migram menos. Adaptado de *Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf). Acesso em: 15.05.19 <sup>[150]</sup>

#### IV.3.5. Transferência para membrana

Após a Eletroforese, as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Amersham<sup>TM</sup> Protan<sup>TM</sup>* de 0,2  $\mu\text{m}$  (*GE Healthcare*, Alemanha) pelo método sanduíche. Neste método, fez-se uma sanduíche que é constituída por duas esponjas com dois papéis de filtro, a membrana, o gel e uma última camada de mais dois papéis de filtro no seu interior (Figura IV.14). Para a transferência ocorrer, a sanduíche foi colocada numa câmara submersa em tampão de transferência 1X (Tris (*Sigma Aldrich*, EUA), Glicina (*Sigma Aldrich*, Bélgica), Metanol 20% (VWR, França), H<sub>2</sub>O Mili-Q ligada a uma fonte de energia da Bio-Rad. No final, aplicou-se uma corrente elétrica de 75 V durante 90 minutos.



**Figura IV.13-Representação esquemática da transferência pelo método sanduíche.** No *western blot*, as proteínas separadas no gel são transferidas para uma membrana e existem diversos métodos de transferência. No método da sanduíche, a transferência ocorre com o material indicado (esponja, dois papéis de filtro, gel, membrana, dois papéis de filtro e esponja). Para isto, é aplicada uma corrente elétrica e as proteínas migram na direção do cátodo (polo positivo), para a membrana.

#### IV.3.6. Bloqueio

Após a transferência, a membrana foi bloqueada através da incubação com leite magro em pó a 5%, dissolvido em Tampão Salino Tris com *Tween 20* (TBS-T 1X (*Sigma Aldrich*, EUA), NaCl (*Merck Millipore*, Alemanha), *Tween 20* (*Merck Millipore*, UE), H<sub>2</sub>O Mili-Q) durante 60 minutos em agitação, à temperatura ambiente num agitador orbital (*Labnet International*, UE). A membrana de nitrocelulose tem alta afinidade por diversas proteínas. É essencial bloqueá-la para evitar que os anticorpos se liguem a proteínas inespecíficas da membrana, ou seja, garantir que se liguem unicamente à proteína de interesse. Assim que terminou a transferência, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T 1X, em agitação durante 5 minutos.

#### IV.3.7. Incubação com anticorpos (primário e secundário)

As membranas foram incubadas com os anticorpos primários indicados na Tabela IV.4. A incubação foi em agitação, a 4°C num agitador orbital (*Labnet International*, UE). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T 1X, em agitação durante 5 minutos e, posteriormente, foram incubadas com os anticorpos secundários indicados na Tabela IV.4. A

incubação foi feita durante 60 minutos em agitação, à temperatura ambiente. O anticorpo primário reconhece e liga-se ao antigénio, ou seja, à proteína de interesse, presente na membrana enquanto que o secundário reconhece o anticorpo primário. Estes anticorpos secundários estão conjugados com a enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP). Quando a incubação com o anticorpo secundário terminou, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBS-T 1X, em agitação durante 5 minutos.

**Tabela IV.4-Lista de anticorpos primários e secundários utilizados nos westerns blots deste estudo.** O fornecedor, o número de catálogo, a diluição, a espécie e o solvente estão indicados. \* p-Akt e p-FOXO3a refere-se a Akt e FOXO3a no estado fosforilado, respetivamente. \*\* GAPDH= Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

	Anticorpo	Fornecedor	Número de catálogo	Diluição	Espécie	Solvente
Primário	Akt	Cell Signaling Technology	9272	1:1000	Coelho	BSA
	p-Akt* S473	Santa Cruz Biotechnology	sc-7985	1:500	Coelho	BSA
	FOXO3a	Santa Cruz Biotechnology	sc-48348	1:250	Ratinho	BSA
	p-FOXO3a* S253	Santa Cruz Biotechnology	sc-101683	1:1000	Coelho	BSA
	GAPDH**	Santa Cruz Biotechnology	sc-25778	1:5000	Coelho	BSA
Secundário	Anti-rabbit	GE Healthcare Life Sciences	NA934	1:10 000	Burro	Leite magro
	Anti-mouse	GE Healthcare Life Sciences	NA931	1:10 000	Ovelha	Leite magro

#### **IV.3.8. Detecção quimioluminescente**

No momento da revelação, é adicionado o substrato da enzima utilizada que neste caso é a HRP e está conjugada ao anticorpo secundário. Na presença de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a enzima é oxidada e produz um produto luminescente. Assim, as membranas foram incubadas durante 5 minutos com o reagente quimioluminescente (ECL- Solução 1 (Luminol 1.25 mM (*Sigma Aldrich*, EUA), Ácido p-cumárico 0.2 mM (*Sigma Aldrich*, Reino Unido), Tris 0.1 M pH 8.5 (*Sigma Aldrich*, EUA), **H<sub>2</sub>O Mili-Q**): Solução 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% (VWR, UE), Tris 0.1 M pH 8.5 (*Sigma Aldrich*, EUA), H<sub>2</sub>O Mili-Q)) caseiro em agitação. O luminol e o ácido p-cumárico foram preparados em DMSO. O sinal foi detetado através do Sistema de imagem *ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+* System (*Bio-Rad*, EUA), acoplado ao programa *Image Lab 4.0* para análise e deteção de imagens.

#### **IV.4. RT-qPCR**

O RT-qPCR é uma técnica utilizada no estudo quantitativo da expressão genética. A técnica consiste na transcrição de ARN em ADN complementar (cADN) pela enzima transcriptase reversa. O cADN é amplificado por PCR em tempo real/quantitativo (qPCR), o que permite detetar e quantificar os produtos de amplificação obtidos em tempo real [1, 37].

O RT-qPCR foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de Harmina e Piperlongumina na regulação dos níveis transcricionais de genes alvo de FOXO.

##### **IV.4.1. Preparação de amostras**

Para os ensaios de RT-qPCR, plaqueou-se uma placa de 35 mm x 10 mm para cada composto de forma a extrair o ARN total posteriormente. Quando as placas apresentavam 90% de confluência, o meio foi substituído por meio DMEM completo e as células foram incubadas com os compostos durante o tempo especificado para cada experiência (6 horas).

No final do tratamento, procedeu-se à recolha dos *pellets* das amostras para posterior extração do ARN total.

##### **IV.4.2. Extração e quantificação de ARN total**

O ARN das amostras foi extraído utilizando o *E.Z.N.A Total ARN Kit I ADNse Digestion Protocol* (*OMEGA Bio-Tek*, EUA). O protocolo foi seguido segundo as normas do fabricante. O

ARN é uma molécula altamente reativa e instável pelo que o processo de extração envolve um elevado rigor técnico e condições controladas no manuseamento das amostras. Esta é uma forma de evitar a degradação das amostras por ARNses e garantir a qualidade da extração pelo que todos os procedimentos foram executados numa superfície previamente desinfetada com etanol a 70% e *ARNse cleaner* (NZYTech, EUA). Os materiais a serem utilizados também foram previamente desinfetados com etanol a 70% e *ARNse cleaner* (NZYTech, EUA).

A concentração e pureza do ARN extraído das amostras foram obtidos no espectrofotómetro *NanoDrop*® 2000c (*Thermo Scientific*, Loures), com recurso ao programa de análise *NanoDrop* 2000/2000c da *Thermo Scientific*. A pureza do ARN é analisada pelos valores dos rácios entre A260 e A280 e os rácios entre A260 e A230. O primeiro indica a presença de proteínas ou fenóis e o segundo a presença de contaminantes orgânicos. Os valores de referência encontram-se na Tabela IV.5.

**Tabela IV.5-Valores de referência dos rácios entre Abs<sub>260</sub> e A<sub>280</sub> e rácios entre Abs<sub>260</sub> e Abs<sub>230</sub>.** A análise da pureza do ARN extraído de amostras é feita por comparação dos valores dos rácios Abs<sub>260</sub> e A<sub>280</sub> e dos rácios entre Abs<sub>260</sub> e Abs<sub>230</sub> obtidos com os valores de referência destes mesmos rácios. O valor do rácio Abs<sub>260</sub> /A<sub>280</sub> deve ser aproximadamente 2. O valor do rácio Abs<sub>260</sub> /A<sub>230</sub> deve estar entre 2 e 2,2. Se os valores obtidos forem inferiores a estes valores, o RNA está contaminado [151].

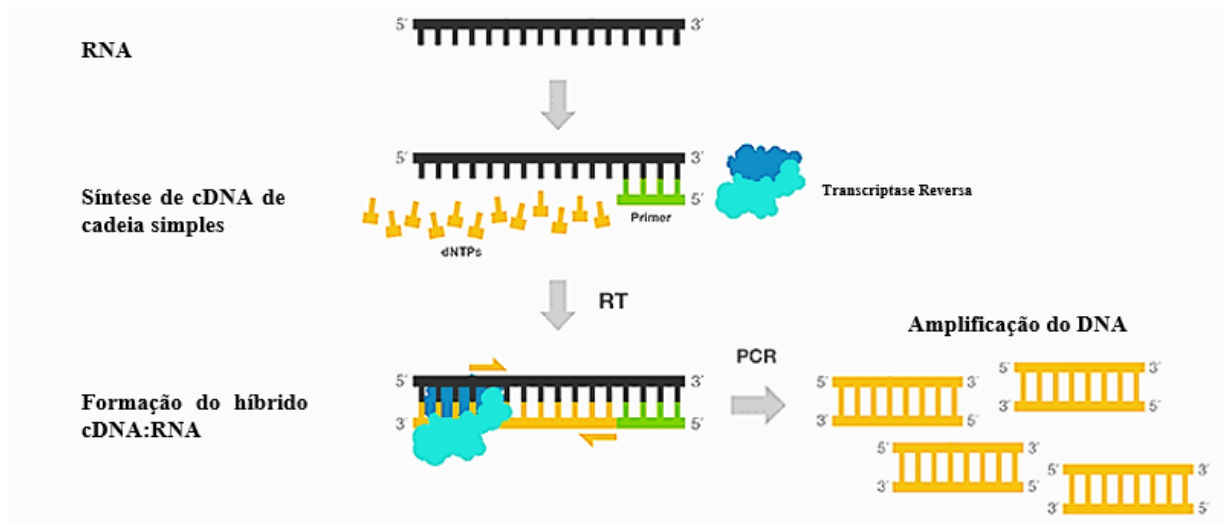
$\frac{\text{Abs}_{260}}{\text{Abs}_{280}} \approx 2,0$		$2 < \frac{\text{Abs}_{260}}{\text{Abs}_{230}} < 2,2$	
< 2	≈ 2,0	< 2	2- 2,2
Proteína ou fenóis	ARN puro	Compostos orgânicos (EDTA, etanol, etc.)	ARN puro

#### IV.4.3. Síntese de cADN

Após a extração de ARN, procedeu-se à síntese de cADN numa máquina de PCR C1000 *Touch™ Thermal Cycler* (*Bio-Rad*, Portugal). Para a síntese ocorrer, foram utilizados 2 µg de ARN total, 2 µL de *Enzyme Mix* e 10 µL de *Master Mix* do *NZY First-Strand cADN Synthesis kit* (*NZYTech*, Portugal) por amostra. No final, perpez-se até um volume total de 20 µL com Dietil Pirocarbonato (*DEPC*)-*treated* H<sub>2</sub>O do kit referido anteriormente. Este kit contém todos os

componentes necessários para a síntese de cADN, a *Master Mix* e a *Enzyme Mix*. A *Master Mix* é composta por *iniciadores*, desoxirribonucleótidos (dNTPs), Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e um tampão RT otimizado. A *Enzyme Mix* inclui a transcriptase reversa NZY ARNse H *Minus* e o inibidor da ribonuclease NZY para evitar a degradação do ARN por ribonucleases.

Para que a reação ocorra, as amostras são sujeitas a ciclos de temperatura no termociclador e cada ciclo compreende três fases: desnaturação das cadeias molde de ADN, *annealing* ou hibridação dos iniciadores e extensão dos iniciadores. Na primeira fase, a cadeia dupla de ADN molde é desnaturada a alta temperatura. Na segunda fase, há diminuição da temperatura para facilitar o emparelhamento correto dos iniciadores com as cadeias de ADN simples. Na fase de extensão, aumenta-se novamente a temperatura para atingir o ponto ótimo da atividade da transcriptase reversa, que inicia a replicação do molde a partir da extremidade 3'-OH dos iniciadores (Figura IV.15).



**Figura IV.14- Representação esquemática do processo de RT-qPCR.** Nesta técnica, uma amostra de ARN é convertida em cADN de cadeia simples pela enzima transcriptase reversa. O cADN sintetizado é amplificado, posteriormente, por qPCR. Adaptado de *ThermoFisher Scientific*.

A reação de PCR é otimizada consoante a aplicação, alterando-se o número de ciclos e as temperaturas utilizadas. Neste caso, a reação foi iniciada pela incubação das amostras a 25°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 50°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 37°C por 20 minutos no termociclador anteriormente mencionado. Na PCR, após as amostras serem incubadas a 85°C

por 5 minutos, foi adicionado 1 µL de ARNse H (*E. Coli*) do *NZY First-Strand cADN Synthesis kit* (NZYTech, Portugal). Este passo aumenta a sensibilidade da reação RT-qPCR dado que a ARNse H hidrolisa especificamente o ARN dos híbridos cADN: ARN o que facilita a ligação dos iniciadores do PCR ao cADN. Os produtos amplificados foram armazenados a – 20°C.

#### IV.4.4. Reação de qPCR / PCR quantitativo

O qPCR, é um método que combina o PCR convencional com um mecanismo de deteção e quantificação por fluorescência dos produtos amplificados. Numa fase inicial, a placa de qPCR foi desenhada experimentalmente para facilitar a pipetagem das reações de qPCR. Em cada experiência, cada amostra foi preparada em triplicados para os genes-alvo e para o gene *housekeeping*. Os genes-alvo analisados foram o p21, o p27 e o PUMA. Os genes *housekeeping* são definidos como genes que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência celular e, em condições normais, são expressos de forma constitutiva em todas as células de um organismo.

Estes genes são utilizados para normalizar os níveis de transcrição dos genes-alvo antes de proceder à sua quantificação. Isto é, no processo de análise estatística descrito posteriormente, é calculada a diferença entre os valores de Cq dos genes-alvo e do gene *housekeeping*. Neste sentido, a normalização permite excluir todas as variações não biológicas possíveis, como possíveis erros experimentais, de forma a garantir que a expressão dos genes-alvo não é influenciada pela diferença de quantidade e/ou tamanho das amostras. No entanto, existem diversos estudos que demonstram que os níveis de transcrição dos genes *housekeeping* podem variar em determinados tipos de células sob condições experimentais diferentes. Por outras palavras, nenhum gene é verdadeiramente expresso de forma constitutiva em todas as células e sob todas as condições experimentais diferentes pelo que a escolha do gene *housekeeping* deve ser rigorosa e ajustada ao objetivo do estudo em questão <sup>[152,153]</sup>.

Neste caso, foi utilizado para normalização do qRT-PCR o *housekeeping* gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A placa é ainda constituída por um controlo negativo, o qual contém todos os componentes necessários à reação, exceto o cADN.

Assim, procedeu-se à diluição de 1:5 do cADN, seguida de preparação das reações de qPCR. Cada reação continha o cADN, os iniciadores direto e inverso, o fluoróforo *SYBR Green* e H<sub>2</sub>O tratada com *DEPC* nas quantidades adequadas ao número de reações do estudo. O desenho

do par de iniciadores e determinação da sua eficiência é fundamental para garantir a *hibridização* e *priming* ideais. Neste caso, este processo já tinha sido efetuado. Os iniciadores utilizados encontram-se na Tabela IV.6.

**Tabela IV.6-Lista dos iniciadores utilizados nos Rt-qPCRs deste estudo.** O sentido, sequência dos oligos, tamanho, fornecedor e concentração dos iniciadores utilizados estão indicados.

Iniciador	Sentido	Sequência dos Oligos 5' -> 3'	Tamanho (pares de bases)	Fornecedor	Concentração
<b>GAPDH</b>	direto	CAATGACCCCTTCATTG ACC	20	NZYTech	10 µM
	inverso	TTGATTTTGGAGGGATCT CG	20	NZYTech	
<b>p21</b>	direto	CAGCAGAGGAAGACCAT GTG	20	NZYTech	
	inverso	GGCGTTTGGAGTGGTAG AAA	20	NZYTech	
<b>p27</b>	direto	CCGGCTAACTCTGAGGA CAC	20	NZYTech	
	inverso	CTTCTGAGGCCAGGCTT CTT	20	NZYTech	
<b>PUMA</b>	direto	GACCTCAACGCACAGTA CGA	20	NZYTech	
	inverso	TGGGTAAGGGCAGGAGT C	18	NZYTech	

O *SYBR Green* é um agente que se liga inespecificamente às cadeias de ADN durante a reação. A fonte de luz do termociclador excita o corante fluorescente, o que faz com que este emita fluorescência verde. O ensaio é, assim, baseado na deteção e medição do aumento de sinal fluorescente, que é proporcional à quantidade de ADN produzida durante cada ciclo de PCR. Uma vez preparada a placa de qPCR, a reação foi iniciada com desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 60 segundos e uma elongação final a 65 °C durante 5 segundos, seguida de 5 segundos a 95 °C. Todas as reações foram realizadas numa máquina de Real Time C1000 Touch™ Thermal Cycler (*Bio-Rad*, Singapura).

As reações individuais são caracterizadas pelo ciclo de PCR, onde a fluorescência é detetada acima do background, sendo este parâmetro denominado de *threshold cycle* (CT) ou *crossing point* (CP). A correlação existente entre fluorescência e a quantidade de produto amplificado permite a quantificação do gene de interesse dado que quanto menor o valor de CT maior a quantidade de material inicial. Durante o qPCR são adquiridas as curvas de amplificação e de *melting*/dissociação de forma a normalizar o ensaio. A curva de amplificação corresponde a um gráfico da variação da fluorescência em função dos ciclos, onde existe uma *baseline* inicial dada a não existência de sensibilidade para as primeiras amplificações, seguida de uma fase exponencial que culmina num platô. O qPCR é centrado na fase exponencial posto que fornece os dados mais precisos para a quantificação. É durante esta fase que o instrumento calcula dois parâmetros, o *threshold* (nível de deteção em que uma reação atinge uma intensidade fluorescente acima do *background*) e o CT (ciclo de PCR no qual a amostra atinge o limite). As curvas de *melting* representam um gráfico da variação da fluorescência em função da temperatura e fornecem a identificação precisa dos produtos amplificados, assim como a sua distinção de dímeros de iniciadores e outros pequenos artefactos de amplificação. As cadeias de ADN ligadas ao corante fluorescente dissociam-se a uma temperatura característica denominada temperatura de *melting* ( $T_m$ ), temperatura à qual metade da estrutura helicoidal do ADN de cadeia dupla é perdida, sendo detetada uma diminuição repentina da fluorescência devido à dissociação das cadeias de ADN e subsequente libertação do corante. A leitura da fluorescência é realizada de 0,5°C em 0,5°C para posterior determinação da derivada e obtenção de um gráfico com um pico característico que identifica o produto amplificado. A deteção da amplificação das amostras foi realizada no programa *Bio-Rad CFX Manager* versão 3.1.

#### **IV.4.5. Análise estatística**

Todas as experiências foram realizadas independentemente quatro vezes. Inicialmente, as curvas de *melting*, assim como as curvas de amplificação foram analisadas para detetar possíveis contaminações da amostra e, simultaneamente, averiguar a especificidade da amplificação. Isto é, garantir que o produto amplificado é o pretendido e não, a título exemplificativo, o resultado da dimerização dos próprios iniciadores. Para obter os níveis de expressão génica das diferentes amostras, procedeu-se ao cálculo da média dos valores de Ct dos replicados e do  $\Delta Ct$ . Este algoritmo é obtido pela normalização dos genes de interesse com o gene de referência, o GAPDH. Seguidamente, obteve-

se o valor de  $\Delta\Delta Ct$ . Posteriormente, é realizado o cálculo do *fold change*, com base no  $\Delta\Delta Ct$ . O *fold change* permite analisar a expressão do gene de uma amostra de interesse em relação à amostra de referência. Os valores expressos foram, então, convertidos em gráficos. As análises estatísticas foram obtidas com recurso ao programa *Bio-Rad CFX Manager 3.0* e ao programa *GraphPad Prism 7*.

## V. RESULTADOS

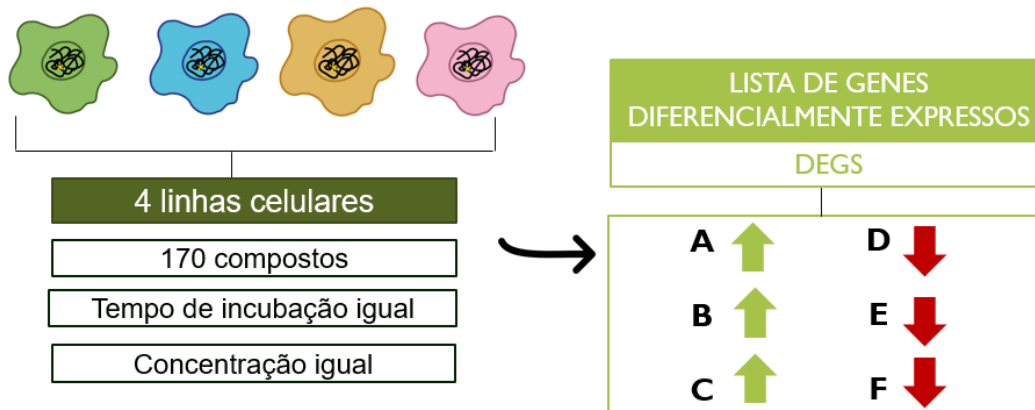
### V.1. ABORDAGEM BIOINFORMÁTICA

#### Harmina e Piperlongumina

Anteriormente, no laboratório, foram gerados dados de sequenciação de ARN (ARN seq), de uma linha de células epiteliais de Osteossarcoma Humano (U2OS) que expressa baixos níveis de TRIB2 e da mesma linha celular, mas com sobreexpressão de TRIB2. O ARN seq realizado a estas duas linhas celulares permitiu obter uma lista de genes diferencialmente regulados na presença de TRIB2: alguns genes encontram-se sobre-expressos e outros, contrariamente, sob-expressos.

Posteriormente, a aluna de doutoramento Susana Machado, apresentava como um dos objetivos da dissertação de doutoramento, ainda em fase de desenvolvimento, explorar uma ferramenta bioinformática, o cMAP. De forma simplificada, o cMAP consiste numa base de dados de expressão génica obtidos por experiências realizadas em quatro linhas celulares diferentes. Estas experiências consistem no tratamento das linhas celulares com 164 compostos, com igual concentração e tempo de incubação para obtenção de perfis de expressão de diferentes genes. Consequentemente, esta ferramenta permite a comparação de perfis de expressão génicos induzidos por diferentes compostos (Figura V.16) [73,74].

A ferramenta cMAP foi utilizada, no contexto do presente trabalho, como um instrumento para a descoberta de compostos que induzam um perfil de expressão génica inverso ao induzido por TRIB2, ou seja, compostos com a capacidade de reverter os efeitos de TRIB2 na célula ao nível transcricional. Isto possibilita a futura manipulação da atividade de TRIB2 a nível farmacológico.



**Figura V.15-Esquema representativo do funcionamento do cMAP.** A ferramenta bioinformática contém perfis de expressão de diferentes genes obtidos por experiências com 170 compostos à mesma concentração e tempo de incubação em 4 linhas celulares distintas.

Para tal, a lista de genes diferencialmente expressos por TRIB2 obtida pelo ARN seq foi colocada no cMAP. A ferramenta efetuou a comparação dos perfis de transcrição com os inseridos no sistema, da qual se obteve uma lista de compostos que produzem quer um perfil transcricional semelhante, quer um perfil transcricional inverso comparativamente ao de TRIB2 [73, 74]. Na Tabela V.7 encontram-se os compostos, selecionados pelo cMAP, que promovem um perfil transcricional inverso ao de TRIB2, quando sobre-expresso, com melhores *scores* de enriquecimento e *P-values*, nomeadamente: Harmina, Piperlongumina, Irinotecano e LM-1685.

**Tabela V.7-Compostos selecionados por cMAP.** A ferramenta bioinformática cMAP permitiu obter uma lista de compostos que promovem um perfil transcricional inverso ao de TRIB2 quando sobre-expresso. Estão apenas representados os compostos com melhores *scores* de enriquecimento e *P-value* [73,74]. Dados da tese de doutoramento da aluna Susana Machado.

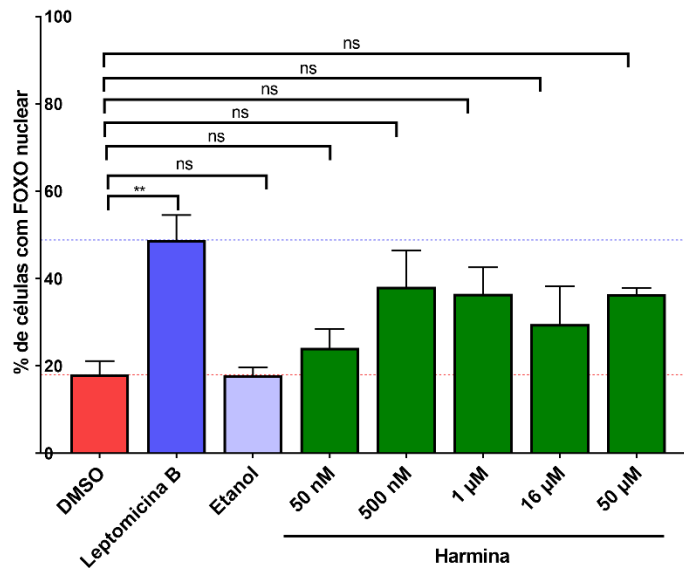
Compostos	Score de enriquecimento	P-value
Harmina	-0.9	0.00016
Piperlongumina	-0.965	0.00276
Irinotecano	-0.851	0.00655
LM-1685	-0.792	0.01827

Assim, Harmina e Piperlongumina correspondem aos dois compostos naturais selecionados pelo cMAP com o melhor P-value. Em acréscimo, Piperlongumina apresenta o melhor *score* de enriquecimento, o qual está representado na Tabela V.7.

### V.1.1. Microscopia fluorescente

Assim, Harmina e Piperlongumina são compostos naturais que, por um lado, induzem um perfil transcricional inverso ao de TRIB2, quando sobre-expresso. Por outro lado, estão associados à via PI3K/AKT/FOXO. Neste sentido, dado que TRIB2 foi descrito como repressor de FOXO, estabeleceu-se a hipótese que Harmina e Piperlongumina induzem a localização nuclear de FOXO, enunciada previamente no capítulo III. A hipótese foi testada através da análise e quantificação da localização subcelular de FOXO em células que expressam de forma estável a proteína de fusão

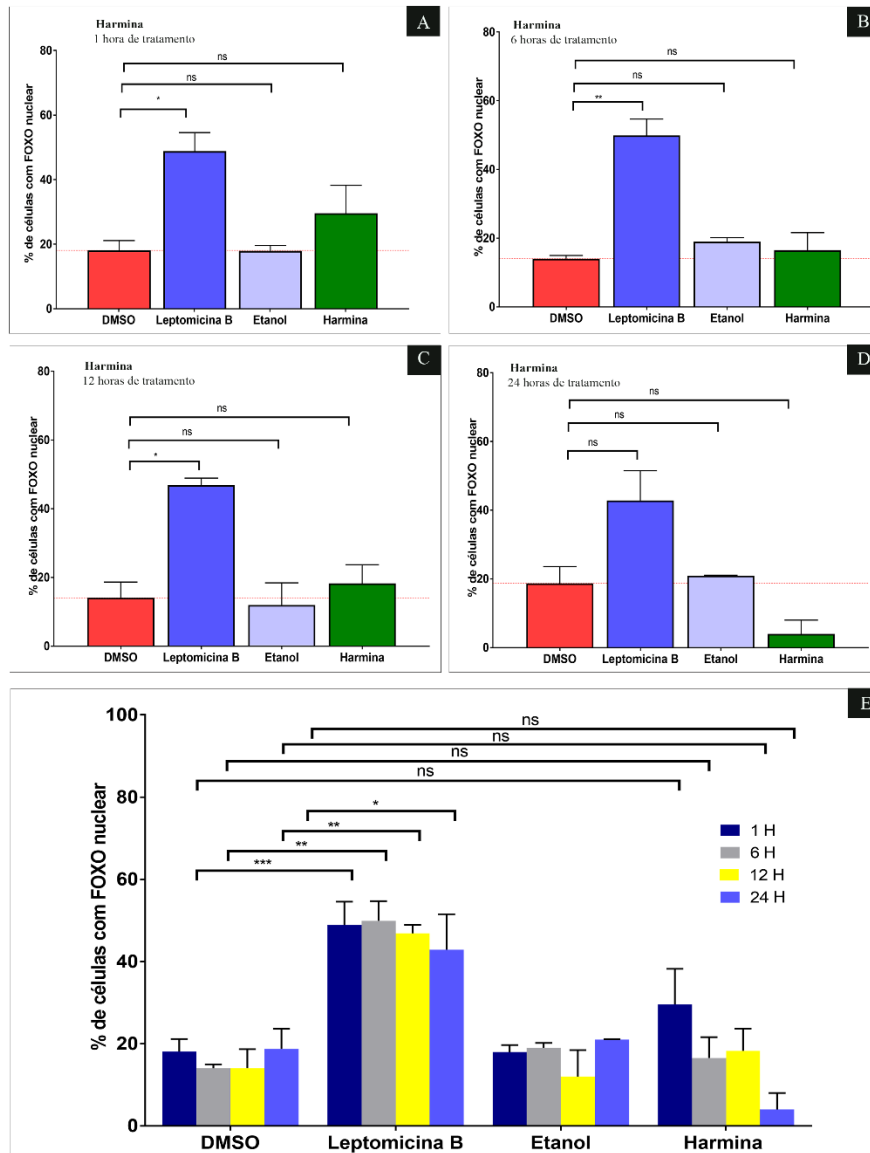
GFP-FOXO3a-U2OS FOXO- tratadas com estes compostos a diferentes concentrações e tempos de tratamento. A Leptomicina B, o DMSO e o etanol foram utilizados como controlos nesta experiência. O DMSO é o controlo negativo da experiência uma vez que representa o solvente no qual os compostos naturais foram preparados (Tabelas IV.2 e IV.3). Por outro lado, o etanol é o solvente no qual Leptomicina B foi preparada, pelo que consiste no controlo negativo deste fármaco (Tabelas IV.2 e IV.3). A Leptomicina B é um fármaco que está descrito como inibidor da exportação nuclear dependente de CRM1 que, como outrora explicado, é uma exportina que reconhece a sequência NES presente em proteínas como FOXO [154]. Neste sentido, Leptomicina B é utilizado em experiências de translocação nucleocitoplasmática de proteínas e garante a localização nuclear de FOXO pelo que consiste no controlo positivo desta experiência [154, 155].



**Figura V.16- Harmina induz a localização de FOXO-GFP nuclear.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações de Harmina (50 nM, 500 nM, 1µM, 16 µM e 50 µM) durante 1 hora, foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes ± SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \*\* $P < 0.01$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnnett's multiple test comparison*.

Os resultados referentes às células tratadas com Harmina, a diferentes concentrações (50 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 16  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) durante 1 hora, encontram-se na Figura V.17, sendo que 16  $\mu$ M corresponde à concentração utilizada nas experiências da base de dados cMAP<sup>[72, 73]</sup>. Segundo esta figura, na presença de DMSO, apenas cerca de 20% das células apresentam FOXO-GFP no núcleo. Já a Leptomicina B tem a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO em cerca de metade das células ( $P=0.0095$ ; *Dunnett's multiple test comparison*). No que diz respeito à Harmina, a 50 nM não se observa efeito na localização nuclear de FOXO-GFP dado que o número de células com esta proteína no núcleo é equivalente ao observado com o controlo negativo. As restantes concentrações de Harmina utilizadas resultaram no aumento da percentagem de células com FOXO nuclear, comparativamente ao DMSO, ainda que ligeiro e não significativo estatisticamente. Em acréscimo, o efeito de Harmina na localização de FOXO não varia muito com a concentração administrada, à exceção de Harmina a 16  $\mu$ M, onde o efeito é ligeiramente menor.

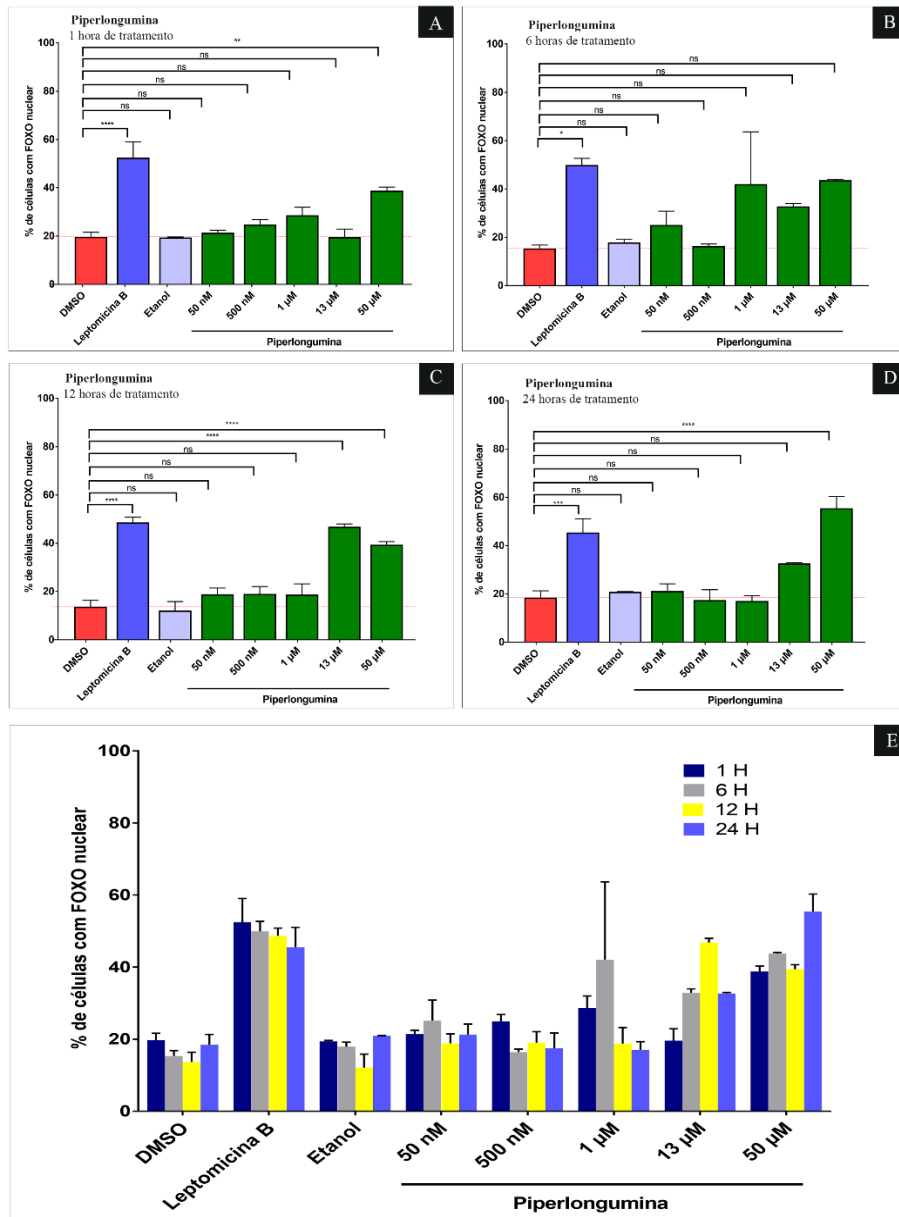
Neste seguimento, tornou-se necessário analisar o efeito do composto natural na localização nuclear de FOXO com diferentes horas de tratamento (1h, 6h, 12h e 24h) e os resultados encontram-se na Figura V.18. É importante referir que, apesar de Harmina a 500 nM e a 1  $\mu$ M já se observar um efeito na localização nuclear de FOXO, a concentração selecionada para esta experiência corresponde a 16  $\mu$ M dado ser a utilizada nas experiências do cMAP.



**Figura V.17- O efeito de Harmina na localização nuclear de FOXO-GFP diminui com o aumento do tempo de incubação.** As células U2OS FOXO, tratadas com Harmina a 16  $\mu$ M durante (A) 1h; (B) 6h; (C) 12h e (D) 24h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. (E) representa os diferentes tempos de incubação das células U2OS FOXO com Harmina a 16  $\mu$ M no mesmo gráfico. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*.

Os resultados obtidos permitem observar que o efeito de Harmina a 16  $\mu\text{M}$  na localização de FOXO com 6, 12 e 24 horas de tratamento é menor, comparativamente a 1 hora de tratamento (Figura V.18- B, C e D). O tratamento com Harmina durante 6 e 12 horas resultou numa percentagem de células com FOXO nuclear semelhante ao tratamento com DMSO. Para além disso, é possível destacar que o tratamento com Harmina durante 24 horas apresentou um efeito menor que o DMSO na localização nuclear de FOXO. No entanto, esta observação pode significar apenas que o tratamento durante 24 horas com Harmina é citotóxico para as células, porém seriam necessários testes de citotoxicidade para confirmar este efeito. Assim, o efeito de Harmina na localização de FOXO no núcleo das células é observado com uma hora de tratamento. No entanto, o efeito de Harmina na localização de FOXO é menor que o efeito de Leptomicina B em todas as horas de tratamento ( $P(1\text{h}) = 0,0104$ ;  $P(6\text{h}) = 0,0048$ ;  $P(12\text{h}) = 0,0207$ ; *Dunnett's multiple test comparison*).

Por outras palavras, a hipótese é confirmada para Harmina a 500 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , em que no caso específico de Harmina a 16  $\mu\text{M}$  o maior efeito na localização nuclear de FOXO nas células é observado com uma hora de tratamento.



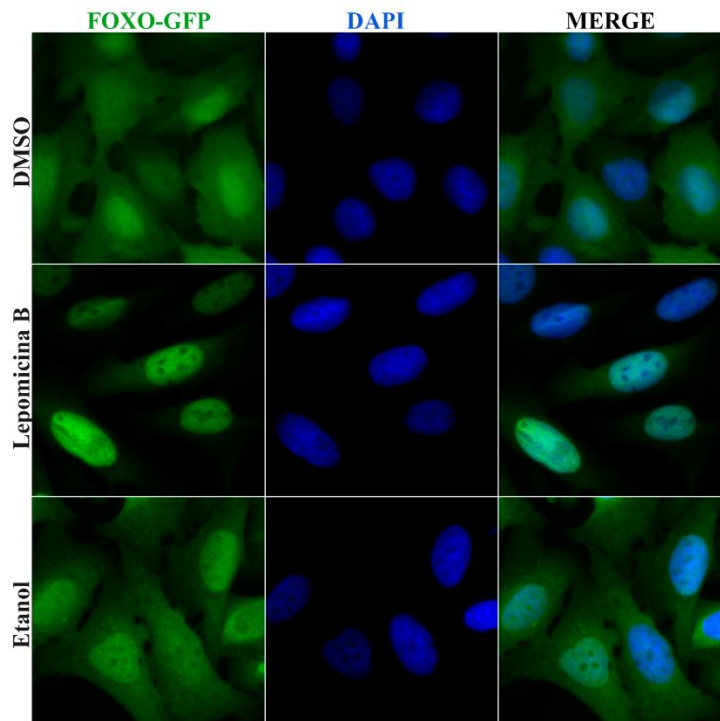
**Figura V.18- Piperlongumina induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com Piperlongumina a diferentes concentrações (50 nM, 500 nM, 1 μM, 13 μM e 50 μM) durante (A) 1h; (B) 6h; (C) 12h e (D) 24h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. (E) representa os diferentes tempos de incubação das células U2OS FOXO com Piperlongumina a diferentes concentrações e tempos de incubação no mesmo gráfico. O A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes ± SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \**P*<0.05;

\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnnett's multiple test comparison*.

Os resultados referentes às células tratadas com Piperlongumina a diferentes tempos (1h, 6h, 12h e 24h) e concentrações (50 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 13  $\mu$ M e 50  $\mu$ M), encontram-se na Figura V.19, sendo que 13  $\mu$ M corresponde à concentração utilizada nas experiências da base de dados cMAP<sup>[72, 73]</sup>. Assim como observado anteriormente nas experiências com Harmina, a presença de DMSO induz a localização nuclear de FOXO em cerca de 20% das células. A Leptomicina B induz a localização nuclear de FOXO de 50% a 60% das células nas diferentes horas de tratamento, um número muito elevado comparativamente ao DMSO ( $P$  (1h) = 0,0001;  $P$  (6h) = 0,0390;  $P$  (12h) = 0,0001;  $P$  (24h) = 0,0003).

A análise da Figura V.19A permite observar que o tratamento de 1 hora com Piperlongumina, tem um efeito significativo na localização nuclear de FOXO-GFP à concentração de 50  $\mu$ M ( $P=0,0028$ ; *Dunnnett's multiple test comparison*). As restantes concentrações utilizadas não aumentam a percentagem de células com FOXO nuclear e o efeito observado é semelhante ao do controlo negativo. Às 6 horas de tratamento (Figura V.19B), observa-se um efeito às concentrações de 13 e 50  $\mu$ M e, também a concentrações mais baixas, sendo que 1  $\mu$ M de Piperlongumina foi capaz de induzir FOXO para o núcleo das células. Às 12 e 24 horas de tratamento (Figura V.19C e D), o efeito de Piperlongumina observado é estatisticamente significativo a 13  $\mu$ M ( $P$  (12h) = 0,0001) e 50  $\mu$ M ( $P$  (12h) = 0,0001;  $P$  (24h) = 0,0001). Por fim, na Figura V.19E observa-se que 50  $\mu$ M corresponde à concentração de Piperlongumina na qual se observa efeito em todas as horas de tratamento das células, porém este efeito não é variável e a percentagem de células com FOXO no núcleo é cerca de 40% em todas as horas. Em acréscimo, à concentração de 1  $\mu$ M de Piperlongumina, verifica-se uma diferença estatística significativa entre as 6h e 12h de tratamento ( $P=0,0063$ ; *Dunnnett's multiple test comparison*), assim como entre as 6h e 24h ( $P=0,0029$ ; *Dunnnett's multiple test comparison*). A concentração de 13  $\mu$ M de Piperlongumina também mostra diferença estatística significativa entre as 1h e 12h de tratamento ( $P=0,0010$ ; *Dunnnett's multiple test comparison*).

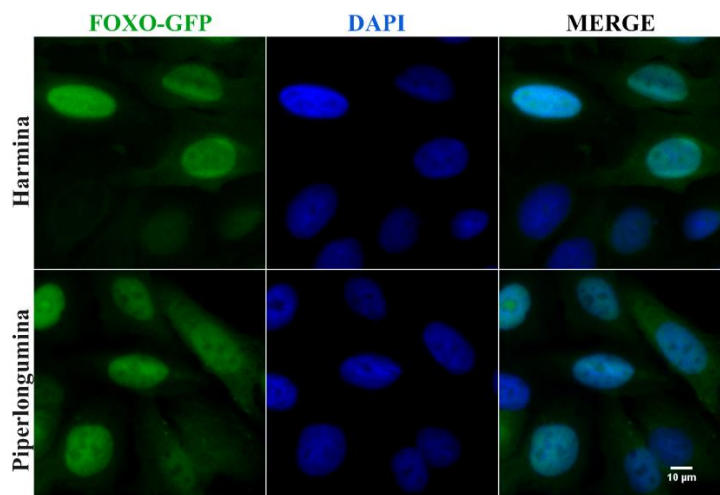
Assim, a hipótese também é confirmada para Piperlongumina em determinadas condições experimentais, o que significa que este composto natural tem a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO.



**Figura V.19- FOXO-GFP está distribuído uniformemente em células sem tratamento e localizado no núcleo em células tratadas com Leptomomicina B.** As células U2OS FOXO foram tratadas com DMSO, Leptomomicina B e Etanol durante 1h. A Leptomomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

As imagens captadas por microscopia fluorescente (Figura V.21) representam visualmente os resultados obtidos pela quantificação de Harmina e Piperlongumina. A marcação verde dada pelo GFP representa a localização subcelular de FOXO, a marcação a azul dada pelo DAPI representa o núcleo das células e, por fim, o merge, representa a sobreposição das duas marcações.

Neste âmbito, o tratamento com DMSO resulta na distribuição uniforme de FOXO-GFP no núcleo e no citoplasma das células U2OS FOXO. A situação é idêntica na presença de etanol. No entanto, a presença de Leptomomicina B, induz, praticamente na totalidade, a localização nuclear de FOXO-GFP (Figura V.20).



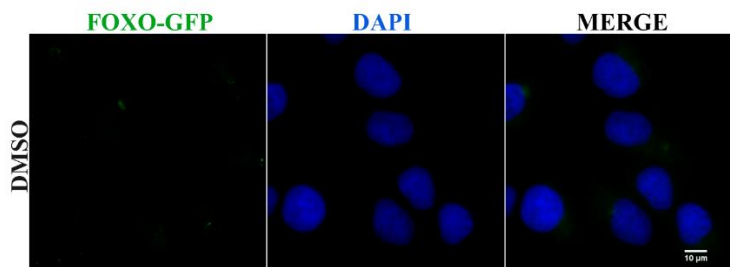
**Figura V.20- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com Harmina e Piperlongumina.** As células U2OS FOXO foram tratadas com Harmina e Piperlongumina. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

A Figura V.21 mostra que tanto na presença de Harmina, como de Piperlongumina, as células apresentam FOXO-GFP maioritariamente no núcleo. Estes dados estão de acordo com as quantificações obtidas e confirmam novamente a hipótese que afirma que estes compostos induzem a localização nuclear de FOXO.

No seguimento das experiências anteriores, a primeira questão que se coloca com base nestes resultados é se o efeito observado na localização de FOXO de células tratadas com Harmina é influenciado pela sua autofluorescência. A Harmina é descrita como um alcalóide beta ( $\beta$ )-carbonílico fluorescente dado que, assim como outros compostos isolados da planta *Peganum harmala*, apresenta autofluorescência.

Como consequência, tornou-se necessário avaliar esta característica e para isso realizou-se o tratamento de células sem sobreexpressão de FOXO-GFP com as células GFP-U2OS PARENTAL- com Harmina a 16  $\mu$ M. É importante referir que, também se realizou o tratamento

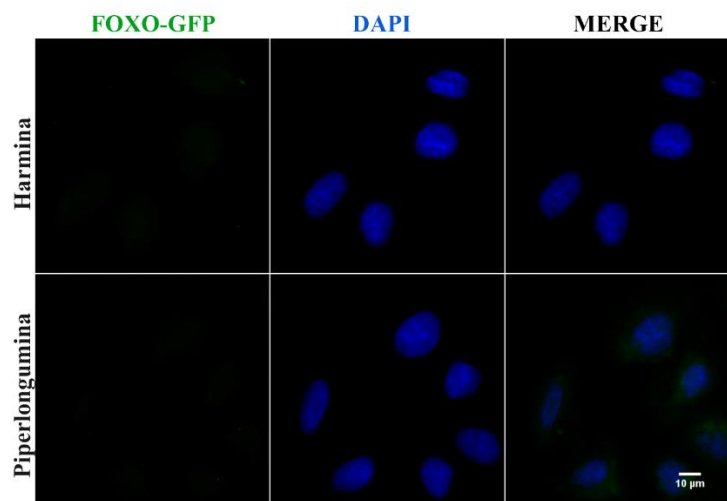
destas células com Piperlongumina a 13  $\mu$ M, ainda que não existam dados referentes à existência de autofluorescência [155, 156].



**Figura V.21- As células U2OS PARENTAL sem tratamento não apresentam fluorescência.**

As células U2OS PARENTAL foram tratadas com DMSO que foi utilizado como controlo negativo. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

A Figura V.22 representa os resultados obtidos com o controlo negativo que neste caso consiste no DMSO uma vez que foi o solvente utilizado na preparação dos dois compostos naturais. É possível observar que na presença de DMSO não se observa qualquer fluorescência no canal GFP.

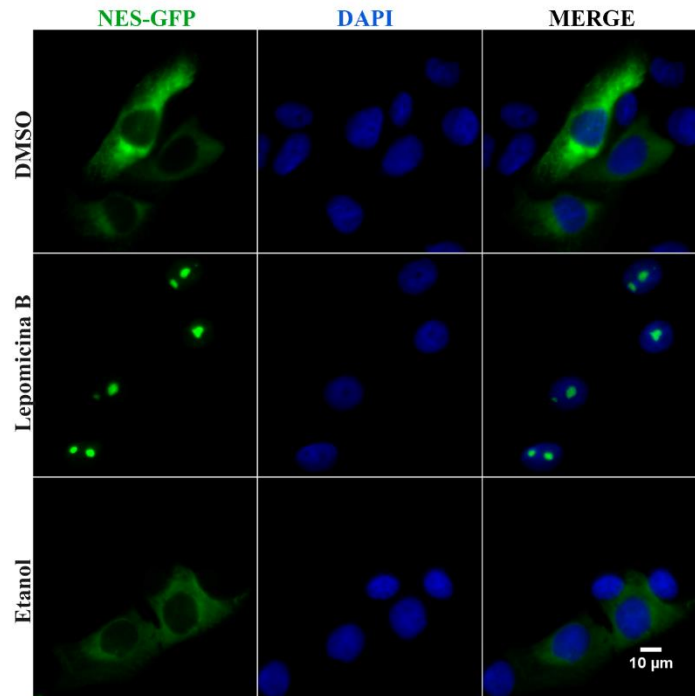


**Figura V.22-** As células U2OS PARENTAL tratadas com Harmina e Piperlongumina não apresentam fluorescência. As células U2OS PARENTAL foram tratadas com DMSO Harmina e Piperlongumina. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Os resultados referentes a Harmina e Piperlongumina (Figura V.23) são semelhantes aos obtidos com o controlo negativo, o que significa que nenhum destes compostos apresenta autofluorescência. Assim, os resultados observados na linha celular U2OS FOXO são, efetivamente, o efeito dos compostos naturais na localização de FOXO.

Neste seguimento, estabeleceu-se uma nova hipótese relativamente ao efeito observado pelos dois compostos naturais. FOXO é um Fator de transcrição que, tal como referido anteriormente, apresenta uma sequência NES na sua estrutura, a qual marca a proteína para ser exportada do núcleo para o citoplasma da célula [28,35, 36]. A exportação de FOXO é realizada por exportinas que reconhecem a sequência NES, sendo que CRM1 é a exportina mais estudada [2, 28, 35, 36, 39-42]. Neste sentido, a inibição de CRM1 é um mecanismo que impede a exportação de proteínas como FOXO e garante a sua localização no núcleo. *Kau et al* identificou vários compostos inibidores da exportação de proteínas ao interferir com CRM1 [27, 48].

Assim, estabeleceu-se a hipótese que Harmina e Piperlongumina induzem a localização nuclear de FOXO ao interferir com CRM1. Para testar esta hipótese, recorreu-se a um modelo celular que expressa de forma estável a proteína de fusão GFP-NES- U2OS NES, o qual foi tratado com Harmina a 16  $\mu$ M e Piperlongumina a 13  $\mu$ M. Este modelo é utilizado em experiências relacionadas com a translocação nucleocitoplasmática de proteínas, mais concretamente a exportação nuclear [147].

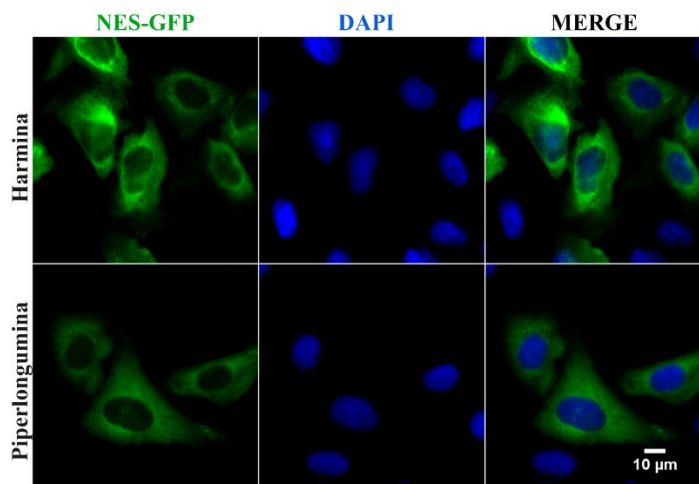


**Figura V.23-NES está localizado no citoplasma em células sem tratamento e localizado no núcleo em células tratadas com Leptomycin B.** As células U2OS NES foram tratadas com DMSO, Leptomycin B e Etanol durante 1h. A Leptomycin B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de NES-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Os controlos utilizados são os mesmos da experiência com células U2OS FOXO- DMSO, etanol e Leptomycin B. De forma semelhante às experiências com células U2OS FOXO,

DMSO foi utilizado como controlo negativo porque é o solvente no qual Harmina e Piperlongumina foram preparados. O etanol corresponde ao solvente da Leptomicina B e, conseqüentemente, ao controlo negativo deste fármaco. A Leptomicina B é o controlo positivo dado que está descrito como inibidor da exportação nuclear dependente de CRM1.

Na presença de DMSO e de etanol, as células apresentam NES distribuído uniformemente no citoplasma, enquanto na presença de Leptomicina B, NES está acumulado no núcleo (Figura V.24).



**Figura V.24- NES-GFP está localizado no citoplasma de células tratadas com Harmina e Piperlongumina.** As células U2OS NES foram tratadas com Harmina e Piperlongumina. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Os resultados obtidos com o tratamento da linha celular U2OS NES com Harmina e Piperlongumina são semelhantes e revelam que NES está localizado no citoplasma das células, tal como no controlo negativo pelo que a hipótese é rejeitada (Figura V.25). Portanto, Harmina e Piperlongumina induzem a localização de FOXO no núcleo, mas sem interferir com CRM1.

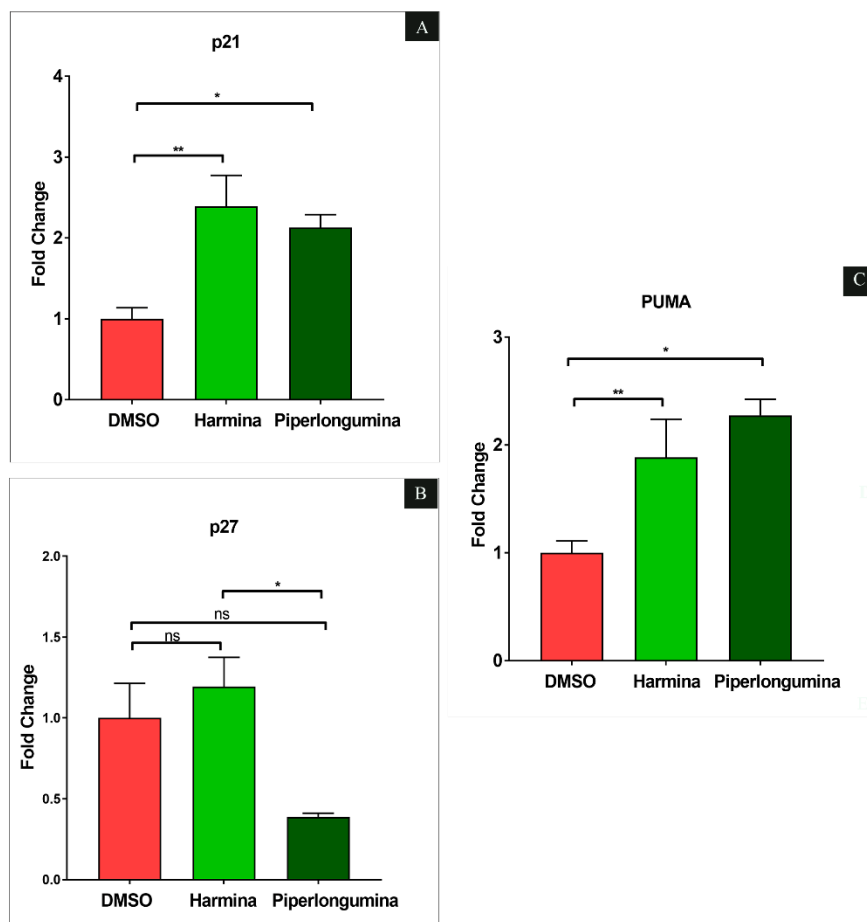
### **V.1.2. RT-qPCR**

As experiências anteriores demonstram que Harmina e Piperlongumina têm capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO e que o mecanismo pelo qual isto acontece não está envolvido com a inibição da exportina CRM1.

Em acréscimo, como explicitado inicialmente, Harmina e Piperlongumina correspondem aos compostos que promovem um perfil transcricional inverso ao de TRIB2, quando sobre-expresso, selecionados pelo cMAP no âmbito da dissertação de doutoramento da aluna Susana Machado.

Como consequência, neste momento, tornou-se importante avaliar se o tratamento das células com estes dois compostos naturais modula a transcrição de diferentes genes-alvo de FOXO. A aluna Susana Machado procedeu à análise de uma lista de genes inversamente regulados por TRIB2 e por Harmina e Piperlongumina, da qual foram selecionados 3 genes-alvo de FOXO: p21, p27 e PUMA.

Assim, foi realizado o tratamento de células U2OS PARENTAL, que possui níveis endógenos de FOXO, com estes compostos naturais e o posterior estudo quantitativo da expressão destes genes com recurso à técnica RT-qPCR. As condições experimentais correspondem às utilizadas nas experiências do cMAP, nomeadamente 6 horas de tratamento das células com Harmina a 16  $\mu$ M e Piperlongumina a 13  $\mu$ M. Em acréscimo, o RT-qPCR foi realizado em conjunto com a aluna de doutoramento do laboratório, Susana Machado.



**Figura V.25- Harmina e Piperlongumina afetam a transcrição de genes-alvo de FOXO.** A análise foi obtida através de células U2OS PARENTAL tratadas com Harmina a 16  $\mu\text{M}$  e Piperlongumina a 13  $\mu\text{M}$  durante 6h. A Os níveis de expressão do mRNA de três genes-alvo de FOXO foram avaliados, nomeadamente o A) p21; B) p27 e C) PUMA, através da realização de RT-qPCR e a expressão génica é apresentada sob a forma de *fold change*. O DMSO foi utilizado como controlo negativo. As análises estatísticas foram obtidas com recurso ao programa Bio-Rad CFX Manager 3.0. O GAPDH foi utilizado como gene *housekeeping*. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnnett's multiple test comparison*.

A Figura V.26 contém os resultados obtidos pelo RT-qPCR em forma de *Fold Change*. O controlo negativo utilizado foi o DMSO uma vez que, tal como já mencionado neste trabalho, representa o solvente no qual os compostos foram preparados (Tabela IV.3).

Em primeiro lugar, o p21 é um inibidor do ciclo celular regulado por FOXO3a em resposta ao Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Este Fator ativa a transcrição de Mães contra

o homólogo decapentaplégico 3 (SMAD3) e 4 (SMAD4), os quais se ligam ao DBD de FOXO3a que, por sua vez, induz p21 a parar o ciclo celular na fase G1/S <sup>[159, 160]</sup>. A Figura V.26A demonstra que tanto Harmina como Piperlongumina aumentam os níveis transcricionais de p21, sendo este aumento estatisticamente significativo comparativamente ao controlo negativo ( $P$  (Harmina)=0,0068;  $P$  (Piperlongumina)= 0,0212; *Dunnett's multiple test comparison*). Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que demonstram que Harmina e Piperlongumina resultam na *upregulation* de p21 em contexto cancerígeno, como é o caso de Zhang. P. et al. (2015) e Liu. J et al. (2016) <sup>[90, 97, 99-102, 104, 161]</sup>.

Em acréscimo, segundo a literatura, quando FOXO3a se encontra ativo no núcleo, induz a expressão de p27. Este gene pertence à família de genes pró-apoptóticos Bcl-2 e, à semelhança do p21, inibe a progressão do ciclo celular <sup>[162, 163]</sup>. Na Figura V.26B pode-se observar que Harmina aumenta a expressão de p27, ainda que de forma ligeira comparativamente a DMSO. Por outro lado, Piperlongumina provoca uma grande diminuição da expressão de p27, observável pelo baixo valor de *fold change* obtido em relação ao controlo negativo. A diferença do efeito de Harmina e Piperlongumina é estatisticamente significativa ( $P=0,0411$ ; *Dunnett's multiple test comparison*). Liu. J et al. (2016) e mostram que Harmina resulta na *upregulation* de p27 em linhas celulares cancerígenas, aumentando a sua ligação a CDKs do ciclo celular e, conseqüentemente, resultando na paragem do ciclo celular em G1 <sup>[90, 161]</sup>. No que diz respeito a Piperlongumina, Song. X et al (2018) e Kang. Q et al (2015) mostram que os níveis de expressão de p27 aumentam, porém, os resultados são referentes aos níveis proteicos e não ao mARN <sup>[163-166]</sup>. Assim, os resultados obtidos para Harmina estão de acordo com a literatura, sendo que este composto aumenta os níveis transcricionais de p27.

Por último, PUMA é um gene que está envolvido na apoptose dependente ou independente de p53 e já se encontra descrito que o aumento da transcrição de FOXO3a resulta na *upregulation* de PUMA e conseqüentemente, na apoptose de linhas celulares cancerígenas <sup>[167, 168]</sup>. O tratamento das células com Piperlongumina aumentou os níveis transcricionais de PUMA como se observa na Figura V.26C, apresentando uma grande diferença estatística do controlo negativo ( $P=0,0291$ ; *Dunnett's multiple test comparison*). De forma idêntica, Harmina também aumentou a expressão deste gene com uma grande diferença estatística de DMSO, mas com um efeito menor que Piperlongumina. Os resultados estão de acordo com a literatura uma vez que a capacidade destes compostos naturais aumentar os níveis de mARN de PUMA já se encontra descrita <sup>[90, 97]</sup>.

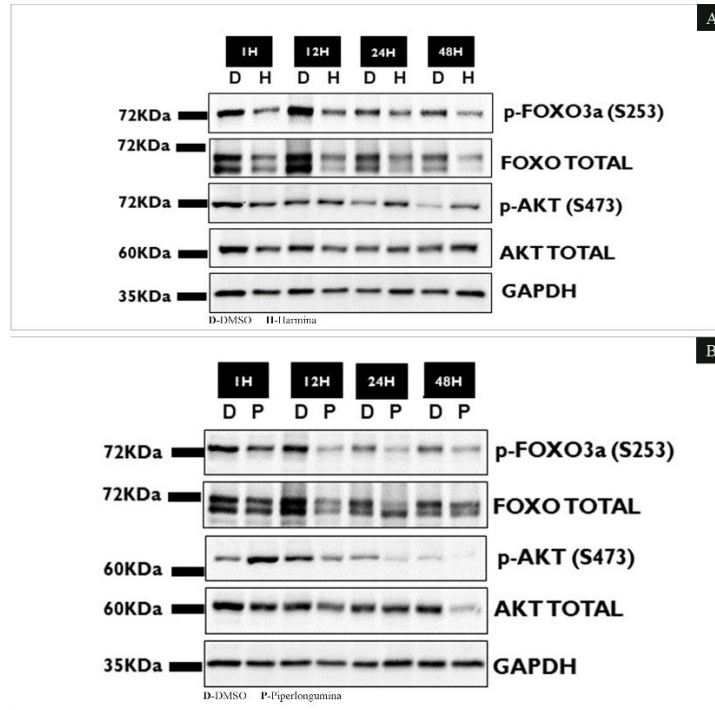
Em suma, Harmina e Piperlongumina induzem a localização nuclear de FOXO e, conseqüentemente, afetam os níveis transcricionais dos genes alvo deste Fator de transcrição, nomeadamente do p21, p27 e PUMA. A única exceção corresponde ao gene p27, cujos níveis diminuem com o tratamento das células com Piperlongumina.

### **V.1.3. Western blot**

Após verificar se os compostos naturais afetam a transcrição dos genes alvo de FOXO, foi realizada uma análise a nível proteico com recurso ao *western blot*. Neste sentido, as células U2OS FOXO foram tratadas com Harmina a 16  $\mu$ M e Piperlongumina 13  $\mu$ M durante 1h, 12h, 24h e 48h. As células também foram tratadas com DMSO que corresponde ao controlo negativo.

Como referido anteriormente, as concentrações selecionadas são correspondentes às utilizadas nas experiências do cMAP. Em acréscimo, as horas de tratamento aplicadas foram selecionadas de acordo com os dados da literatura [88, 99]. É importante referir que a incubação das células com os compostos em DMEM foi precedida pela substituição do meio para EBSS, quando as placas apresentavam 70% de confluência. Isto para garantir que as condições experimentais nas diferentes horas de tratamento eram as mesmas e para evitar a confluência excessiva e, conseqüente, morte das células com 24h e 48h de tratamento.

A posterior realização do *western blot* a estas células permitiu detetar os níveis totais de Akt e de FOXO, assim como os níveis de fosforilação de p-FOXO (S253) e p-Akt (S473). Os resultados estão na Figura V.27 e foram realizados pela aluna do laboratório Susana Machado.



**Figura V.26- Níveis de p-FOXO3a aumentam em células que sobre-expressam FOXO-GFP tratadas com Piperlongumina.** A análise foi obtida através da realização de *western blot* a células U2OS FOXO tratadas com A) Harmina a 16  $\mu$ M e B) Piperlongumina a 13  $\mu$ M durante diferentes tempos de incubação (1h, 12h, 24h e 48h). O DMSO foi utilizado como controlo negativo e está representado por D. Harmina está representada por H e Piperlongumina por P. A percentagem de todos os *running géis* foi de 10%. Foi carregado 25 a 30  $\mu$ L de lisado de proteína total e 3  $\mu$ L do marcador NZY Blue Protein Marker, por poço. Os níveis de fosforilação de FOXO foram detetados através de um anticorpo específico anti-FOXO fosforilado (p-FOXO3a S253). Os níveis de fosforilação de Akt foram detetados através de um anticorpo específico anti-Akt fosforilado (p-Akt S473). FOXO3a TOTAL e Akt TOTAL foram utilizados como controlos da quantidade de proteína. GAPDH foi utilizado como controlo de *loading*. O sinal foi detetado através do Sistema de imagem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, EUA), acoplado ao programa Image Lab 4.0 para análise e deteção de imagens.

A Figura V.27A permite verificar que o tratamento com Harmina há uma diminuição tanto dos níveis proteicos de FOXO total como da fosforilação desta mesma proteína. Esta última pode ser justificada pela diminuição da proteína total.

No que diz respeito aos níveis proteicos de Akt ou da fosforilação desta proteína, não se verifica nenhum efeito de Harmina, o que pode significar que Harmina não modula a atividade

transcricional de FOXO através da sinalização Akt. Estas observações aplicam-se a todas as horas de tratamento (1h, 12h, 24h e 48h).

Relativamente ao tratamento com Piperlongumina (Figura V.27B), verifica-se uma diminuição dos níveis proteicos de FOXO total, assim como da fosforilação desta proteína, mas apenas com 12h ou mais de tratamento. De forma idêntica ao observado com Harmina, uma vez que os níveis de FOXO total diminuíram com o tratamento das células com Piperlongumina, a diminuição da fosforilação de FOXO pode ser uma consequência deste facto.

Os níveis proteicos de Akt total, à exceção do tratamento de 48h, não diminuíram, porém, a fosforilação de Akt diminuiu a partir das 12h de tratamento. Isto significa que a modulação da ativação de FOXO por Piperlongumina pode ser através do Akt.

## V.2. SCREENING

### V.2.1. Quantificação Manual

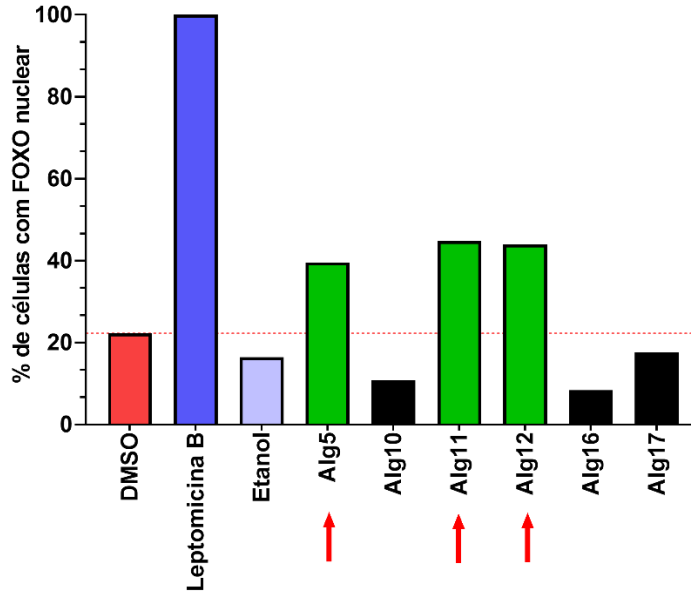
#### Extratos de microalgas (Alg1-Alg18)

No âmbito da colaboração entre o laboratório Wolfgang Link e o CCMAR no projeto AlgaRED+, foram inicialmente fornecidos 6 extratos de microalgas de espécies diferentes, sendo que cada extrato foi extraído em 3 solventes diferentes: H<sub>2</sub>O, Etanol e Acetato de Etilo (EA). Assim, obteve-se um total de 18 extratos de microalgas, aos quais foram atribuídos códigos (Alg1—Alg18), os quais estão representados na tabela X.1. do Anexo 1, juntamente com o código original, espécie e solvente de extração correspondentes.

Segundo a pesquisa bibliográfica evidenciada na secção 4 da introdução denominada “PROPRIEDADES ANTICANCERÍGENAS DE PRODUTOS NATURAIS” existem extratos de microalgas e componentes derivados de microalgas com propriedades anticancerígenas [116-118].

Neste sentido, estabeleceu-se a hipótese, enunciada previamente no capítulo III, que os extratos de microalgas Alg1 a Alg18 induzem a localização nuclear de FOXO, tornando-se necessário analisar a localização subcelular de FOXO em células tratadas com estes extratos. Com o objetivo de resolver esta questão, a linha celular U2OS FOXO foi tratada com estes 18 extratos de microalgas, durante 1 hora e com concentrações diferentes (Tabela IV.3), obtendo-se os resultados representados na Figura V.28. Como referido previamente, estes resultados foram

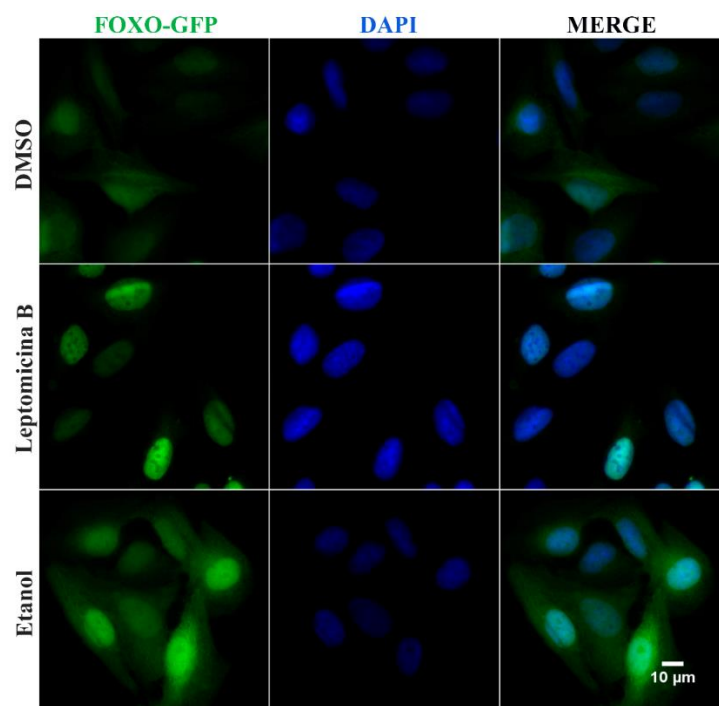
obtidos, numa fase inicial, a partir da quantificação manual de células com FOXO-GFP nuclear, com recurso à microscopia fluorescente, tal como detalhado nos métodos.



**Figura V.27- Quantificação manual de FOXO-GFP nuclear em células tratadas com extratos de microalgas.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes extratos de microalgas (Alg5, Alg10, Alg11, Alg12, Alg16 e Alg17) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação manual de 250 células individuais. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.

A Figura V.28 representa a percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo após o tratamento com o controlo positivo (Leptomicina B) e negativo (DMSO), e com Alg5, Alg10, Alg11, Alg12, Alg16 e Alg17. É possível observar que, nas células tratadas com o controlo positivo, a localização de FOXO-GFP é praticamente 100% nuclear, enquanto nas células tratadas com o controlo negativo apenas 22% apresentam FOXO-GFP nuclear. No que diz respeito às células tratadas com extratos de microalgas, é possível destacar Alg5, Alg11 e Alg12 uma vez que cerca de 40%, 45% e 44% das células, respetivamente, apresentam FOXO-GFP localizado no núcleo. A percentagem de células com FOXO-GFP nuclear após o tratamento com os restantes extratos é igual ou inferior à do controlo negativo. O tratamento da linha celular U2OS FOXO com

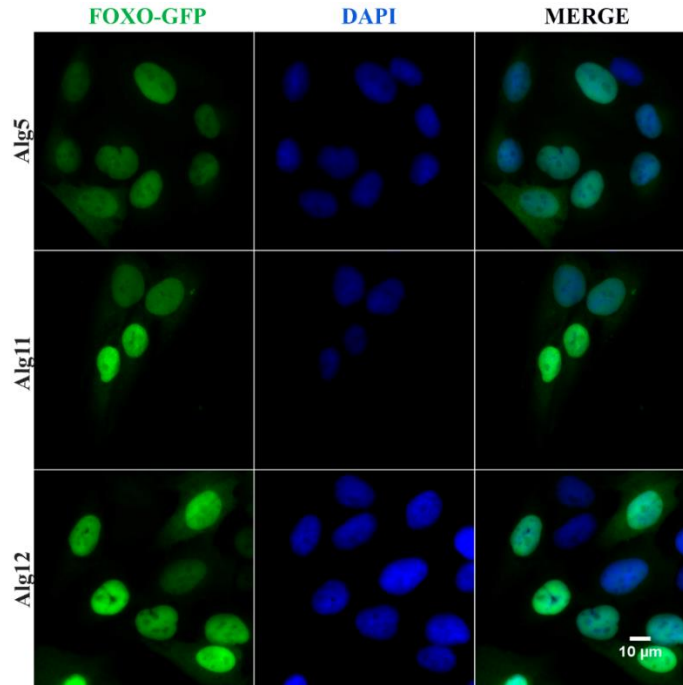
Alg10, Alg16 e Alg17 resultou em cerca de 11%, 9% e 18% células com FOXO-GFP nuclear, enquanto o controlo negativo apresenta 22% células com FOXO-GFP nuclear. Estes resultados indicam que a hipótese se confirma para três extratos de microalgas, Alg5, Alg11 e Alg12 e é rejeitada para os extratos Alg10, Alg16 e Alg17. Por outras palavras, Alg5, Alg11 e Alg12 induzem a localização nuclear de FOXO.



**Figura V.28- FOXO-GFP está distribuído uniformemente em células sem tratamento e localizado no núcleo em células tratadas com Leptomycin B.** As células U2OS FOXO foram tratadas com DMSO, Leptomycin B e Etanol durante 1h. A Leptomycin B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

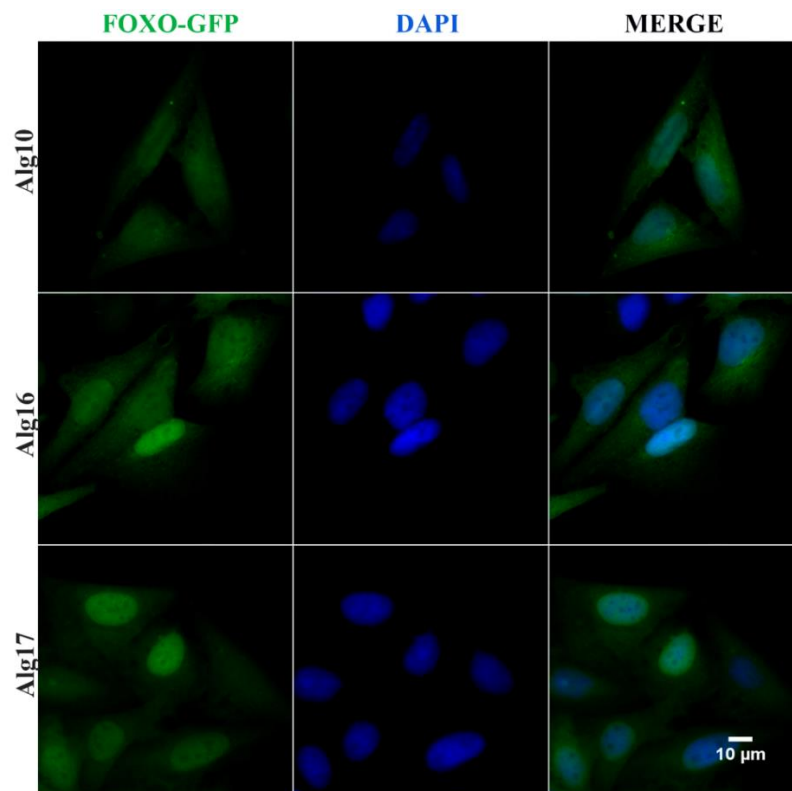
As imagens captadas por microscopia fluorescente, representadas na Figura V.29 estão de acordo com a quantificação. Na presença do controlo negativo, FOXO-GFP encontra-se

uniformemente distribuído no núcleo e no citoplasma das células U2OS FOXO. A situação é idêntica na presença de etanol. Na presença de Leptomicina B, FOXO-GFP está localizado no núcleo praticamente na totalidade.



**Figura V.29- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Relativamente aos extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12, têm a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO-GFP, o que é observável pelas imagens obtidas (Figura V.30). Por outro lado, Alg10, Alg16 e Alg17 não têm essa capacidade e apresentam resultados semelhantes ao controlo negativo, onde FOXO-GFP está praticamente uniformemente distribuído no núcleo e no citoplasma das células (Figura V.31).

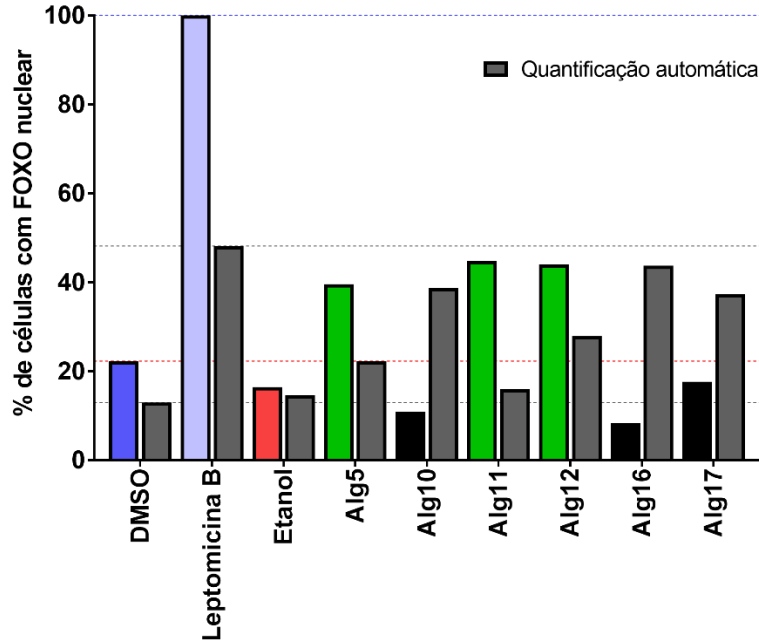


**Figura V.30- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg10, Alg16 e Alg17.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg10, Alg16 e Alg17 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Por fim, é importante referir que as células tratadas com os restantes extratos de microalgas não se encontravam em boas condições, pelo que foi efetuada apenas uma análise qualitativa, e não quantitativa, das células disponibilizada na tabela X.4. do Anexo 2. Neste sentido, a experiência foi repetida nas mesmas condições experimentais, mas os dados foram analisados com recurso a um método de análise quantitativo diferente: a quantificação automática.

## V.2.2. Quantificação Automática

### Extratos de microalgas (Alg5, Alg10- Alg12, Alg16 e Alg17)



**Figura V.31- Comparação da quantificação manual e automática de FOXO-GFP nuclear em células tratadas com extratos de microalgas.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes extratos de microalgas (Alg5, Alg10, Alg11, Alg12, Alg16 e Alg17) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação manual de 250 células individuais. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5* (cinzento). Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.

A Figura V.32 apresenta ambas as quantificações efetuadas- manual e automática- a células U2OS FOXO tratadas com Alg5, Alg10-Alg12, Alg16 e Alg17 em experiências independentes, realizadas em dias diferentes e temporalmente distantes. Antes de mais, as células submetidas ao controlo positivo apresentaram uma grande diferença nas duas quantificações no que diz respeito à localização de FOXO. Na quantificação manual, FOXO-GFP encontra-se localizado no núcleo de todas as células tratadas com Leptomicina B, enquanto na automática apenas cerca de metade

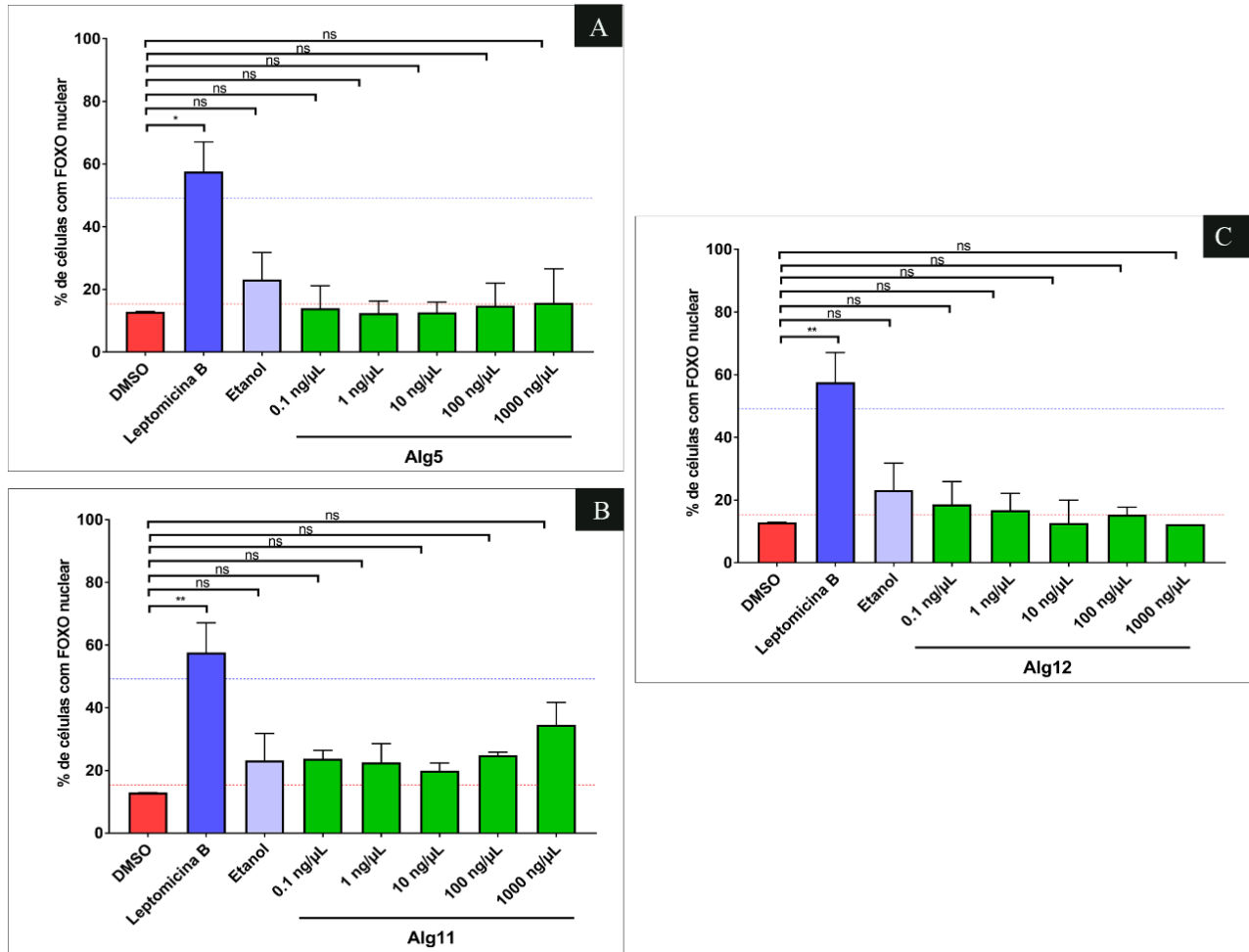
das células apresentam FOXO-GFP localizado no núcleo. Para além disso, o controlo negativo também resultou num menor número de células com FOXO-GFP nuclear comparativamente à quantificação manual. No que diz respeito ao etanol, a diferença entre as duas quantificações não é significativa e ambas demonstram cerca de 15% de células com FOXO-GFP no núcleo.

De forma semelhante ao observado com os controlos, o tratamento das células com os extratos de microalgas apresenta diferenças notórias relativamente à localização nuclear de FOXO. A percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo na presença de Alg5, Alg11 e Alg12 é muito inferior ao observado na quantificação manual, apresentando percentagens semelhantes ou inferiores à situação observada com o controlo negativo. Por outro lado, na presença de Alg10, Alg16 e Alg17 a percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo é idêntica ao observado com o controlo positivo.

Por outras palavras, segundo a quantificação automática, a hipótese é rejeitada para Alg5, Alg11 e Alg12 e confirmada para Alg10, Alg16 e Alg17. Assim, os resultados obtidos com as duas quantificações e apresentados na Figura V.32 não coincidem, sendo inclusive opostos. No entanto, a quantificação manual constituiu a primeira experiência realizada no presente estudo, o que pode ter comprometido a qualidade das células que, tal como referido anteriormente, não se encontravam em boas condições. Neste seguimento, a quantificação automática foi aplicada numa fase com maior prática laboratorial, tanto na cultura de células como na análise microscópica e seguinte captação de imagem.

Ainda assim, a quantificação automática dos extratos de microalgas Alg1-Alg18 foi precedida pela repetição do tratamento das células U2OS FOXO com Alg5, Alg11 e Alg12, mas com concentrações diferentes (0.1 ng/ $\mu$ L; 1 ng/ $\mu$ L; 10 ng/ $\mu$ L; 100 ng/ $\mu$ L e 1000 ng/ $\mu$ L), dado terem sido considerados inicialmente resultados positivos pela quantificação manual.

### Alg5, Alg11 e Alg12



**Figura V.32- Os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12 não induzem a localização nuclear de FOXO-GFP.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações (0.1 ng/µL; 1 ng/µL; 10 ng/µL; 100 ng/µL e 1000 ng/µL) dos extratos de microalgas (A) Alg5; (B) Alg11; (C) Alg12; durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de duas experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*.

Em primeiro lugar, é de referir que, apesar dos gráficos representados na Figura V.33 terem sido realizadas no âmbito dos resultados obtidos por quantificação manual, foram obtidas com recurso à quantificação automática.

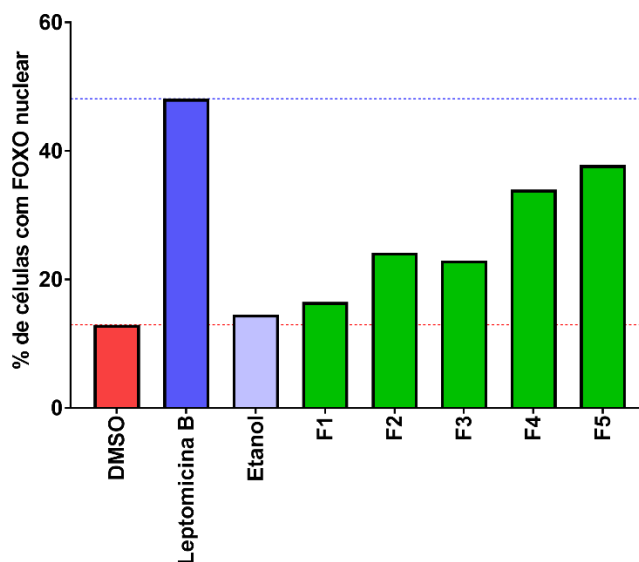
Em segundo lugar, as diferentes concentrações de Alg5, Alg11 e Alg12 utilizadas resultaram em percentagens de células com FOXO-GFP nuclear idênticas às do controlo negativo (Figura V.33A e V.33C). Apenas a concentração mais elevada de Alg11 (1000 ng/ $\mu$ L) apresentou uma percentagem maior de células com FOXO-GFP localizado no núcleo (Figura V.33B), ainda que não estatisticamente significativa. Por sua vez, o controlo positivo apresentou diferença estatística significativa comparativamente ao DMSO ( $P_A=0,0109$ ;  $P_B=0,0029$ ;  $P_C= 0,0095$ ; *Dunnnett's multiple test comparison*).

Isto significa que não se observa uma relação de dose-resposta para nenhum dos extratos de microalgas selecionados através da quantificação manual, à exceção de Alg11 com uma ligeira resposta à concentração de 1000 ng/ $\mu$ L. Não obstante, os resultados estão de acordo com o que se obteve pela quantificação automática, aumentando a sua fiabilidade e rejeitando novamente a hipótese para este extratos.

No decurso dos resultados anteriormente obtidos, tornou-se necessário entender a ligeira capacidade de Alg11 induzir a localização nuclear de FOXO pelo que o CCMAR procedeu ao fracionamento deste extrato para posterior análise.

#### **Frações de Alg11 (F1-F5)**

A análise incidiu em 4 frações (F1-F4) de Alg11 extraídas com diferentes solventes- hexano, diclorometano, acetato de etilo e água e etanol- e na solução *stock* (F5 ou EPS) em concentrações iguais, à exceção de F4. O solvente de extração utilizado para cada fração encontra-se na tabela X.2. do Anexo 1, enquanto as concentrações utilizadas estão descritas na Tabela IV.3.



**Figura V.33- A fração F4 de Alg11 induz a localização nuclear de FOXO-GFP.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes frações (F1, F2, F3 e F4) do extrato de microalga Alg11 (F5) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.

Segundo a Figura V.34, as frações F1, F2 e F3 não induzem a localização nuclear de FOXO. No entanto, o tratamento com F4 resulta numa percentagem de células com FOXO localizado no núcleo semelhante à de F5, a solução *stock*. Por outras palavras, a substância ativa responsável pela ligeira indução da localização nuclear de FOXO por Alg11 pode estar presente na fração F4.

#### **Extratos de microalgas, de Haloarqueas e extratos proteicos, pigmentares e celulares destes microrganismos (Alg1-Alg32)**

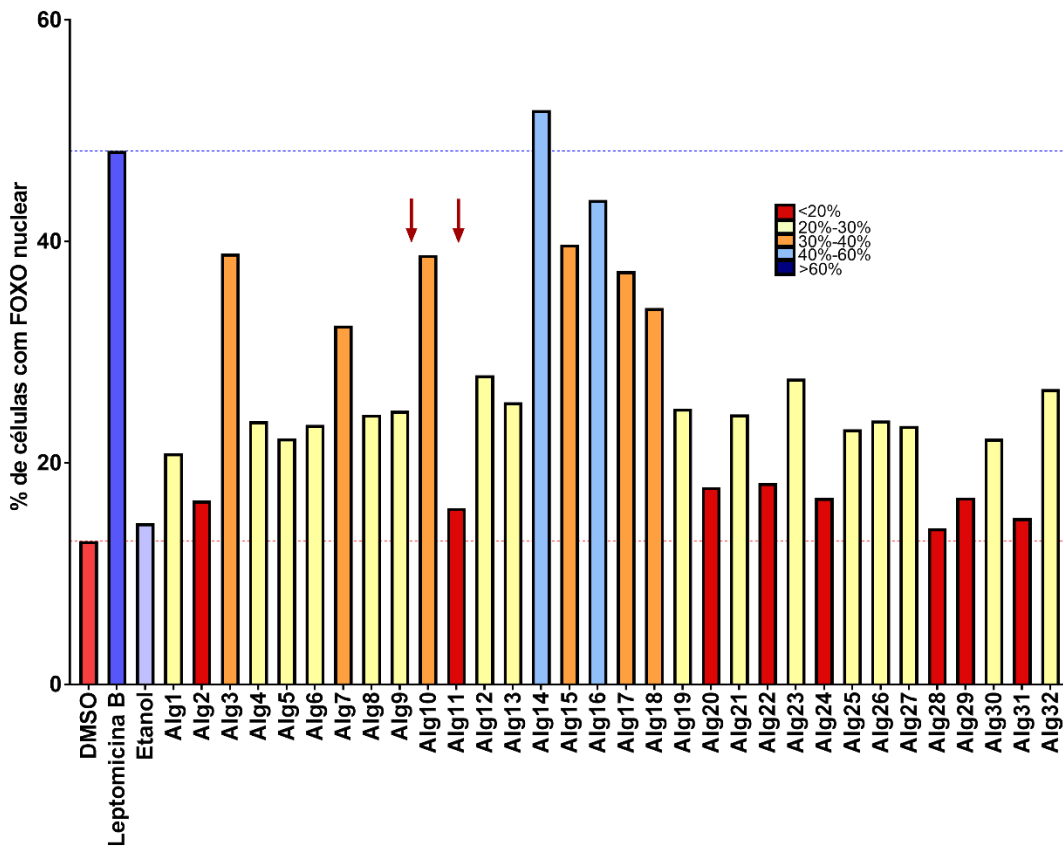
No âmbito da colaboração entre o laboratório Wolfgang Link e o CEIMAR da Universidade de Huelva foram também fornecidos diversos extratos de Haloarqueas de duas espécies diferentes, nomeadamente 4 extratos de *Haloarcula* e 4 extratos de *Halobacterium*. Um dos extratos destas espécies foi extraído em solventes diferentes: Hexano, diclorometano, EA e clorofórmio. Os restantes 3 extratos de cada uma destas espécies são extratos proteicos, pigmentares e celulares. Os extratos pigmentares foram extraídos em acetona e os extratos celulares correspondem ao *pellet*

resultante da extração com acetona, do qual, por sua vez, se ressuspendeu num *buffer* aquoso que contém as proteínas solúveis que se precipitaram na acetona.

Assim, para além dos 18 extratos de microalgas, obteve-se um total de 14 extratos de haloarqueas, às quais foram atribuídos códigos (Alg19—Alg32), os quais estão representados na tabela X.1. do Anexo 1, juntamente com o código original, espécie e solvente de extração correspondentes.

Como descrito anteriormente, foi realizada a quantificação automática das células tratadas com Alg1-Alg18 e, simultaneamente, das tratadas com os extratos de Haloarqueas e extratos proteicos, pigmentares e celulares destes mesmos microrganismos (Alg19-Alg32).

A Figura V.32 exibida acima apenas continha os resultados relativos a Alg5, Alg10-Alg12, Alg16 e Alg17, enquanto a Figura V.35 abaixo engloba os restantes extratos de microalgas e haloarqueas.

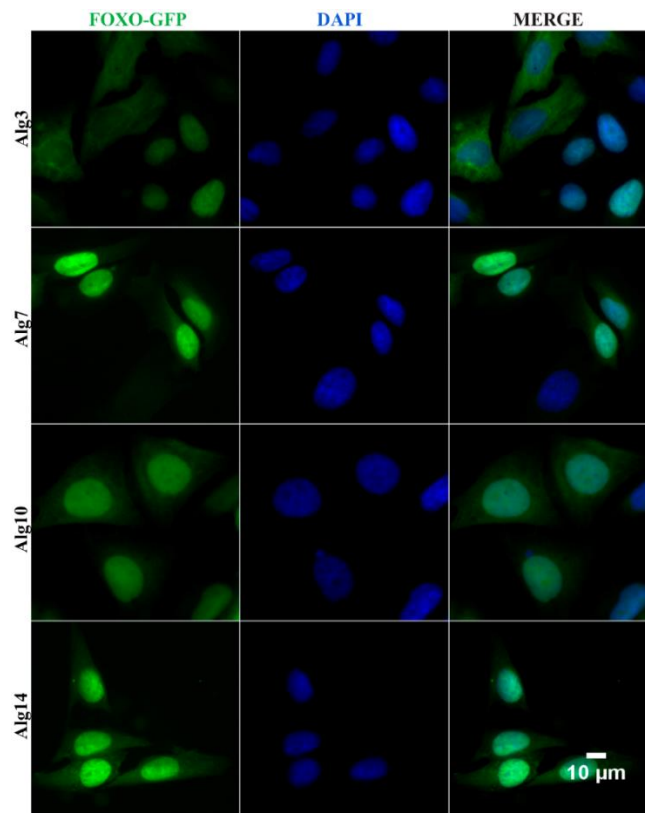


**Figura V.34- Os extratos de microalgas Alg14 e Alg16 induzem a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes extratos de microalgas, de Haloarqueas e extratos proteicos, pigmentares e celulares destes mesmos microrganismos (Alg1- Alg-32) durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.

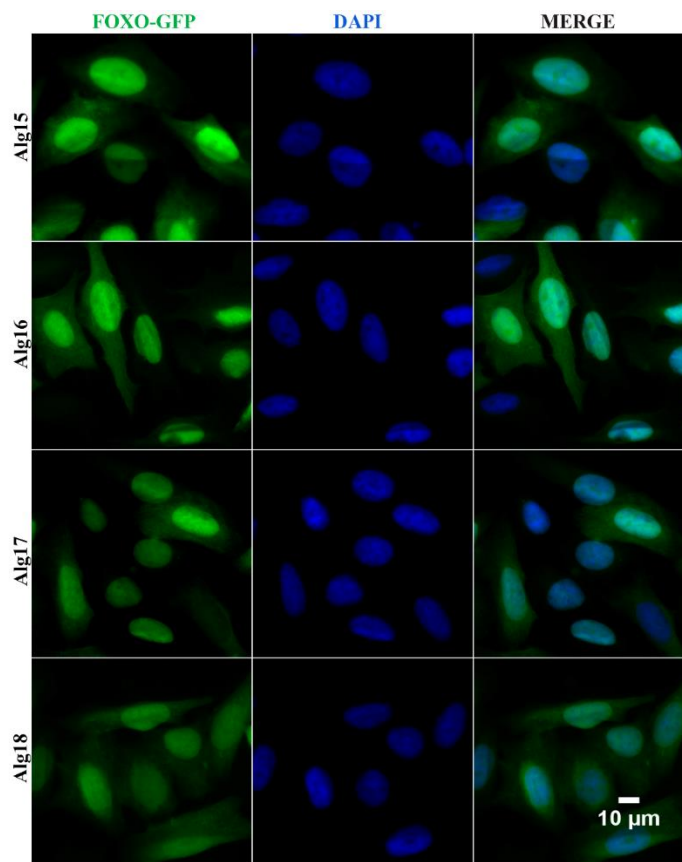
Primeiramente, dado o elevado número de extratos, foram estabelecidas 5 categorias que correspondem a diferentes percentagens de células com FOXO nuclear, nomeadamente <20%, entre 20-30%, entre 30-40%, entre 40-60% e >60%, e que são representadas por diferentes cores.

Em segundo lugar, e tal como referido anteriormente, a Figura V.35 demonstrou a existência de diferenças nos controlos, onde DMSO- controlo negativo- resultou em cerca de 13% de células com FOXO localizado no núcleo e Leptomicina B- controlo positivo- em

aproximadamente 50%. Neste sentido, os extratos com capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO em pelo menos 30% das células, foram definidos como resultados positivos. Isto significa que Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18 constituem resultados positivos da quantificação automática, ou seja, resultados que confirmam a hipótese definida previamente. Em acréscimo, Alg14 e Alg16 destacam-se com 52% e 44% de células com FOXO no núcleo, valores semelhantes e superiores, respetivamente, ao observado no controlo positivo. Assim, todos os novos extratos fornecidos (Alg19-Alg32) se revelaram resultados negativos, ou seja, rejeitam a hipótese.



**Figura V.35- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com os extratos de microalgas Alg3, Alg7 e Alg10 e Alg14.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg3, Alg7 e Alg10 e Alg14 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.



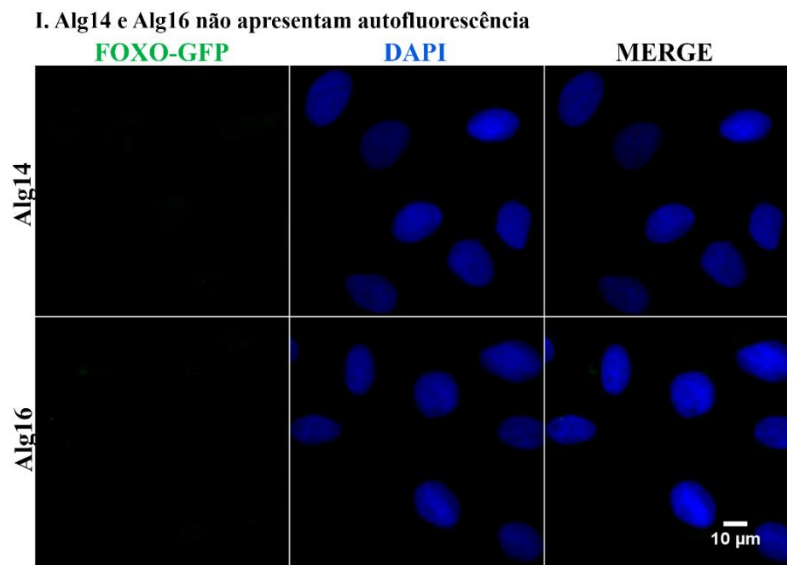
**Figura V.36- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com os extratos de microalgas Alg15, Alg16 e Alg17 e Alg18.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg15, Alg16 e Alg17 e Alg18 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

As imagens captadas por microscopia fluorescente (Figura V.36 e V.37) clarificam os resultados obtidos pela quantificação. Na presença de Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18, considerados resultados positivos pela quantificação, FOXO-GFP está localizado maioritariamente no núcleo das células-situação idêntica à encontrada com o controlo positivo. Novamente, tal como na quantificação, o resultado é destacado no tratamento com Alg14 (Figura V.36) e Alg16 (Figura V.37). O tratamento com os restantes extratos de microalgas e de haloarqueas, de forma geral, representa a situação observada na presença do controlo negativo ou de etanol, isto é, FOXO-GFP

distribuído uniformemente nas células. Estes extratos foram considerados resultados negativos pela análise da quantificação automática e estão representados nas Figuras X.1.-X.10. do Anexo 3.

Neste momento, a primeira questão que se coloca com base nestes resultados é se o efeito observado na localização de FOXO de células tratadas com estes extratos é influenciado pela autofluorescência característica dos extratos de microalgas [169].

Como consequência, aplicou-se a metodologia utilizada na abordagem bioinformática com Harmina e Piperlongumina para verificar a existência de autofluorescência, ou seja, realizou-se o tratamento de U2OS PARENTAL com os extratos considerados resultados positivos, nomeadamente Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18.



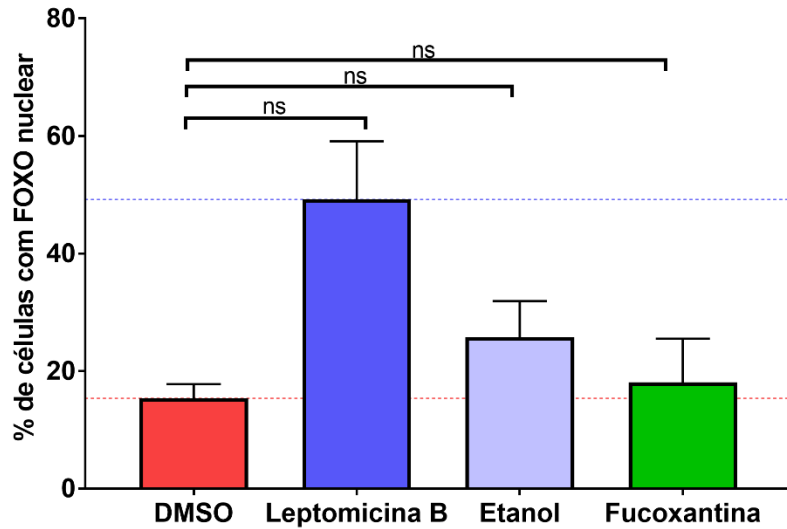
**Figura V.37- As células U2OS PARENTAL tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16 não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

A Figura V.38 apresenta, a título exemplificativo, as imagens obtidas pelo tratamento da linha celular U2OS PARENTAL com Alg14 e Alg16, dado consistirem nos extratos que induziram a maior percentagem de células com FOXO-GFP nuclear. No entanto, também representam os resultados obtidos com os restantes extratos com efeitos positivo na localização de FOXO. É possível observar que nenhum destes extratos apresenta autofluorescência, o que significa que os resultados observados na linha celular U2OS FOXO são, efetivamente, o efeito dos extratos na localização de FOXO. Esta experiência já tinha sido realizada com os extratos considerados como resultados positivos inicialmente pela quantificação manual e encontram-se no Anexo 4.

Neste momento, surgem duas novas hipóteses relativamente ao efeito observado pelos extratos de microalgas em FOXO. Antes de mais, como descrito anteriormente, existem vários componentes derivados de microalgas com propriedades farmacológicas, e muitas são importantes na área da investigação do cancro. Os carotenoides são um exemplo de compostos presentes em microalgas e que apresentam propriedades anticancerígenas. A fucoxantina é um dos carotenoides amplamente estudado por estas propriedades. *Kumar. S. et al (2013)*, *Takahashi. K et al (2015)* e *Satomi. Y et al (2017)* descrevem que a fucoxantina tem efeitos citotóxicos em linhas celulares cancerígenas e que inibe a carcinogénese <sup>[170-172]</sup>.

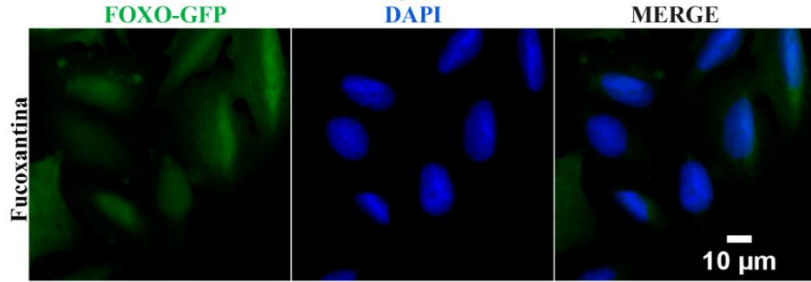
Em acréscimo, o CCMAR forneceu este carotenoide ao laboratório pelo que a primeira hipótese que surge é que a fucoxantina induz a localização nuclear de FOXO.

### Fucoxantina



**Figura V.38- Fucoxantina não induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com fucoxantina durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os *P-values* são apresentados sob *Ns*= Não significativo. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM.

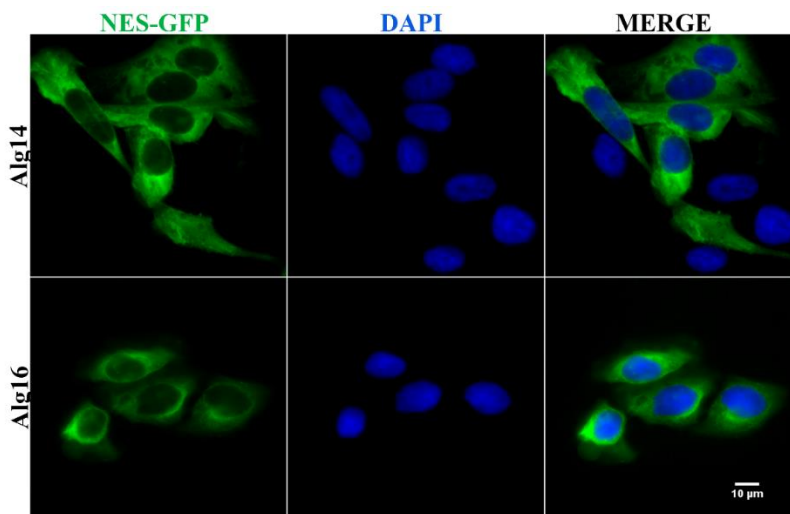
Para resolver esta questão, a linha celular U2OS FOXO foi submetida a um tratamento de uma hora com fucoxantina e os resultados obtidos estão na Figura V.39. É possível observar que a percentagem de células tratadas com fucoxantina que apresentam FOXO-GFP no núcleo é semelhante à situação do controlo negativo. Esta situação pode ter duas interpretações. Por um lado, esta substância pode não ter capacidade de translocar FOXO para o núcleo, rejeitando a hipótese formulada. Por outro lado, a fucoxantina pode ser responsável apenas por uma parte do efeito observado na translocação de FOXO, confirmando parcialmente a hipótese. Por outras palavras, a fucoxantina pode não ter qualquer efeito na localização de FOXO, por si só, mas sim quando em sinergia com outra substância.



**Figura V.39- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com fucoxantina.** As células U2OS FOXO foram tratadas com fucoxantina durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Estes resultados são clarificados pelas imagens captadas por microscopia fluorescente (Figura V.40), as quais demonstram que na presença de fucoxantina, FOXO-GFP está distribuído uniformemente no núcleo e no citoplasma das células. Ou seja, a localização de FOXO-GFP em células tratadas com fucoxantina e com DMSO é idêntica.

Neste âmbito, devido à incerteza do efeito da fucoxantina na localização de FOXO, foram analisados outros mecanismos que justifiquem o efeito dos extratos de microalgas. Assim, de forma idêntica ao estipulado para Harmina e Piperlongumina, estabeleceu-se a hipótese que os extratos de microalgas considerados resultados positivos induzem a localização nuclear de FOXO ao interferir com CRM1. Para testar esta hipótese aplicou-se a metodologia utilizada anteriormente com Harmina e Piperlongumina, ou seja, tratou-se a linha celular U2OS NES com os respetivos extratos de microalgas (Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18).

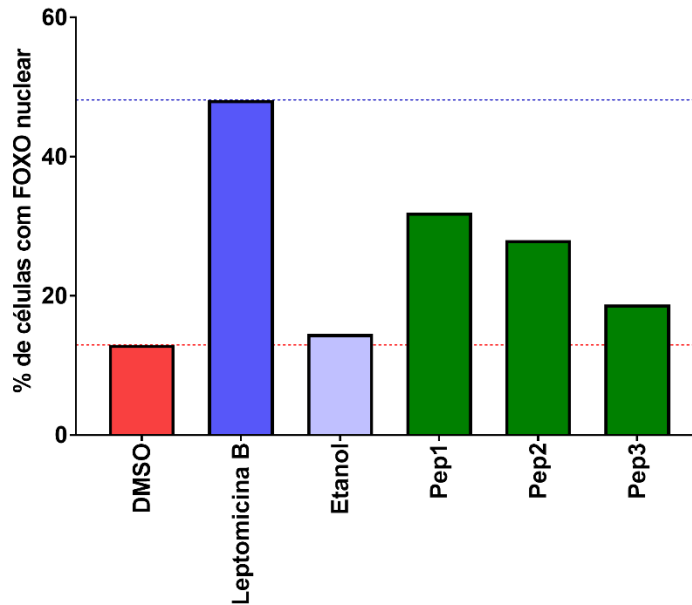


**Figura V.40- NES-GFP está localizado no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16.** As células U2OS NES foram tratadas com os extratos de microalgas Alg14 e Alg16 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

A título exemplificativo, a Figura V.41 apresenta os resultados obtidos com o tratamento da linha celular U2OS NES com Alg14 e Alg16, dado consistirem nos extratos que induziram a maior percentagem de células com FOXO-GFP nuclear. No entanto, também representam os resultados obtidos com os restantes extratos com efeitos positivo na localização de FOXO. É possível observar que NES está localizado no citoplasma das células tratadas com os extratos de microalgas, tal como no controlo negativo pelo que a hipótese é rejeitada. Portanto, os extratos de microalgas induzem a localização de FOXO no núcleo, mas sem interferir com CRM1.

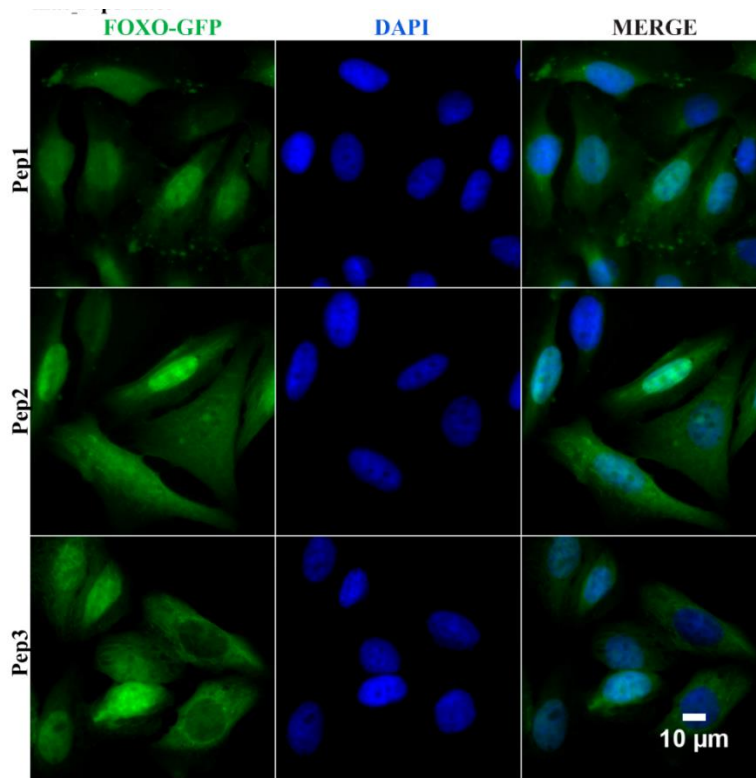
### Péptidos

Por fim, a hipótese também foi testada para os três péptidos (Pep1, Pep2 e Pep3) fornecidos no âmbito do projeto AlgaRED+, mencionado previamente, com recurso à mesma metodologia. Ou seja, no tratamento de células U2OS FOXO com estes péptidos durante uma hora e á mesma concentração, a qual se encontra na Tabela IV.3. A identificação de cada péptido, assim como os respetivos tamanhos e espécies estão descritos na tabela X.3. do Anexo 1.



**Figura V.41- Quantificação da localização de FOXO-GFP em células tratadas com três péptidos.** As células U2OS FOXO, tratadas com os péptidos Pep1, Pep2 e Pep3 foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada.

A quantificação dos resultados está na Figura 4 V.2 e demonstra que o tratamento com Pep3 resulta em poucas células com FOXO-GFP no núcleo, o que é comparável à situação do controlo negativo. Já o tratamento com Pep1 e Pep2, apresenta um maior número de células com FOXO-GFP nuclear, ainda que baixo quando comparado com o controlo positivo. Neste sentido, Pep1 e Pep2 podem ter a capacidade de induzir localização nuclear de FOXO pelo que a hipótese para estes compostos é confirmada. Por outro lado, a hipótese é rejeitada por Pep3.



**Figura V.42- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os péptidos Pep1, Pep2 e Pep3.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os péptidos Pep1, Pep2 e Pep3 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

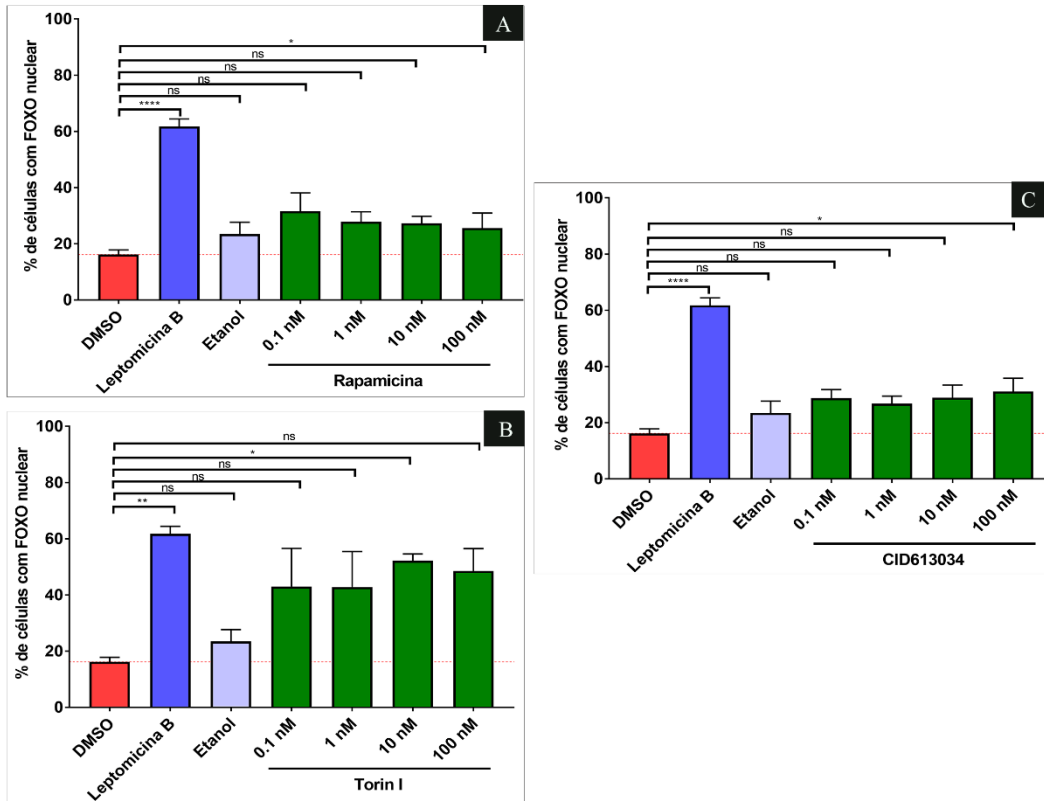
As imagens captadas por microscopia fluorescente referentes aos péptidos estão representadas na Figura V.43. Observa-se que a maioria das células tratadas com Pep1 como com Pep2 apresentam FOXO-GFP distribuído no núcleo e no citoplasma de forma uniforme e apenas algumas apresentam FOXO-GFP localizado exclusivamente no núcleo. No que diz respeito a Pep3, a maioria das células apresentam FOXO-GFP nuclear e citoplasmático uniformemente distribuído, mas algumas delas apresentam FOXO-GFP localizado apenas no citoplasma.

### V.3. CANDIDATE APPROACH

#### Inibidores de mTOR

##### V.3.1. Microscopia fluorescente

A primeira parte da *candidate approach* está relacionada com três inibidores de mTOR- Rapamicina, Torin 1 e CID613034- e, como descrito previamente, mTOR está associado à proteína Akt uma vez que esta cinase é fosforilada por mTORC2 e, por sua vez, fosforila mTORC1. Dado que a Rapamicina inibe o complexo mTORC1, Torin 1 inibe mTORC1/2 e CID613034 inibe mTORC2, estabeleceu-se novamente a hipótese enunciada anteriormente no capítulo III, mas para estes inibidores <sup>[119,120]</sup>. Por outras palavras, foi colocada a hipótese que a Rapamicina, Torin 1 e CID613034 induzem a localização nuclear de FOXO. Os resultados da quantificação das células U2OS-FOXO com FOXO nuclear após o tratamento de 1 hora com estes três inibidores a diferentes concentrações (0.1 nM, 1 nM, 10 nM e 100 nM) encontra-se na Figura V.44. Tal como nas abordagens anteriores, o DMSO- solvente dos fármacos (Tabela IV.3) - e o etanol são os controlos negativos e a Leptomicina B corresponde ao controlo positivo.

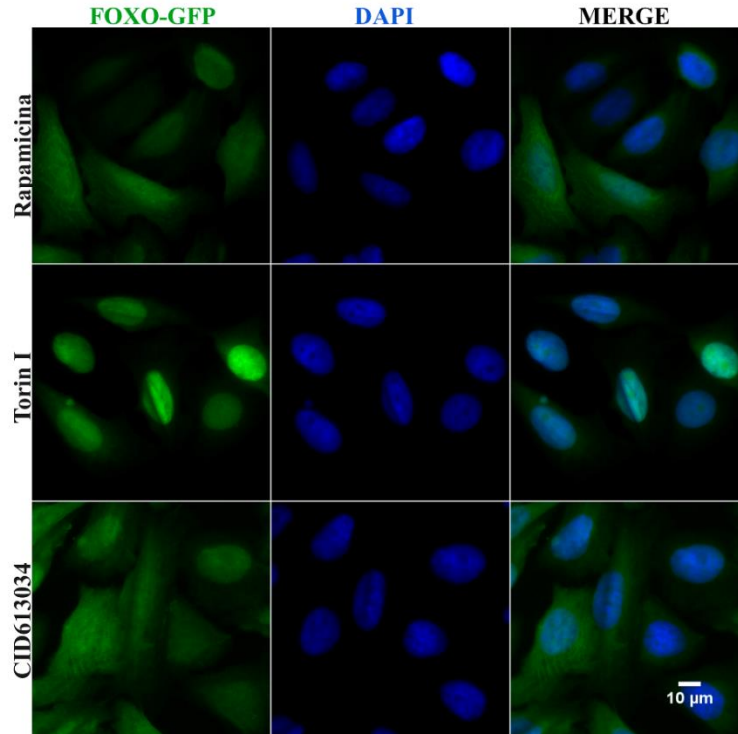


**Figura V.43- Torin 1 induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações (0.1 nM, 1 nM, 10 nM e 100 nM) de três inibidores de mTOR (A) Rapamicina; (B) Torin 1 e (C) CID63034 durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. O A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.000$ ; Ns= Não significativo; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*.

A quantificação revelou que apenas Torin 1 tem capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO-GFP no núcleo dado que, contrariamente ao controlo negativo, o tratamento com este fármaco resultou em mais de 40% de células com FOXO-GFP no núcleo em todas as concentrações utilizadas (Figura V.44B). Ainda assim, o efeito mais significativo foi com Torin 1 a 10 nM ( $P=0,0282$ ; *Dunnett's multiple test comparison*).

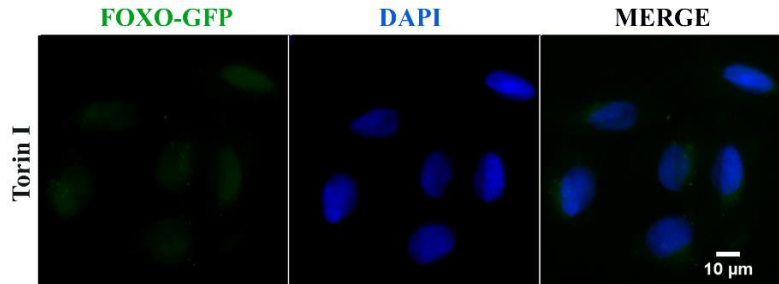
Na presença de Rapamicina (Figura V.44A) e de CID613034 (Figura V.44C), o número de células com FOXO-GFP no núcleo varia entre cerca de 25% a 30%, o que corresponde a uma diferença pequena comparativamente ao controlo negativo, onde apenas 16% das células apresentam FOXO-GFP no núcleo. Esta observação aplica-se às diferentes concentrações destes fármacos, ainda que a Rapamicina a 0.1 nM e CID613034 a 100 nM ( $P=0,0435$ ; *Dunnnett's multiple test comparison*), o número de células com FOXO-GFP no núcleo seja ligeiramente superior às concentrações restantes. Por outras palavras, o tratamento com estes fármacos resulta num aumento do número de células comparativamente ao controlo negativo, mas a diferença não é significativa o suficiente para garantir o efeito de Rapamicina e de CID613034 na localização de FOXO.

Portanto, a hipótese é apenas confirmada para Torin 1, com destaque para a concentração de 10 nM e rejeitada para os restantes inibidores de mTOR, pelo que este fármaco tem a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO.



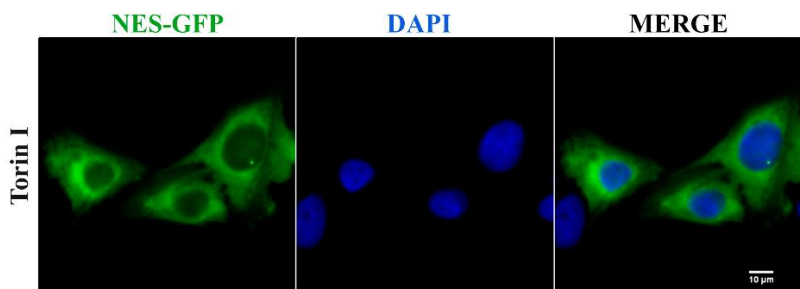
**Figura V.44- FOXO-GFP está localizado no núcleo de células tratadas com Torin 1.** As células U2OS FOXO foram tratadas com três inibidores de mTOR: Rapamicina, Torin 1 e CID613034. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

As imagens recolhidas por microscopia fluorescente representam visualmente os resultados obtidos pela quantificação (Figura V.45). A Rapamicina e CID613034 apresentam células maioritariamente com FOXO-GFP distribuído uniformemente no núcleo e no citoplasma, situação idêntica à do controlo negativo (Figura V.20). Por contraste, quase todas as células tratadas com Torin 1 contêm FOXO-GFP no núcleo, tal como a Leptomicina B (Figura V.20).



**Figura V.45-** As células U2OS PARENTAL tratadas com Torin 1 não apresentam fluorescência. As células U2OS PARENTAL foram tratadas com Torin 1. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Dado que a autofluorescência de Harmina, Piperlongumina e dos extratos de microalgas com efeito positivo na localização nuclear de FOXO foi testada, aplicou-se o mesmo procedimento a Torin 1 (Figura V.46). De forma idêntica ao observado nas abordagens anteriores deste trabalho, o tratamento das células U2OS PARENTAL com Torin 1 a 10 nM durante 1 hora é comparável ao obtido com DMSO (Figura V.22), isto é, não se observa fluorescência do fármaco.



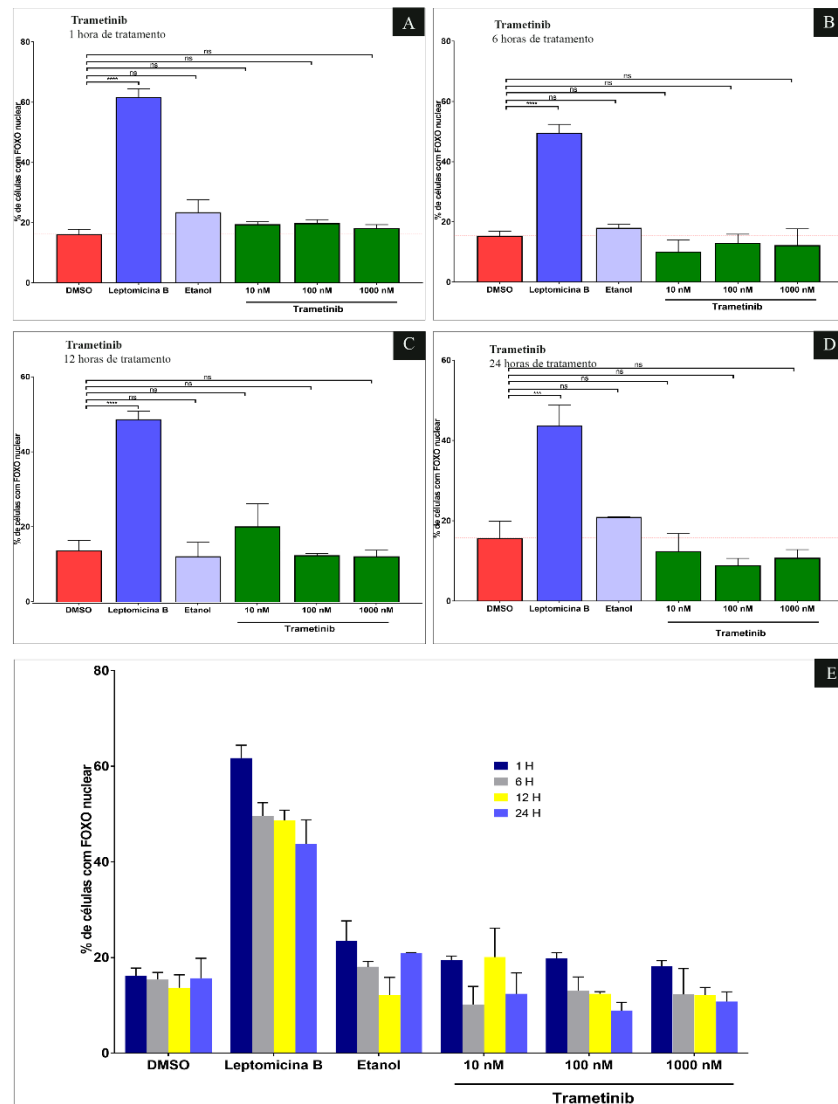
**Figura V.46-** NES-GFP está localizado no citoplasma de células tratadas com Torin 1. As células U2OS NES foram tratadas com Torin 1. O GFP (verde) representa a localização subcelular de NES. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

Por fim, à semelhança do que se fez anteriormente, foi estabelecida a hipótese que este fármaco induz a localização nuclear de FOXO ao interferir com CRM1. Recorreu-se ao mesmo modelo celular (U2OS NES), tratado com Torin 1 a 10 nM durante 1 hora.

Os resultados representados na Figura V.47 são semelhantes ao observado com DMSO (Figura V.24) dado que, em ambas as situações, NES está localizado no citoplasma das células, pelo que a hipótese é rejeitada. Consequentemente, Torin 1 induz a localização de FOXO no núcleo, mas também o faz sem interferir com CRM1.

### **Trametinib**

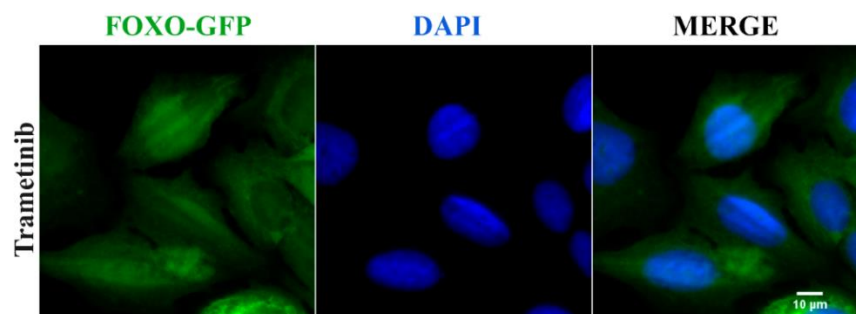
O trametinib é um inibidor de MEK com capacidade de induzir a apoptose em células de cancro colorretal via expressão do PUMA. Sendo este um gene-alvo de FOXO, a hipótese enunciada previamente no capítulo III foi testada para este fármaco, nomeadamente que o trametinib induz a localização nuclear de FOXO.



**Figura V.47- Trametinib não induz a localização de FOXO-GFP no núcleo.** As células U2OS FOXO, tratadas com diferentes concentrações (10 nM, 100 nM e 1000 nM) de Trametinib a (A) 1h; (B) 6h; (C) 12h e (D) 24h durante 1h foram quantificadas para obter a percentagem de células com FOXO localizado no núcleo. O A Leptomicina B foi utilizada como controlo positivo da localização nuclear de FOXO-GFP. O etanol e o DMSO foram utilizados como controlos negativos. A localização de FOXO-GFP foi analisada através de microscopia fluorescente e quantificação automática com recurso ao programa *Definiens Developer 2.5*. Apenas a percentagem de células com localização nuclear de FOXO-GFP é apresentada. Os dados estão expressos através da média de três experiências independentes  $\pm$  SEM. Os *P-values* significativos são apresentados sob \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; e foram obtidos através de *Dunnett's multiple test comparison*.

O tratamento das células U2OS FOXO com Trametinib a diferentes horas (1h, 6h, 12h e 24h) concentrações (10 nM, 100 nM e 1000 nM) é mostrado na Figura V.48. A hipótese é rejeitada dado que não se verifica um efeito positivo do fármaco na localização de FOXO no núcleo. Uma hora de tratamento com trametinib (Figura V.48A) resulta no mesmo número de células com FOXO nuclear que DMSO (Figura V.20). No entanto, o aumento do número de horas de tratamento com este fármaco diminui mais a percentagem de células com FOXO no núcleo em todas as concentrações, à exceção de 12h de trametinib a 10 nM (Figura V.48E). Mais concretamente, menos de 16% das células apresentam FOXO no núcleo (Figura V.48B, C e D), o que representa um efeito menor que o obtido com o controlo negativo (Figura V.20).

### V.3.1. Microscopia fluorescente



**Figura V.48- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com Trametinib.** As células U2OS FOXO foram tratadas com Trametinib. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

A Figura V.49 é uma representação visual das observações anteriores. As células quando tratadas com trametinib contêm FOXO distribuído uniformemente no núcleo e no citoplasma, assim como o controlo negativo da experiência (Figura V.20) pelo que, este fármaco não induz a localização nuclear de FOXO.

## VI. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A translocação nuclear de FOXO permite reativar a sua atividade biológica supressora de tumor e consiste numa abordagem terapêutica anticancerígena. Neste sentido, a descoberta de compostos com capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO, para aplicação futura numa abordagem terapêutica anticancerígena e antienvhecimento, é extremamente importante.

O presente estudo teve precisamente como objetivo descobrir diversos compostos com esta capacidade e dividiu-se em três partes: uma abordagem bioinformática, um *screening* e uma *candidate approach*.

Os resultados obtidos foram apresentados e descritos anteriormente pelo que seguidamente é apresentada a discussão dos mesmos.

### VI.1. ABORDAGEM INFORMÁTICA

O nosso laboratório realizou uma abordagem bioinformática, com recurso a uma ferramenta denominada cMAP, que resultou na seleção de dois compostos naturais, nomeadamente Harmina e Piperlongumina.

Segundo esta ferramenta bioinformática, Harmina e Piperlongumina induzem um perfil transcricional inverso ao de TRIB2<sup>[73,74]</sup>. A proteína TRIB2 foi identificada anteriormente num *screening* genético de larga escala como repressora de FOXO. Isto significa que a descoberta de compostos que induzem um perfil de expressão génica inverso ao induzido por TRIB2, permite reverter os efeitos de TRIB2 na célula a nível transcricional<sup>[73, 74, 77, 90-92]</sup>. Neste sentido, estabeleceu-se a hipótese que Harmina e Piperlongumina induziam a localização nuclear de FOXO.

A observação de células U2OS FOXO tratadas com estes compostos através de microscopia fluorescente permitiu observar que FOXO-GFP se encontra localizado no núcleo da maioria das células. A quantificação de FOXO-GFP reforçou os resultados anteriores uma vez que as células tratadas com Harmina e Piperlongumina apresentam uma maior e significativa percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo, em comparação ao controlo negativo. O efeito na localização nuclear de FOXO-GFP é mais acentuado com o tratamento das células com Harmina a 16  $\mu\text{M}$  durante 1 hora e com Piperlongumina a 13  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ . No caso de Piperlongumina, o efeito à concentração de 13  $\mu\text{M}$  é observado tanto com 6h, como com 12h e 24h de incubação, porém o efeito mais pronunciado é com 12h de incubação. Por sua vez, Piperlongumina a 50  $\mu\text{M}$  consiste

na concentração à qual o efeito na localização nuclear de FOXO é mais pronunciado e à qual o efeito é observado em todas as horas de tratamento.

Assim, os resultados obtidos permitem afirmar que Harmina e Piperlongumina têm a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO. Não obstante, o RT-qPCR realizado a células U2OS PARENTAL tratadas com estes compostos, demonstrou que estes também têm capacidade de afetar a transcrição dos genes-alvo de FOXO. Harmina aumentou os níveis transcricionais de p21, p27 e PUMA, enquanto Piperlongumina aumentou os níveis transcricionais de p21 e PUMA e diminuiu os níveis de p27. Para além disso, este efeito foi estatisticamente significativo comparativamente ao controlo negativo.

Por fim, foi realizado um *western blot* de forma a analisar os níveis de fosforilação de FOXO e de Akt nas células U2OS FOXO após o tratamento com estes compostos naturais a diferentes tempos de incubação. Harmina resultou na simultânea diminuição dos níveis de fosforilação de FOXO (S) e dos níveis de FOXO total a todas as horas de incubação. Assim, a diminuição observada na fosforilação pode ser apenas uma consequência da diminuição de FOXO total e não o efeito de Harmina. Para além disso, Harmina não apresentou nenhum efeito nos níveis proteicos ou de fosforilação de Akt a nenhum tempo de incubação pelo que, provavelmente, a modulação da atividade transcricional de FOXO por Harmina não é realizada através da sinalização Akt.

Contrariamente, os resultados obtidos com Piperlongumina demonstram que a modulação da ativação de FOXO por Piperlongumina é através do Akt. Isto porque o tratamento das células com este composto resultou na diminuição dos níveis de fosforilação de Akt a partir das 12h de tratamento, sem alteração nos níveis de Akt total. Os níveis de fosforilação de FOXO (S) também diminuíram com o tratamento de 12h ou mais horas de incubação com Piperlongumina. No entanto, este efeito pode ser apenas uma consequência da diminuição dos níveis de FOXO total também observada.

Harmina é um alcalóide beta ( $\beta$ )-carbonílico inicialmente descoberto pelas suas propriedades antidepressivas ao inibir MAO-A <sup>[75-77]</sup>. No entanto, este composto possui outros efeitos farmacológicos, nomeadamente atividade citotóxica, inibidor da proliferação celular e, ainda, atividade anti-angiogénica <sup>[68,70,76]</sup>. Em acréscimo, *Lamchouri F. et al* (2013) e *Li C. et al* (2017) descreveram que este composto apresenta atividade anticancerígena <sup>[75,76, 82, 86- 89]</sup>.

Os estudos relativamente à inibição da proliferação celular por Harmina mostram que este efeito é obtido através da inibição de diferentes vias de sinalização, inclusive a via PI3K /Akt. *Zhang et al.* (2016) e *Li. C et al* (2017) descrevem que Harmina e derivados deste composto promovem a apoptose e autofagia em determinadas linhas celulares através da inibição da via PI3k/Akt/mTOR e da produção de ERO. Esta inibição teve efeito em diversas proteínas pro-apoptóticas, porém não existe referência de efeitos em FOXO a nenhum nível celular [88,91,92].

No caso de *Liu et al.* (2016), mostra que Harmina inibe as vias de sinalização de Akt e de ERK, promovendo a paragem do ciclo celular e a apoptose mediada pela via mitocondrial e, conseqüentemente, a inibição da proliferação celular [90,92]. Neste mesmo estudo foi realizado um *western blot* que permite observar uma diminuição, não só de ERK e Akt fosforilados (Ser473 e Thr308), mas também de alvos como FOXO3a [90, 91].

No entanto, este estudo foi realizado em linhas celulares de cancro colorretal humano SW620, as quais são diferentes das utilizadas no presente estudo. Em acréscimo, o *western blot* do estudo de *Liu et al.* (2016) foi realizado com um tratamento de Harmina durante 48h e a fosforilação de FOXO3a foi nas Ser318/321.

Para além disso, em 2007 a Harmina foi descrita como inibidor potente e específico de DYRK1a, uma cinase que fosforila as proteínas FOXO (num sítio de fosforilação diferente da Akt) e promove a sua saída do núcleo. Posteriormente, *Bartholome A. et al* (2010) mostrou que Harmina estimulava a acumulação de FOXO1A através de microscopia fluorescente e da análise das frações citosólicas e nucleares de FOXO. No entanto, o estudo foi realizado em fibroblastos e em células de hepatocarcinoma humano tratados com Harmina a 50 µM durante 4 horas [77, 91].

Também *Radhakrishnan. A et al* (2016) mostraram que a inibição de DYRK1a resulta na ativação de FOXO3a através da realização de *western blot*. Embora a fosforilação de Akt e de FOXO analisadas tenha sido a mesma que o presente estudo, nomeadamente a Ser473 e a Ser253, as linhas celulares utilizadas foram de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Para além disso, não existe referência relativamente ao tempo de incubação e concentração de Harmina utilizados [93-96].

Assim, este estudo é bastante importante e inovador uma vez que foi realizado numa linha celular diferente das utilizadas na literatura (U2OS FOXO) e, ainda, com vários tempos de incubação e concentrações de Harmina e não apenas um único tempo de incubação e uma única concentração. Para além disso, nenhum destes estudos analisou a localização subcelular de FOXO3A nem realizou quantificação, existindo apenas um estudo que analisou a localização subcelular de FOXO1A. Adicionalmente, embora existam estudos que tenham analisado a fosforilação de FOXO3a, *Liu et al.* (2016) observou serinas diferentes do presente estudo e *Radhakrishnan. A et al* (2016) analisou a mesma serina que este estudo, porém a fosforilação não era modulada por Akt, mas sim por DYRK1a.

Em suma, o presente trabalho permitiu observar que Harmina induz a localização nuclear de FOXO, afeta os genes-alvo desta proteína, mas que a modulação da atividade transcricional de FOXO por Harmina não é realizada através da sinalização Akt. Por outras palavras, o presente estudo analisou o potencial efeito de Harmina na localização nuclear de FOXO a diferentes níveis celulares pela primeira vez, dado que não existe nenhum estudo que o tenha feito anteriormente.

Assim, embora o mecanismo de ação para o efeito observado ainda não esteja estabelecido, existe associação com a via PI3K/Akt/FOXO, pelo que pode servir como base para a síntese de diversos fármacos anticancerígenos para aplicação terapêutica.

Relativamente aos dados de literatura de Piperlongumina, este composto natural apresenta diferentes propriedades como antidiabético, anti-inflamatório, antiplaquetário, entre outros. No entanto, o principal interesse deste composto é a sua atividade anticancerígena em múltiplas linhas celulares de cancro, propriedade descoberta através dum *screening de* 5166 amostras realizado entre 2000 e 2007 [97,98,100]. Tal como referido anteriormente, a atividade anticancerígena de Piperlongumina está, essencialmente, associada a três mecanismos: produção de ERO em células cancerígenas, inibição da via PI3K/Akt/mTOR e inibição da exportação nuclear de proteínas, os quais estão relacionados [97-102,104-107]. Piperlongumina tem a capacidade de produzir ERO devido às suas propriedades citotóxicas e citostáticas seletivas observadas *in vitro* em diferentes linhas celulares como, as de cancro da mama, próstata, pulmão e cólon, e *in vivo* como ensaios com ratinhos. Assim, a acumulação de ERO em células cancerígenas por Piperlongumina resulta na morte celular [91-93, 95]. Este composto promove ainda a morte celular através da regulação de diferentes vias de sinalização, das quais se incluem PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK [97, 100, 101, 103,

<sup>105-107]</sup>. A inibição da via PI3K/Akt/mTOR é outro mecanismo que confere uma atividade anticancerígena a Piperlongumina e que, tal como a produção de ERO, resulta na apoptose de células cancerígenas. Isto porque a sua inibição permite a ativação de diversas proteínas supressoras de tumor que induzem a apoptose.

No caso específico de FOXO, *Liu Z. et al* (2019) relata que o tratamento de linhas celulares cancerígenas HeLa com Piperlongumina induz a desfosforilação de FOXO3A, assim como a sua translocação nuclear, o que resulta na inibição da viabilidade celular e na indução da apoptose. A apoptose dependente de FOXO3a pelo tratamento com Piperlongumina é explicada pela regulação positiva do BIM nas linhas celulares cancerígenas utilizadas neste estudo. Em acréscimo, a ativação do eixo FOXO3a/BIM é realizada através da inibição da via de sinalização Akt. Neste estudo foi realizada microscopia de fluorescência para analisar a localização subcelular de FOXO3a após o tratamento com Piperlongumina a 15  $\mu$ M e durante diferentes tempos de incubação (6h, 12h e 24h). Em acréscimo, foram realizados diversos *westerns blots* para analisar a fração citosólica e nuclear de FOXO3A após o tratamento das células com Piperlongumina, mas também para analisar a fosforilação desta proteína após o tratamento com este composto. A concentração de Piperlongumina e os tempos de incubação utilizados no western blot foram iguais aos utilizados na microscopia fluorescente. Os *westerns blots* foram realizados em linhas celulares de cancro cervical HeLa, de cancro da mama MCF-7 e de cancro gástrico MGC-803 <sup>[97,99-101, 107]</sup>. Os efeitos em FOXO3a são também observados in vivo em xenoinxertos.

Assim, *Liu Z. et al* (2019) consiste no único estudo sobre o efeito de Piperlongumina em FOXO3a e que utilizou as mesmas metodologias utilizadas no presente estudo, nomeadamente a microscopia de fluorescência e os *westerns blots*. Para além disso, os tempos de incubação, assim como a concentração utilizada são iguais. No entanto, neste estudo foram utilizadas várias linhas celulares cancerígenas e um xenoinxerto, tal como referido previamente, e no presente estudo a linha celular utilizada foi U2OS FOXO. Para além disso, foram realizadas experiências complementares que não foram aplicadas no presente estudo e vice-versa. É o caso do RT-qPCR que apenas foi efetuado no presente estudo. Isto permite a comparação dos resultados obtidos com os dados de referência deste artigo. Relativamente à microscopia de fluorescência, os dados estão de acordo com a literatura uma vez que o tratamento com Piperlongumina resulta na localização nuclear de FOXO nas células. No caso do *western blot*, a literatura mostra que a diminuição da

fosforilação de FOXO por Piperlongumina é justificada pela inibição da via de sinalização Akt. De forma idêntica, os resultados obtidos com Piperlongumina neste estudo demonstram que a modulação da ativação de FOXO por Piperlongumina é através do Akt. Assim, todos os dados obtidos estão de acordo com a literatura.

Desta forma, o presente estudo é extremamente importante uma vez que reforça os dados já existentes relativamente ao efeito de Piperlongumina na localização e níveis de fosforilação de FOXO numa linha celular cancerígena diferente das utilizadas no único estudo existente. Em acréscimo, este estudo é também importante dado que demonstrou que Piperlongumina tem a capacidade de afetar a transcrição de três genes-alvo de FOXO. Piperlongumina aumentou os níveis transcricionais de p21 e PUMA e diminuiu os níveis de p27 de forma estatisticamente significativa comparativamente ao controlo negativo.

Por fim, *Niu M. et al* (2015) descreve o efeito de Piperlongumina em inibir a exportação nuclear de proteínas. Neste estudo, o tratamento de linhas celulares cancerígenas com Piperlongumina resulta na acumulação de FOXO1, p21 e p53 no núcleo das células devido à inibição de uma exportina, CRM1. É a principal exportina envolvida na exportação nuclear de proteínas pelo que, a sua inibição impede a exportação e subsequente inativação de proteínas supressoras de tumor para o citoplasma [98, 100-102, 104].

No presente trabalho, também foi analisado o possível efeito de Piperlongumina induzir a localização nuclear de FOXO ao interferir com CRM1. No entanto, o tratamento da linha celular U2OS NES com Piperlongumina resulta na localização citoplasmática de NES, tal como no controlo negativo. Logo, Piperlongumina induzem a localização de FOXO no núcleo, mas sem inibir CRM1. Assim, embora os resultados não estejam de acordo com a literatura é importante referir determinadas diferenças entre ambos os estudos, nomeadamente as linhas celulares, a concentração e o tempo de incubação. O presente estudo utilizou linhas celulares U2OS NES-GFP que foram tratadas com Piperlongumina a 13  $\mu$ M durante 6 horas. Por sua vez, *Niu M. et al* (2015) utilizou linhas celulares HeLa transfectadas com NES-GFP que foram tratadas com Piperlongumina a diferentes concentrações (15  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 30  $\mu$ M) e tempos de incubação (2h). [98, 100-102, 104]. O efeito em CRM1 só é observado a partir de 25  $\mu$ M, o que significa que a experiência do presente estudo poderá ser repetida em condições semelhantes a esta de forma a verificar se o resultado obtido é o mesmo. Não obstante, a principal e mais importante diferença entre estes estudos são os membros da família FOX analisados. No presente estudo, a proteína

analisada foi FOXO3A, enquanto no outro estudo foi FOXO1A. Assim, Piperlongumina pode ter a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO1A ao inibir CRM1, porém o mesmo não se aplica a FOXO3a.

De forma idêntica a Piperlongumina, também foi analisado o possível efeito de Harmina induzir a localização nuclear de FOXO ao interferir com CRM1. À semelhança de Piperlongumina, Harmina não mostrou capacidade de inibir CRM1 pelo que este composto induz a localização nuclear de FOXO, mas sem interferir com CRM1. Os dados obtidos relativamente ao efeito de Piperlongumina e Harmina em CRM1 são extremamente importantes e permitem complementar os estudos existentes sobre estes compostos. Por um lado, porque não existem estudos publicados relativamente a esta questão no caso de Harmina. Por outro lado, porque os estudos que existem relativamente ao efeito de Piperlongumina em CRM1 estão associados a FOXO1A e não a FOXO3a.

Assim, Harmina e Piperlongumina apresentam propriedades anticancerígenas, podendo ser úteis para aplicação terapêutica anticancerígena e antienvhecimento.

## VI.2. SCREENING

O nosso laboratório realizou também um *screening* a péptidos (Pep1, Pep2 e Pep3) e a dois tipos de extratos diferentes: de microalgas (Alg1-Alg18) e de Haloarquea (Alg19-Alg32). Como enunciado previamente, tanto as microalgas como as haloarqueas consistem numa fonte de compostos naturais com diferentes propriedades farmacológica, inclusive anticancerígenas.

Neste sentido, estabeleceu-se a hipótese que todos os péptidos e extratos induziam a localização nuclear de FOXO. A metodologia utilizada para monitorizar a localização subcelular de FOXO-GFP das células U2OS FOXO foi a mesma que para Harmina e Piperlongumina: microscopia fluorescente seguida de quantificação.

Relativamente aos extratos de microalgas, inicialmente foi realizada uma quantificação manual que, assim como a observação microscópica, mostrou que apenas Alg5, Alg11 e Alg12 induziam a localização nuclear de FOXO. No entanto, as células não se encontravam em boas condições pelo que os resultados desta quantificação não são fidedignos. Em adição, a experiência foi repetida nas mesmas condições experimentais, porém os dados foram analisados através de

quantificação automática. Esta quantificação revelou que Alg5, Alg11 e Alg12 não induzem a localização nuclear de FOXO dado que a percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo na presença destes extratos é muito inferior à obtida com a quantificação manual.

Tal como referido previamente, ainda que os dados obtidos pela quantificação manual não sejam fidedignos, a quantificação automática dos extratos de microalgas Alg1-Alg18 foi precedida pela repetição do tratamento das células com Alg5, Alg11 e Alg12, mas com concentrações diferentes (0.1 ng/μL; 1 ng/μL; 10 ng/μL; 100 ng/μL e 1000 ng/μL). Os dados obtidos demonstram que não existe uma relação de dose-resposta para nenhum dos extratos de microalgas selecionados através da quantificação manual, à exceção de Alg11 com uma ligeira resposta à concentração de 1000 ng/μL. Isto porque apesar da utilização de diferentes concentrações, o tratamento de Alg5, Alg11 e Alg12 resultou em baixas percentagens de células com FOXO-GFP nuclear, de forma idêntica ao observado anteriormente. Apenas a concentração mais elevada de Alg11 (1000 ng/μL) apresentou uma percentagem maior de células com FOXO-GFP localizado no núcleo, mas não estatisticamente significativa. Como consequência, foi realizado o fracionamento de Alg11(F1-F4) com o objetivo de entender a sua ligeira capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO. F1, F2 e F3 não induzem a localização nuclear de FOXO, mas F4 induz uma percentagem de células com FOXO nuclear semelhante à de F5, a solução *stock*. Assim, a substância ativa responsável pela ligeira indução da localização nuclear de FOXO por Alg11 pode estar presente na fração F4. No que diz respeito aos resultados obtidos com os restantes extratos de microalgas analisados com quantificação automática, Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18 induzem a localização nuclear de FOXO. Alg14 e Alg16 destacam-se com percentagens de células com FOXO no núcleo semelhantes e superiores, respetivamente, ao observado no controlo positivo.

Existem vários estudos realizados em microalgas, extratos de microalgas ou componentes derivados de microalgas que revelam as suas várias propriedades farmacológicas, e muitas são importantes na área da investigação do cancro, nomeadamente atividade antioxidante, anti-proliferativa, anticancerígena, anti-inflamatória e citotóxica [112,113-118]. É o caso de *Nigjeh E. S. et al* (2013) que considera a microalga marinha *Chaetoceros calcitrans* um bom candidato para aplicar em terapias anticancerígenas, mais propriamente no cancro da mama. Isto porque o extrato desta microalga tem propriedades citotóxicas ao inibir a proliferação celular e promover a apoptose em linhas celulares de cancro da mama MCF-7 via modulação de proteínas pró-apoptóticas [116, 173]. *Shah R.M et al* (2014) realizou um *screening* a extratos de 11 estirpes diferentes de microalgas

Dinoflagelados que mostrou que *Amphidinium carterae* tinha propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e que *Ostreopsis ovata* 1 possuía atividade anticancerígena <sup>[116, 174]</sup>. *Samarakoon W. K. et al* (2013) e *Lin P. et al* (2017) correspondem a outros estudos que clarificaram o potencial anticancerígeno de outras espécies de microalgas em linhas celulares cancerígenas de leucemia humana HL-60 e NSCLC, respetivamente <sup>[116, 175, 176]</sup>.

O presente estudo tem extratos de 6 espécies de microalgas diferentes, nomeadamente *Tetrasemis sp.*, *Isochrysis sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Porphyridium sp.* e *Skeletonema costatum*. São vários os estudos publicados relativamente ao potencial anticancerígeno destas espécies de microalgas, com exceção de *Isochrysis sp* para a qual não existe referência. Como exemplo representativo, *Hussein A. H. et al* (2019) mostrou os efeitos citotóxicos de *Tetrasemis sp* em diversas linhas celulares cancerígenas como MCF-7 e *Sanjeewa A. et al* (2016) mostrou que diversas frações de extratos da microalga *Tetrasemis sp.* têm propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas em linhas celulares de leucemia humana HL-60 <sup>[177, 178]</sup>. *Samarakoon W. et al* (2014) é apenas um dos estudos relativos às propriedades anticancerígenas de *Phaeodactylum tricorutum*. Neste estudo, o efeito anticancerígeno da microalga é explicado pela indução da apoptose via ativação de proteínas pró-apoptose nas diversas linhas celulares <sup>[179]</sup>. Também *Tannin-Spitz T. et al* (2005) e *Bergé P. J. et al* (1997) descreveram as propriedades antioxidantes e anti-proliferativas de componentes das microalgas *Porphyridium sp.* e *Skeletonema costatum*, respetivamente <sup>[180, 181]</sup>.

No entanto, os estudos que associam as propriedades farmacológicas de microalgas a FOXO e/ou outras proteínas da via de sinalização PI3K/ Akt são poucos e nenhum é referente às espécies de microalgas estudadas nesse trabalho. A título exemplificativo, existe um estudo que associa um carotenoide produzido pela microalga *Haematococcus pluvialis* à longevidade de *C. elegans*. Isto porque este carotenoide- astaxantina- ativa FOXO3a <sup>[182]</sup>. Existe, ainda, outro estudo relativamente à microalga *Chlorella sorokiniana* que possui propriedades antioxidantes em linhas celulares de colon e in vivo no nematódeo *C. elegans* ao produzir ERO e ativar a via de sinalização DAF-16/ FOXO <sup>[183]</sup>. Como consequência, os dados da literatura reforçam a importância do presente estudo uma vez que analisou o possível efeito destas 6 espécies de microalgas na localização subcelular de FOXO. Em acréscimo, sendo que existem microalgas que induziram a localização nuclear de FOXO, estas microalgas poderão ter futura aplicação em terapias anticancerígenas.

Para além dos extratos de microalgas, existem compostos isolados destas mesmas microalgas que possuem propriedades anticancerígenas e elevado potencial para estratégias terapêuticas. É o caso de polissacarídeos (*fluicodans*), pigmentos como a ficocianina, a clorofila, feotina. Para além disso e tal como explicado previamente, os carotenoides como a fucoxantina também têm propriedades anticancerígenas. <sup>[116-118]</sup>. *Kumar. S. et al* (2013), *Takahashi. K et al* (2015) e *Satomi. Y et al* (2017) descrevem os seus efeitos citotóxicos em diversas linhas celulares cancerígenas e a sua capacidade de inibir a carcinogénese <sup>[170-172]</sup>.

O CCMAR forneceu este carotenoide ao laboratório pelo que o efeito de fucoxantina na localização subcelular de FOXO foi analisado com vista a perceber se o efeito das microalgas na localização nuclear de FOXO se deve a esta substância. A percentagem de células tratadas com fucoxantina que apresentam FOXO-GFP no núcleo é semelhante à situação do controlo negativo. Esta situação pode ter duas interpretações: a fucoxantina pode não ter qualquer efeito na localização de FOXO ou apenas tem efeito quando em sinergia com outra substância. Assim, ainda que a fucoxantina esteja descrita como um carotenoide anticancerígeno, este efeito não é verificado em nenhuma das espécies de microalgas utilizadas neste estudo. O que significa que a fucoxantina não é a substância responsável pelo efeito observado das microalgas utilizadas neste estudo na localização de FOXO no núcleo.

Por fim, de forma idêntica a Harmina e Piperlongumina, foram analisados outros mecanismos que justifiquem o efeito dos extratos na localização subcelular de FOXO. Assim e, novamente de forma idêntica ao estipulado para Harmina e Piperlongumina, foi analisado o possível efeito dos extratos induzirem a localização nuclear de FOXO ao interferir com CRM1. Nenhum mostrou capacidade de inibir CRM1 pelo que estes extratos induzem a localização nuclear de FOXO, mas sem interferir com CRM1. Os dados obtidos relativamente ao efeito dos extratos em CRM1 são extremamente úteis porque não existem estudos publicados relativamente a esta questão.

No âmbito da quantificação automática e observação microscópica das células tratadas com os extratos de Haloarquea (Alg19-Alg32), todos se revelaram resultados negativos. Isto é nenhum dos extratos (de Haloarqueas, proteicos, pigmentares e celulares) induz a localização nuclear de FOXO.

À semelhança das algas, estes microrganismos também apresentam carotenoides como a bacterioruberina, os quais estão descritos pelo seu potencial anticancerígeno. No entanto, existem poucos estudos referentes a carotenoides de organismos extremófilos comparativamente a organismos não extremófilos [121, 123, 124]. Os diversos estudos relativamente aos carotenoides isolados de haloarqueas revelam propriedades anticancerígenas, antioxidantes e anti-proliferativas em diversas linhas celulares cancerígenas, como é o caso de linhas celulares de cancro do fígado e linhas celulares de cancro da próstata [121, 124]. *Haloterrigena turkmenica*, *Halogeometricum rufum*, *Halogeometricum limi*, *Haladaptatus litoreus*, *Haloplanus vesicus* e *Halopelagius inordinatus* são algumas das espécies das quais foram identificados carotenoides com propriedades antioxidantes e anticancerígenas [121, 125].

No caso específico deste trabalho, as espécies de haloarqueas utilizadas foram *Haloarcula* e *Halobacterium*, as quais apresentam propriedades antioxidantes. A título exemplificativo, *Yatsunami R. et al* (2014) e *Abbes M. et al* (2013) mostraram que *Haloarcula japónica* e *Halobacterium halobium*, respetivamente, são potenciais fontes de metabolitos com propriedades antioxidantes [184, 185]. No caso de *Haloarcula japónica*, o estudo demonstrou que o carotenoide extraído com esta propriedade é bacterioruberina [184]. No caso de *Halobacterium halobium*, os carotenoides extraídos apresentaram também propriedades anti-proliferativas em linhas celulares de cancro do fígado [185]. Em acréscimo, existem também estudos que relacionam diferentes espécies de *Halobacterium* com propriedades anticancerígenas em linhas celulares de cancro do fígado e da próstata [178, 186].

Ainda assim, os estudos existentes relativamente a estas espécies são poucos e não existem dados que associem estes microrganismos a FOXO. Neste sentido, o presente estudo é extremamente inovador e importante porque permitiu analisar se duas espécies diferentes de Haloarqua tinham capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO.

Por último, o tratamento das células com os três péptidos (Pep1, Pep2 e Pep3) fornecidos no âmbito do projeto AlgaRED+ mostrou que Pep1 e Pep2 podem ter a capacidade de induzir localização nuclear de FOXO uma vez que apresenta um grande número de células com FOXO-GFP nuclear, mas baixo quando comparado com o controlo positivo. No entanto, Pep3 resulta em poucas células com FOXO-GFP no núcleo, pelo que não induz a localização nuclear de FOXO.

Pep1 consiste num péptido sintético, porém Pep2 refere-se a *Dicentracin* e Pep3 a *Caerina*. O *Dicentracin* deste estudo é da espécie *Dicentrarchus labrax*, enquanto que *Caerina* deste estudo é da espécie *Litoria gilleni*. *Dicentrarchus labrax* consiste numa espécie importante de peixe de aquacultura do Mediterrâneo e do sul da Europa, vulgarmente designado por robalo. Este peixe tem sido utilizado em diversos estudos uma vez contém diversos péptidos com atividade antimicrobiana, é o caso de *Dicentracin* <sup>[187,188]</sup>. Por sua vez, *Litoria gilleni* é uma espécie de anfíbio, mais propriamente, um sapo encontrado na Austrália que, à semelhança de *Dicentrarchus labrax*, contém péptidos como *Caerina* que possuem atividade antimicrobiana <sup>[189,190]</sup>. Os péptidos destas duas espécies são o motivo pelo qual são utilizadas em estudos. Não existem estudos que demonstrem que estes péptidos possuam atividade anticancerígena. Neste sentido, assim como referido anteriormente, os organismos marinhos são uma fonte de compostos com diversas propriedades farmacológicas, inclusive anticancerígenas. Adicionalmente, foram fornecidos estes três péptidos ao laboratório, pelo que a análise do seu efeito na localização subcelular de FOXO permite avaliar se possuem propriedades anticancerígenas. É, portanto, um estudo importante e inovador para a investigação da área do cancro.

### VI.3 CANDIDATE APPROACH

Por fim, a *candidate approach* permitiu analisar se diferentes tipos de fármacos com efeito já conhecido, tinham capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO.

No caso dos inibidores de mTOR, a quantificação de células U2OS FOXO revelou que Torin 1 induz a localização nuclear de FOXO-GFP em todas as concentrações utilizadas. Relativamente a Rapamicina e CID613034, a percentagem de células com FOXO no núcleo após o tratamento com estes dois inibidores de mTOR não é significativa o suficiente para garantir o seu efeito na localização nuclear de FOXO.

Os estudos efetuados mostram que a Rapamicina apresenta atividade anticancerígena através de diversos mecanismos, nomeadamente inibição da progressão do ciclo celular, do crescimento celular e da proliferação de linhas celulares cancerígenas (cancro do pulmão, glioblastoma, melanoma, entre outras). No entanto, não existem estudos relativamente ao possível ou não efeito da Rapamicina na localização de FOXO <sup>[128, 135, 136]</sup>. No caso de Torin 1, é descrito também como um inibidor de mTOR porque inibe a fosforilação de Akt na S473 mediada por mTORC2 e, conseqüentemente, o crescimento, sobrevivência e proliferação de diversas linhas

celulares cancerígenas <sup>[132, 137]</sup>. No entanto, não existe muita informação disponível no que diz respeito a FOXO. Há estudos com linhas celulares de leucemia que apresentam menores níveis de expressão de genes pro-apoptóticos e menor fosforilação de FOXO1 após o tratamento com Torin 1. Ainda assim, não existe informação no estudo sobre a localização de FOXO. Existem também estudos em que Torin 1 aumentou FOXO1 nuclear em linhas celulares de cancro do fígado. Neste estudo as células cancerígenas também foram tratadas com Rapamicina, a qual não teve efeitos na localização de FOXO1 <sup>[132, 136]</sup>.

Por sua vez, CID613034 foi descrito recentemente num único estudo como inibidor de mTORC2 em linhas celulares de glioblastoma. Existem alguns estudos com diversos fármacos análogos de CID613034, dos quais se destaca o JR-AB2-011 que também inibe mTORC2, mas de forma mais potente e sem efeitos de toxicidade significantes <sup>[138]</sup>. No entanto, nenhum deles tem informação relativamente a FOXO. Como referido anteriormente, mTORC2 fosforila a Akt na S473 que, por sua vez, fosforila mTORC1. Em acréscimo, a via PI3K/ Akt, da qual FOXO também integra, é a via mais mutada nos cancros humanos e a Akt é uma das proteínas responsáveis pela inativação de FOXO. Segundo diversos estudos efetuados, a inativação do domínio Rictor resulta na ausência de fosforilação da Akt em diversas espécies e em células humanas. Assim, as proteínas *up* e *downstream* de Akt como mTORC2 e mTORC1 são potenciais alvos terapêuticos no cancro, sendo a sua inibição uma estratégia para garantir a funcionalidade de FOXO e, portanto, anticancerígena <sup>[129, 130, 133, 144]</sup>. Como consequência, este estudo foi importante para perceber se efetivamente ao inibir mTORC2 e/ou mTORC1, a localização de FOXO era afetada. O estudo revelou, assim, pela primeira vez que Torin 1 é um inibidor de mTOR que tem a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO.

Por fim, o tratamento de células U2OS NES com Torin 1 demonstrou novamente que este composto induz a localização nuclear de FOXO, porém o mecanismo pelo qual o fazem não é através da inibição de CRM1, a exportina responsável pela exportação de FOXO do núcleo para o citoplasma.

Por sua vez, o trametinib não induziu a localização nuclear de FOXO em nenhuma das concentrações e tempos de incubação utilizados. A percentagem de células com FOXO no núcleo é inclusive menor que a obtida com o controlo negativo. Assim, este fármaco tem um efeito negativo na localização de FOXO no núcleo.

O trametinib é um inibidor não competitivo e altamente seletivo das proteínas MEK1 e MEK2. É utilizado no tratamento de melanoma metastático, de Cancro do Pulmão de Células Não-Pequenas (CPNPC) e no cancro da tiroide <sup>[140-144]</sup>. Em 2018 *Lin L. et al*, foi publicado um estudo onde diversos inibidores de MEK, incluindo o trametinib demonstraram ter capacidade de induzir a apoptose em células de cancro colorretal via expressão do PUMA dependente de FOXO. PUMA promove a apoptose e a sua atividade pode ser induzida através do p53 ou por outras proteínas como FOXO3a <sup>[149]</sup>. Isto significa que, um dos mecanismos pelo qual o trametinib induz a apoptose de células cancerígenas está associado com a atividade de FOXO3a <sup>[141, 143, 149]</sup>. Ainda assim, este estudo revela que o fármaco não tem a capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO nesta linha celular.

## VII. CONCLUSÃO

FOXOs são fatores de transcrição que regulam a transcrição de genes alvo envolvidos em diversos processos biológicos fundamentais na proteção contra o cancro e contra o envelhecimento. No entanto, a regulação dos genes alvo só ocorre quando FOXO está localizado no núcleo das células, dado que quando se encontra no citoplasma, está inativo. Estas proteínas fazem parte da via de sinalização PI3K/Akt que está envolvida na proliferação e crescimento das células e, quando ativa, resulta no sequestro de FOXO no citoplasma. A via PI3K/ Akt é a via mais mutada em cancros e, de facto, FOXO encontra-se no citoplasma e inativo em diversos tipos de cancros. Neste sentido, a translocação nuclear de FOXO permite reativar a sua atividade biológica supressora de tumor e consiste numa abordagem terapêutica anticancerígena.

O presente trabalho consistiu na descoberta de compostos com capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO para aplicação futura numa abordagem terapêutica anticancerígena e antienvhecimento através de três abordagens diferentes (bioinformática, *screening* e *candidate approach*)

Em primeiro lugar, no que diz respeito à abordagem bioinformática, foi realizada microscopia de fluorescência e quantificação de FOXO-GFP no núcleo, RT-qPCR e *western blot*. A monitorização da localização subcelular de FOXO-GFP das células U2OS FOXO tratadas com estes compostos por microscopia fluorescente e revelou que FOXO se encontrava localizado no núcleo da maioria das células. A quantificação demonstrou que tanto Harmina como Piperlongumina têm capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO uma vez que apresentavam uma maior e significativa percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo comparativamente ao controlo negativo. Em acréscimo, a quantificação permitiu observar que o efeito de Harmina na localização nuclear de FOXO é maior à concentração de 16  $\mu$ M durante 1 hora de incubação. No que diz respeito a Piperlongumina, o efeito das várias concentrações do composto na localização de FOXO foi variável consoante o tempo de incubação. No entanto, o efeito mais notável foi Piperlongumina a 13 e 50  $\mu$ M, sendo que esta última corresponde à única concentração à qual se observa efeito em todas as horas de tratamento das células. A realização de RT-qPCR a células U2OS PARENTAL tratadas com estes compostos naturais permitiu observar que tanto Harmina como Piperlongumina aumentaram os níveis transcricionais de dois genes alvo de FOXO, nomeadamente, o p21 e o PUMA. Em acréscimo, o aumento é estatisticamente significativo comparativamente ao controlo negativo. Harmina também aumentou de forma

estatisticamente significativa a transcrição de PUMA, outro gene alvo de FOXO, porém Piperlongumina teve um efeito contrário. Assim, estes resultados estão de acordo com os dados da literatura e demonstram que Harmina e Piperlongumina, não só induzem a localização nuclear de FOXO, como também afetam a transcrição de genes alvo de FOXO. O *western blot* permitiu concluir que o tratamento das células U2OS FOXO com Harmina e com Piperlongumina resultou na diminuição dos níveis de fosforilação de FOXO (S). Esta diminuição aplica-se a todas as horas de tratamento com Harmina e a 12h ou mais horas de incubação, no caso do tratamento com Piperlongumina. No entanto, também se observa a diminuição dos níveis de FOXO total, pelo que a diminuição da fosforilação pode ser apenas uma consequência disto. No que diz respeito ao Akt, há claras diferenças entre o efeito destes compostos nas células. Harmina não tem qualquer efeito nos níveis proteicos ou de fosforilação de Akt a nenhum tempo de incubação pelo que provavelmente este composto não modula a atividade transcricional de FOXO através da sinalização Akt. Por outro lado, Piperlongumina diminui os níveis de fosforilação de Akt a partir das 12h de tratamento, sem alteração nos níveis de Akt total pelo que a modulação da ativação de FOXO por Piperlongumina pode ser através do Akt.

No que diz respeito ao *screening*, foi aplicada a mesma metodologia para monitorização da localização subcelular de FOXO-GFP das células U2OS FOXO, a microscopia fluorescente. Inicialmente foi realizada quantificação manual e posteriormente automática e os resultados obtidos não foram coincidentes. No entanto, a quantificação manual consistiu na fase inicial do presente estudo e as células não se encontravam em boas condições pelo que os resultados desta quantificação não são fidedignos. Por um lado, a quantificação manual inicialmente executada, assim como a observação microscópica das células tratadas com os extratos de microalgas Alg1-Alg18, levaram à conclusão de que Alg5, Alg11 e Alg12 induziam a localização nuclear de FOXO. A quantificação automática revelou que a percentagem de células com FOXO-GFP no núcleo na presença destes extratos é muito inferior à obtida com a quantificação manual e que não induzem a localização nuclear de FOXO. Em acréscimo, a quantificação automática e a observação microscópica dos restantes extratos de microalgas (Alg1-Alg18), extratos de Haloarquea (Alg19-ALg22 e Alg26-Alg29) e extratos proteicos (Alg23 e Alg30), extratos pigmentares (Alg24 e Alg31) e extratos celulares (Alg25 e Alg32) deste mesmo microrganismo, e péptidos (Pep1, Pep2, Pep3) permitiu concluir que Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18 induzem a localização nuclear de FOXO, com destaque para Alg14 e Alg16. Na presença destes extratos, a percentagem de células com

FOXO no núcleo é semelhante e superior, respetivamente, ao observado no controlo positivo. A observação ao microscópica das células tratadas com estes extratos está de acordo com a quantificação uma vez que se observa FOXO-GFP localizado no núcleo de grande parte das células.

Por fim, a *candidate approach* consistiu na análise microscópica e quantificação de diferentes tipos de fármacos com efeito já conhecido: três inibidores de mTOR- Rapamicina, Torin 1 e CID613034- e um inibidor de MEK- trametinib. No caso dos inibidores de TOR, a quantificação de células U2OS FOXO revelou a capacidade de Torin 1 induzir a localização nuclear de FOXO-GFP no núcleo em todas as concentrações utilizadas, ainda que o efeito mais significativo tenha sido com Torin 1 a 10 nM. Por outro lado, o número de células com FOXO-GFP no núcleo após o tratamento com Rapamicina e CID613034 é superior comparativamente ao observado com o controlo negativo, mas a diferença é ligeira. Esta observação aplica-se às diferentes concentrações destes fármacos, ainda que a Rapamicina a 0.1 nM e CID613034 a 100 nM o número de células com FOXO-GFP no núcleo seja ligeiramente superior às concentrações restantes. Assim, a percentagem de células com FOXO no núcleo após o tratamento com estes dois inibidores de mTOR não é significativa o suficiente para garantir o seu efeito na localização nuclear de FOXO. As imagens recolhidas por microscopia fluorescente demonstram que, enquanto as células tratadas com Rapamicina e CID613034 apresentam maioritariamente FOXO-GFP distribuído uniformemente no núcleo e no citoplasma, as células tratadas com Torin 1 contêm FOXO-GFP no núcleo. Relativamente ao tratamento das células com trametinib, não se verificou efeito positivo na localização nuclear de FOXO em nenhuma das concentrações e tempos de incubação utilizados. A percentagem de células com FOXO no núcleo é inclusive menor que a obtida com o DMSO, à exceção de 1h e 12h de trametinib a 10 nM (Figura V.48E). Assim, este fármaco tem um efeito negativo na localização de FOXO no núcleo. A microscopia fluorescente permitiu observar a distribuição uniforme de FOXO no núcleo e no citoplasma das células após o tratamento com este fármaco pelo que não induz a localização nuclear desta proteína.

Por fim, o tratamento de células U2OS NES com os compostos com efeito positivo na localização nuclear de FOXO, nomeadamente, Harmina, Piperlongumina, Alg3, Alg7, Alg10 e Alg14-Alg18 e Torin 1, demonstrou que estes compostos induzem a localização nuclear de FOXO, porém o mecanismo pelo qual o fazem não é através da inibição de CRM1, a exportina responsável

pela exportação de FOXO do núcleo para o citoplasma. Isto porque as imagens de microscopia fluorescente de todos os compostos representavam células com NES distribuído no citoplasma.

Em suma, o presente estudo permitiu a descoberta de 13 compostos diferentes com capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO através de três abordagens distintas. Esta descoberta é extremamente importante e inovadora uma vez que foram obtidos resultados novos e, simultaneamente, foram confirmados resultados já publicados, mas em diferentes condições experimentais. Os dados obtidos com este projeto mostram que moduladores de FOXO são particularmente relevantes na reativação de FOXO em cancros humanos e para retardar os processos relacionados com o envelhecimento. No entanto, o mecanismo responsável pelo efeito observado não foi estabelecido pelo que é necessário garantir o aprofundamento dos resultados obtidos.

## VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como referido anteriormente, este estudo permitiu a descoberta de 13 compostos diferentes com capacidade de induzir a localização nuclear de FOXO através de três abordagens distintas. No entanto, o mecanismo responsável pelo efeito observado não foi estabelecido pelo que é necessário garantir o aprofundamento dos resultados obtidos. Neste sentido, existe um conjunto de diversas experiências que devem ser realizadas como seguimento do presente estudo de forma a permitir o seu aprofundamento e maior grau de detalhe.

Antes de mais, deveria ser feita a análise do efeito de Harmina e Piperlongumina na expressão de outros genes alvo de FOXO através de RT-qPCR. Isto porque os genes analisados estão todos envolvidos na paragem do ciclo celular ou na apoptose. Dado que FOXO regula a transcrição de genes envolvidos noutros processos biológicos (Figura 4) seria importante analisar o efeito noutras vias de sinalização. Para além disso, também se deveria analisar se Harmina e Piperlongumina têm efeito em FOXO, no que diz respeito aos níveis do mRNA, também com RT-qPCR.

Relativamente aos extratos de microalgas com capacidade de induzir a localização de FOXO nuclear, deveria se proceder à repetição da análise, mas com uma gama de concentrações e diferentes tempos de incubação, de forma a estabelecer uma curva dose-resposta. Em acréscimo, à semelhança do que foi feito para Alg11, os extratos de microalgas considerados resultados positivos deveriam ser fracionados, de forma a analisar o componente responsável pelo efeito observado na localização de FOXO. Por outro lado, uma vez que a fucoxantina não teve efeito na localização nuclear de FOXO, deverão ser testados outros componentes característicos de microalgas que, segundo a literatura, contêm propriedades anticancerígenas e citotóxicas. A fucoxantina é um carotenoide que são compostos com propriedades anticancerígenas presentes nas microalgas. Assim, poder-se-á testar outros carotenoides. Em acréscimo, dever-se-á realizar *western blot* e RT-qPCR aos extratos de microalgas com efeito positivo de forma a avaliar influenciam FOXO a nível proteico e a nível de transcrição. Deverá também ser analisado o efeito dos extratos de microalgas nos genes alvo de FOXO, tal como efetuado para Harmina e Piperlongumina. Estes procedimentos também se aplicam a Torin 1 uma vez que induziu a localização nuclear de FOXO.

No âmbito dos compostos que induziram a localização nuclear de FOXO, seria importante proceder a testes de viabilidade e toxicidade celular.

Para terminar, uma vez que o mecanismo pelo qual os compostos induziram a localização nuclear de FOXO não foi estabelecido, dever-se-iam realizar outras abordagens. A primeira experiência que deve ser efetuada é a análise da localização de NLS em células U2OS-NLS após incubação com os compostos que foram considerados resultados positivos. Isto porque, dado que pode ser a explicação para não interferirem com CRM1.

## IX. REFERÊNCIAS

- [1]- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- [2]- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Forman, D. and Bray, F. (201). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, 359-386.
- [3]-Turner P., McLennan A., Bates A. & White M., *Instant Notes in Molecular Biology*, 2<sup>nd</sup> Ed, Bios Scientific Publishers, Oxford, 2000.
- [4]- Alberts, B.; Johnson, A. & Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*. 5<sup>th</sup> Ed., Artmed Editora, 2010.
- [5]-Sheeler P., Bianchi D., *Cell and Molecular Biology*, 3<sup>rd</sup> Ed, Wiley, India, 2009.
- [6]-Weinberg R., *The Biology of Cancer*, 2<sup>nd</sup> Ed, W. W. Norton & Company, Nova Iorque, 2013.
- [7]- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799.
- [8]- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- [9]- Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I. P., & Skaltsounis, A. L. (2013). Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports*, 30(11), 1412–1437.
- [10]- Pallàs, M., Verdaguer, E., Tajés, M., Gutierrez-Cuesta, J., & Camins, A. (2008). Modulation of sirtuins: New targets for antiageing. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3(1), 61–69.
- [11]- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194.
- [12]- Rebelo-Marques, A., Lages, A. D. S., Andrade, R., Ribeiro, C. F., Mota-Pinto, A., Carrilho, F., & Espregueira-Mendes, J. (2018). Aging hallmarks: The benefits of physical exercise. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAY), 1–15.
- [13]- Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). Cancer and ageing: Convergent and divergent mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 715–722.
- [14]- Kobet, R. A., Pan, X., Zhang, B., Pak, S. C., Asch, A. S., & Lee, M. H. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification. *Biomolecules and Therapeutics*, 22(5), 371–383.
- [15]- Kenyon, C. (2011). The first long-lived mutants: Discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1561), 9–16.

- [16]- Uno, M., & Nishida, E. (2016). Lifespan-regulating genes in *c. Elegans*. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 2(1).
- [17]- Klass, M. R. (1983). A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mechanisms of Ageing and Development*, 22(3–4), 279–286.
- [18]- Tissenbaum, H. A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate Reproduction and Development*, 59(Tissenbaum 2012), 59–63.
- [19]- Apfeld, J., & Kenyon, C. (1999). Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 402(6763), 804–809.
- [20]- Sanese, P., Forte, G., Disciglio, V., Grossi, V., & Simone, C. (2019). FOXO3 on the Road to Longevity: Lessons From SNPs and Chromatin Hubs. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 737–745.
- [21]- Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H., & Komuro, I. (2004). Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO Journal*, 23(1), 212–220.
- [22]- Willcox, B. J., Donlon, T. A., He, Q., Chen, R., Grove, J. S., Yano, K., ... Curb, J. D. (2008). FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 13987–13992.
- [23]- Chung, W. H., Dao, R. L., Chen, L. K., & Hung, S. I. (2010). The role of genetic variants in human longevity. *Ageing Research Reviews*, 9.
- [24]- Li, Y., Wang, W. J., Cao, H., Lu, J., Wu, C., Hu, F. Y., ... Tian, X. L. (2009). Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Human Molecular Genetics*, 18(24), 4897–4904.
- [25]- O'Neill, B. T., Bhardwaj, G., Penniman, C. M., Krumpoch, M. T., Suarez Beltran, P. A., Klaus, K., ... Ronald Kahn, C. (2019). FOXO transcription Factors are critical regulators of diabetes-related muscle atrophy. *Diabetes*, 68(3), 556–570.
- [26]- Obsil, T., & Obsilova, V. (2008). Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription Factors. *Oncogene*, 27(16), 2263–2275.
- [27]- Cautain, B., Castillo, F., Musso, L., Ferreira, B. I., De Pedro, N., Quesada, L. R., ... Link, W. (2016). Discovery of a novel, isothiazolonaphthoquinone-based small molecule activator of FOXO nuclear-cytoplasmic shuttling. *PLoS ONE*, 11(12), 1–17.
- [28]- Hill, R., Cautain, B., De Pedro, N., & Link, W. (2014). Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy. *Oncotarget*, 5(1), 11–28.
- [29]- Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., ... Wang, J. (2018). Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular Cancer*, 17(1), 1–12.

- [30]- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., & Rishi, A. K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(11), 1978–1986.
- [31]- Kumar, N., Crocker, T., & Smith, T. (2012). Prostate Cancer Chemoprevention Targeting High Risk Populations: Model for Trial Design and Outcome Measures. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 01(S3).
- [32]- Bradshak A. R., & Dennis A. E., *Handbook of Cell Signaling*, 2<sup>nd</sup> Ed, Academic Press, 2009.
- [33]- Thomas, M. C., & Chiang, C. M. (2006). The general transcription machinery and general coFators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3), 105–178.
- [34]- Psenakova, K., Kohoutova, K., Obsilova, V., Ausserlechner, M., Veverka, V., & Obsil, T. (2019). Forkhead Domains of FOXO Transcription Fators Differ in both Overall Conformation and Dynamics. *Cells*, 8(9), 966.
- [35]- Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F. M., & Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: Mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochemical Journal*, 380(2), 297–309.
- [36]- Cautain, B., De Pedro, N., Garzón, V. M., De Escalona, M. M., González Menéndez, V., Tormo, J. R., ... Link, W. (2014). High-content screening of natural products reveals novel nuclear export inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(1), 57–65.
- [37]- Henriques, V., Machado, S., Link, W., & Ferreira, B. I. (2019). Monitoring the transcriptional activity of FOXO transcription Fators by analyzing their target genes. *Methods in Molecular Biology*, 1890, 103–113.
- [38]- Ashley E. Webb<sup>1</sup> and Anne Brunet<sup>1, 2</sup>. (2015). FOXO transcription Fators: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*, 39(4), 159–169.
- [39]- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter P., *Essential Cell Biology*, 4<sup>th</sup> Ed, New York, Garland Science (Taylor & Francis Group), 2014.
- [40]- Azevedo C., & Sunkel. E. C., *Biologia Celular e Molecular*, 5<sup>a</sup> Ed, Lisboa, Edições Lidel, 2012
- [41]- Schachter, T. N., Shen, T., Liu, Y., & Schneider, M. F. (2012). Kinetics of nuclear-cytoplasmic translocation of Foxo1 and Foxo3A in adult skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 303(9).
- [42]- La Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., & Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17(6), 527–536.
- [43]- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., & Brunak, S. (2003). NESbase version 1.0: A database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 393–396.
- [44]- Wang, Y., Zhou, Y., & Graves, D. T. (2014). FOXO transcription Fators: Their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*.

- [45]- Yadav, R. K., Chauhan, A. S., Zhuang, L., & Gan, B. (2018). FoxO transcription Factors in cancer metabolism. *Seminars in Cancer Biology*, 50(October 2017), 65–76.
- [46]- Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P. J. A., Valero, V., Guzman, M., Baselga, J. (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Research*, 68(19), 8022–8030.
- [47]- Wilkin D., Brainard J. *CK-12 Conceptos Biología*, 2015.
- [48]- David C. Bouck, PhD, Peter Shu, BS, Jimmy Cui, BS, Anang Shelat, PhD, and T., & Chen, P. (2011). A High Content Screen Identifies Inhibitors of Nuclear Export of Forkhead Transcription Factors. *J Biomol Screen*, 16(4), 1–18.
- [49]- Kim, J. H., Lee, J. O., Kim, N., Lee, H. J., Lee, Y. W., Kim, H. I., ... Kim, H. S. (2015). Paclitaxel suppresses the viability of breast tumor MCF7 cells through the regulation of EF1 $\alpha$  and FOXO3a by AMPK signaling. *International Journal of Oncology*, 47(5), 1874–1880.
- [50]- Sunter, A., Fernández De Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J. J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C. A., ... Lam, E. W. F. (2003). FoxO3a Transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49795–49805.
- [51]- Mandal, M., Kim, S., Younes, M. N., Jasser, S. A., El-Naggar, A. K., Mills, G. B., & Myers, J. N. (2005). The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *British Journal of Cancer*, 92(10), 1899–1905.
- [52]- Nho, R. S. (2014). FoxO3a and disease progression. *World Journal of Biological Chemistry*, 5(3), 346.
- [53]- Zanella, F., Renner, O., García, B., Callejas, S., Dopazo, A., Peregrina, S., ... Link, W. (2010). Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene*, 29(20), 2973–2982.
- [54]- Aodah, A., Pavlik, A., Karlage, K., & Myrdal, P. B. (2016). Preformulation studies on piperlongumine. *PLoS ONE*, 11(3), 1–16.
- [55]- Boeira, J. M., Viana, A. F., Picada, J. N., & Henriques, J. A. P. (2002). Genotoxic and recombinogenic activities of the two  $\beta$ -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 500(1–2), 39–48.
- [56]- Hegedus, Z., Czibula, A., & Kiss-Toth, E. (2007). Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cellular Signalling*, 19(2), 238–250.
- [57]- Rispal, D., Eltschinger, S., Stahl, M., Vaga, S., Bodenmiller, B., Abraham, Y., ... Loewith, R. (2015). Target of rapamycin complex 2 regulates actin polarization and endocytosis via multiple pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14963–14978.

- [58]- Keeshan, K., He, Y., Wouters, B. J., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., ... Pear, W. S. (2006). Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP $\alpha$  and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, 10(5), 401–411.
- [59]- Hegedus, Z., Czibula, A., & Kiss-Toth, E. (2006). Tribbles: Novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14), 1632–1641.
- [60]- Yokoyama, T., & Nakamura, T. (2011). Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Science*, 102(6), 1115–1122.
- [61]- Kannan, N., & Taylor, S. S. (2008). Rethinking Pseudokinases. *Cell*, 133(2), 204–205.
- [62]- Johnston, J., & Kiss-Toth, E. (2017). TRIB1 (tribbles pseudokinase 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 1(3).
- [63]- Mammalian Tribbles Homologs at the Crossroads of Endoplasmic Reticulum Stress and Mammalian Target of Rapamycin Pathways. *Scientifica*, 2013, 1–17.
- [64]- Du, K., Herzig, S., & Kulkarni, R. N. (2003). TRB3 : A tribbles Homolog That Inhibits Akt / PKB Ativation by. *Science*, 300(June), 1574–1577.
- [65]- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Pérez Gómez, E., Dávila, D., Zúñiga-García, P., Velasco, G. (2015). Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 131–144.
- [66]- Grandinetti, K. B., Stevens, T. A., Ha, S., Salamone, R. J., Walker, J. R., Zhang, J., ... Reddy, V. A. (2011). Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBP $\alpha$ . *Oncogene*, 30(30), 3328–3335.
- [67]- Endre Kiss-Toth. (2011). Tribbles: 'Puzzling 'regulators of cell signaling. *Biochemical Society Transactions*, 1–4.
- [68]- Dobens, L. L., & Bouyain, S. (2012). Developmental roles of tribbles protein family members. *Developmental Dynamics*, 241(8), 1239–1248.
- [69]- Keeshan, K., Shestova, O., Ussin, L. S., & Pear, W. S. (2008). Tribbles homolog 2 (Trib2) and HoxA9 cooperate to accelerate acute myelogenous leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 40(1), 119–121.
- [70]- Eyers, P. A., Keeshan, K., & Kannan, N. (2017). Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease. *Trends in Cell Biology*, 27(4), 284–298.
- [71]- Yokoyama, T., Kanno, Y., Yamazaki, Y., Takahara, T., Miyata, S., & Nakamura, T. (2010). Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*, 116(15), 2768–2775.
- [72]- Hill, R., Madureira, P. A., Ferreira, B., Baptista, I., Machado, S., Colaço, L., ... Link, W. (2017). TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by ativating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nature Communications*, 8, 1–9.

- [73]- Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., ... Golub, T. R. (2006). The connectivity map: Using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, 313(5795), 1929–1935.
- [74]- Lamb, J. (2007). The Connectivity Map: A new tool for biomedical research. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 54–60.
- [75]- Waki, H., Park, K. W., Mitro, N., Pei, L., Damoiseaux, R., Wilpitz, D. C., Tontonoz, P. (2007). The Small Molecule Harmine Is an Antidiabetic Cell-Type-Specific Regulator of PPAR $\gamma$  Expression. *Cell Metabolism*, 5(5), 357–370.
- [76]- Moloudizargari, M., Mikaili, P., Aghajanshakeri, S., Asghari, M., & Shayegh, J. (2013). Pharmacological and Therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 199–212.
- [77]- Patel, K., Gadewar, M., Tripathi, R., Prasad, S. K., & Patel, D. K. (2012). A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid “ Harmine.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 660–664.
- [78]- Jahaniani, F., Ebrahimi, S. A., Rahbar-Roshandel, N., & Mahmoudian, M. (2005). Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry*, 66(13), 1581–1592.
- [79]- Kim, H., Sablin, S. O., & Ramsay, R. R. (1997). Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch.Biochem.Biophys.*, 337(1), 137–142.
- [80]- Yun Li<sup>1</sup>, Rita Sattler<sup>1, 2</sup>, Eun Ju Yang<sup>1</sup>, Alice Nunes<sup>1</sup>, Yoko Ayukawa<sup>1</sup>, Sadia Akhtar<sup>1</sup>, G., & Ji<sup>1</sup>, Ping-Wu Zhang<sup>1</sup>, and Jeffrey D. Rothstein<sup>1, 2</sup>. (2011). Harmine, A Natural Beta-Carboline Alkaloid, Upregulates Astroglial Glutamate Transporter Expression. *Neuropharmacology.*, 60 (7-8)(1), 1–17.
- [81]- Husbands, S. M., Glennon, R. A., Gorgerat, S., Gough, R., Tyacke, R., Crosby, J., ... Hudson, A. L. (2001). B-Carboline Binding To Imidazoline Recetors. *Drug and Alcohol Dependence*, 64(2), 203–208.
- [82]- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M., Zemzami, M., Atif, N., ... Lyoussi, B. (2000). In vitro cell-toxicity of Peganum harmala alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*, 71(1), 50–54.
- [83]- Sobhani, A. M., Ebrahimi, S. A., & Mahmoudian, M. (2002). An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by Peganum harmala L. seeds extract and its  $\beta$ -carboline alkaloids. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 19–23.
- [84]- Boeira, J. M., Da Silva, J., Erdtmann, B., & Henriques, J. A. P. (2001). Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 89(6), 287–294.

- [85]- Song, Y., Kesuma, D., Wang, J., Deng, Y., Duan, J., Wang, J. H., & Qi, R. Z. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(1), 128–132.
- [86]- Chen, Q., Chao, R., Chen, H., Hou, X., Yan, H., Zhou, S., ... Xu, A. (2005). Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer*, 114(5), 675–682.
- [87]- Lamchouri, F., Zemzami, M., Jossang, A., Settaf, A., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2013). Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 699–706.
- [88]- Li, C., Wang, Y., Wang, C., Yi, X., Li, M., & He, X. (2017). Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells. *Phytomedicine*, 28, 10–18.
- [89]- Hamsa, T. P., & Kuttan, G. (2010). Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 649(1–3), 64–73.
- [90]- Liu, J., Li, Q., Liu, Z., Lin, L., Zhang, X., Cao, M., & Jiang, J. (2016). Harmine induces cell cycle arrest and mitochondrial pathway-mediated cellular apoptosis in SW620 cells via inhibition of the Akt and ERK signaling pathways. *Oncology Reports*, 35(6), 3363–3370.
- [91]- Javeed, M., Rasul, A., Hussain, G., Jabeen, F., Rasool, B., Riaz, A., ... Ali, M. (2018). Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 13(3), 203.
- [92]- Zhang, X. F., Sun, R. Q., Jia, Y. F., Chen, Q., Tu, R. F., Li, K. K., ... Cao, R. H. (2016). Synthesis and mechanisms of action of novel harmine derivatives as potential antitumor agents. *Scientific Reports*, 6(January), 1–16.
- [93]- Bartholome, A., Kampkötter, A., Tanner, S., Sies, H., & Klotz, L. O. (2010). Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 58–64.
- [94]- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., ... Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochemical Journal*, 408(3), 297–315.
- [95]- Radhakrishnan, A., Nanjappa, V., Raja, R., Sathe, G., Puttamalles, V. N., Jain, A. P., ... Chatterjee, A. (2016). A dual specificity kinase, DYRK1A, as a potential therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 6(October).
- [96]- Uhl, K. L., Schultz, C. R., Geerts, D., & Bachmann, A. S. (2018). Harmine, a dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) inhibitor induces caspase-mediated apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Cell International*, 18(1), 1–14.

- [97]- Wang, H., Wang, Y., Gao, H., Wang, B., Dou, L., & Li, Y. (2018). Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in leukemic cells through targeting the PI3K/Akt/mTOR and p38 signaling pathways. *Oncology Letters*, 15(2), 1423–1428.
- [98]- Bezerra, D. P., Pessoa, C., De Moraes, M. O., Saker-Neto, N., Silveira, E. R., & Costa-Lotuf, L. V. (2013). Overview of the therapeutic potential of piperlongumine (piperlongumine). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 453–463.
- [99]- Liu, Z., Shi, Z., Lin, J., Zhao, S., Hao, M., Xu, J., ... Diao, A. (2019). Piperlongumine-induced nuclear translocation of the FOXO3A transcription factor triggers BIM-mediated apoptosis in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 163, 101–110.
- [100]- Piska, K., Gunia-Krzyżak, A., Koczurkiewicz, P., Wójcik-Pszczola, K., & Pękala, E. (2018). Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents – Synthesis and properties of analogues: A mini-review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 13–20.
- [101]- Yamaguchi, Y., Kasukabe, T., & Kumakura, S. (2018). Piperlongumine rapidly induces the death of human pancreatic cancer cells mainly through the induction of ferroptosis. *International Journal of Oncology*, 52(3), 1011–1022.
- [102]- Karki, K., Hedrick, E., Kasiappan, R., Jin, U. H., & Safe, S. (2017). Piperlongumine induces Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent downregulation of specificity protein transcription factors. *Cancer Prevention Research*, 10(8), 467–477.
- [103]- Kumar, S., & Agnihotri, N. (2019). Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(June 2018), 1462–1477.
- [104]- Niu, M., Xu, X., Shen, Y., Yao, Y., Qiao, J., Zhu, F., ... Xu, K. (2015). Piperlongumine is a novel nuclear export inhibitor with potent anticancer activity. *Chemico-Biological Interactions*, 237, 66–72.
- [105]- Wang, Y., Wang, J. W., Xiao, X., Shan, Y., Xue, B., Jiang, G., ... Xu, Z. X. (2013). Piperlongumine induces autophagy by targeting p38 signaling. *Cell Death and Disease*, 4(10), 1–11.
- [106]- Liu, Q. R., Liu, J. M., Chen, Y., Xie, X. Q., Xiong, X. X., Qiu, X. Y., ... Chen, X. Q. (2014). Piperlongumine inhibits migration of glioblastoma cells via activation of ROS-dependent p38 and JNK signaling pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.
- [107]- Wang, Y., Wu, X., Zhou, Y., Jiang, H., Pan, S., & Sun, B. (2016). Piperlongumine suppresses growth and sensitizes pancreatic tumors to gemcitabine in a xenograft mouse model by modulating the NF-kappa B pathway. *Cancer Prevention Research*, 9(3), 234–244.
- [108]- Viles, H. A. (2000). Book Review: From monsoons to microbes: understanding the ocean's role in human health. In *Progress in Physical Geography: Earth and Environment* (Vol. 24).

- [109]- Lahlou, M. (2013). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 04(03), 17–31.
- [110]- Kanase, H. R., & Singh, K. N. M. (2018). Marine pharmacology: Potential, challenges, and future in India. *Journal of Medical Sciences (Taiwan)*, 38(2), 49–53.
- [111]- Gerwick, William H., Moore, B. H. (2013). Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *ACS Chemical Biology*, 19(1), 85–98.
- [112]- Haq, S. H., Al-Ruwaished, G., Al-Mutlaq, M. A., Naji, S. A., Al-Mogren, M., Al-Rashed, S., ... Al-Mussallam, A. (2019). Antioxidant, Anticancer Activity and Phytochemical Analysis of Green Algae, *Chaetomorpha* Collected from the Arabian Gulf. *Scientific Reports*, 9(1), 1–7.
- [113]- Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y., & Chang, H. W. (2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13(1), 1.
- [114]- Kiruba, N. J. M., Pradeep, M. A., & Thatheyus, A. J. (2018). Discovering Promising Anti-cancer Drug Candidates from Marine Algae. *Science International*, 6(2), 44–50.
- [115]- Apyrshko, G. N., Ivanov, V. N., Milchakova, N. a, & Nekhoroshev, M. V. (2005). Mediterranean and Black Sea Organisms and Algae from mariculture as sources of antitumor drugs. *Experimental Oncology*, 2005, 94–95.
- [116]- Martínez Andrade, K. A., Lauritano, C., Romano, G., & Ianora, A. (2018). Marine microalgae with anti-cancer properties. *Marine Drugs*, 16(5).
- [117]- Ishikawa, Y., & Quiney, H. M. (1993). Relativistic many-body perturbation-theory calculations based on Dirac-Fock-Breit wave functions. *Physical Review A*, 47(3), 1732–1739.
- [118]- Messyasz, B., Michalak, I., Łęska, B., Schroeder, G., Górka, B., Korzeniowska, K., ... Chojnacka, K. (2018). Valuable natural products from marine and freshwater macroalgae obtained from supercritical fluid extracts. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 591–603.
- [119]- Quadri, I., Hassani, I. I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., & Jebbar, M. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 186–187, 119–131.
- [120]- McGenety, T. J., Gemmell, R. T., Grant, W. D., & Stan-Lotter, H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*, 2(3), 243–250.
- [121]- Hou, J., & Cui, H. L. (2018). In Vitro Antioxidant, Antihemolytic, and Anticancer Activity of the Carotenoids from Halophilic Archaea. *Current Microbiology*, 75(3), 266–271.
- [122]- Oren, A. (2014). Halophilic archaea on Earth and in space: Growth and survival under extreme conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 372(2030).

- [123]- Giani, M., Garbayo, I., Vílchez, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2019). Haloarchaeal carotenoids: Healthy novel compounds from extreme environments. *Marine Drugs*, 17(9), 1–13.
- [124]- Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13.
- [125]- Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., & Morana, A. (2017). Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 21(5), 933–945.
- [126]- Mita, M. M., Mita, A., & Rowinsky, E. K. (2003). The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 2
- [127]- Ra, S., & Dm, S. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976.
- [128]- Yellen, P., Saqçena, M., Salloum, D., Feng, J., Preda, A., Xu, L., ... Foster, D. A. (2011). High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle*, 10(22), 3948–3956.
- [129]- Xie, J., Wang, X., & Proud, C. G. (2018). OMS does TORC2 talk to. *Biochemical Journal*, 475(10), 1721–1738.
- [130]- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P. (2013). MTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448), 217–223.
- [131]- (Zoncu, Efeyan, & Sabatini, 2011) Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 21–35.
- [132]- Khan, M., Biswas, D., Ghosh, M., Mandloi, S., Chakrabarti, S., & Chakrabarti, P. (2015). mTORC2 controls cancer cell survival by modulating gluconeogenesis. *Cell Death Discovery*, 1(1), 1–12.
- [133]- Liu, Q., Chang, J. W., Wang, J., Kang, S. A., Thoreen, C. C., Markhard, A., ... Gray, N. S. (2010). Discovery of 1-(4-(4-Propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1 H)-one as a highly potent, selective mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol.
- [134]- Wang, R. C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., ... Levine, B. (2012). Akt-Mediated Regulation of Autophagy and Tumorigenesis Through Beclin 1 Phosphorylation. *Science*, 338(6109), 956–959.
- [135]- Qi Xue, Janice A. Nagy, Eleanor J. Manseau, Thuy L. Phung, H. F. D., E., and L., & Benjamin. (2009). Rapamycin inhibition of the Akt/mTOR pathway blocks select stages of VEGF-A164 driven angiogenesis, in part by blocking S6Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(1), 1–7.

- [136]- Park, S., Sim, H., & Lee, K. (2016). Rapamycin-resistant and torin-sensitive mTOR signaling promotes the survival and proliferation of leukemic cells. *BMB Reports*, 49(1), 63–68.
- [137]- Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., ... Gray, N. S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8023–8032.
- [138]- Benavides-Serrato, A., Lee, J., Holmes, B., Landon, K. A., Bashir, T., Jung, M. E., ... Gera, J. (2019). Specific blockade of Rictor-mTOR association inhibits mTORC2 activity and is cytotoxic in glioblastoma (*PLoS One* (2017) 12:4 (e0176599) *PLoS ONE*, 14(2), 1–20).
- [139]- Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758.
- [140]- Hoffner, MSN, ANP-BC, AOCNP, B., & Benchich, MSN, NP-C, AOCNP, K. (2018). Trametinibe: A Targeted Therapy in Metastatic Melanoma. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 9(7), 741–745.
- [141]- Lugowska, I., Koseła-Paterczyk, H., Kozak, K., & Rutkowski, P. (2015). Trametinibe: A MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *OncoTargets and Therapy*, 8, 2251–2259.
- [142]- Falchook, G. S., Lewis, K. D., Infante, J. R., Gordon, M. S., Vogelzang, N. J., DeMarini, D. J., ... Fecher, L. A. (2012). Activity of the oral MEK inhibitor trametinibe in patients with advanced melanoma: A phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet Oncology*, 13(8), 782–789.
- [143]- M.L., M., R.M., P., M.E., N., L.P., S., & J.C., M. (2009). High-dose ethanol induces second-order aversive conditioning in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(18), 217A.
- [144]- McCain, J. (2013). The MAPK (ERK) pathway: Investigational combinations for the treatment of BRAF- mutated metastatic melanoma. *P and T*, 38(2).
- [145]- Li, L., Zhao, G. D., Shi, Z., Qi, L. L., Zhou, L. Y., & Fu, Z. X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC (Review). *Oncology Letters*, 12(5), 3045–3050.
- [146]- Shao, G. L., Wang, M. C., Fan, X. L., Zhong, L., Ji, S. F., Sang, G., & Wang, S. (2018). Correlation between Raf/MEK/ERKs signaling pathway and clinicopathological features and prognosis for patients with breast cancer having axillary lymph node metastasis. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 17(253), 1–10.
- [147]- The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1213–1226.
- [148]- Paraiso, K. H. T., Der Kooi, K. Van, Messina, J. L., & Smalley, K. S. M. (2010). Measurement of constitutive MAPK and PI3K/AKT signaling activity in human cancer cell lines. *Methods in Enzymology*, 484(C), 549–567.

- [149]- Lin, L., Ding, D., Jiang, Y., Li, Y., & Li, S. (2018). MEK inhibitors induce apoptosis via FoxO3a-dependent PUMA induction in colorectal cancer cells. *Oncogenesis*, 7(9), 0–8.
- [150]- Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf). Acesso em: 15.05.19
- [151]- Thermo Scientific. Assessment of Nucleic Acid Purity. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> Acesso em: 15.05.19
- [152]- McLysaght, A. (2008). Evolutionary steps of sex chromosomes are reflected in retrogenes. *Trends in Genetics*, 24(10), 478–481.
- [153]- Moura, A. C. arolin. de, Lazzari, V. M., Agnes, G., Almeida, S., Giovenardi, M., & Veiga, A. B. eatri. G. da. (2014). Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control? *Einstein (São Paulo, Brazil)*, 12(3), 336–341.
- [154]- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., ... Yoshida, M. (1998). Leptomycin B Inhibition of Signal-Mediated Nuclear Export by Direct Binding to CRM1. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, 242, 540–547.
- [155]- David C. Bouck, PhD1, Peter Shu, BS, Jimmy Cui, BS, Anang Shelat, PhD, and T., & Chen, P. (2011). A High Content Screen Identifies Inhibitors of Nuclear Export of Forkhead Transcription Factors. *J Biomol Screen*, 16(4), 1–18.
- [156]- Pardo, A., Reyman, D., Poyato, J. M. L., & Medina, F. (1992). Some  $\beta$ -carboline derivatives as fluorescence standards. *Journal of Luminescence*, 51(5), 269–274.
- [157]- Manske F. H. R. & Holmes L. H. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology, Volume II, New York*, 1952, Academic Press Inc.
- [158]- Abkallo, H. M., Kawano, H., Watanabe, K., & Kobayashi, N. (2011). A new cell-based reporter system for sensitive screening of nuclear export inhibitors. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 5(6), 286–292.
- [159]- Kloet, D. E. A., Polderman, P. E., Eijkelenboom, A., Smits, L. M., Van Triest, M. H., Van Den Berg, M. C. W., ... Burgering, B. M. T. (2015). FOXO target gene CTDSP2 regulates cell cycle progression through Ras and p21Cip1/Waf1. *Biochemical Journal*, 469(2), 289–298.
- [160]- Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Lepore Signorile, M., & Simone, C. (2019). FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*, 8(9), 1110.
- [161]- Zhang, P., Huang, C. R., Wang, W., Zhang, X. K., Chen, J. J., Wang, J. J. Jiang, J. W. (2016). Harmine Hydrochloride Triggers G2 Phase Arrest and Apoptosis in MGC-803 Cells and SMMC-7721 Cells by Upregulating p21, Ativating Caspase-8/Bid, and Downregulating ERK/Bad Pathway. *Phytotherapy Research*, 30(1), 31–40.

- [162]- Stahl, M., Dijkers, P. F., Kops, G. J. P. L., Lens, S. M. A., Coffey, P. J., Burgering, B. M. T., & Medema, R. H. (2002). The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27, Kip1 and Bim in Response to IL-2. *The Journal of Immunology*, 168(10), 5024–5031.
- [163]- Lees, S. J., Childs, T. E., & Booth, F. W. (2008). Age-dependent FOXO regulation of p27Kip1 expression via a conserved binding motif in rat muscle precursor cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 295(5), 1238–1247.
- [164]- Song, X., Gao, T., Lei, Q., Zhang, L., Yao, Y., & Xiong, J. (2018). Piperlongumine Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells Via Reactive Oxygen Species Mediated Mitochondria Disruption. *Nutrition and Cancer*, 70(3), 502–511.
- [165]- Tripathi, S. K., & Biswal, B. K. (2020). Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent. *Pharmacological Research*, 156, 104772.
- [166]- Kang, Q., & Yan, S. (2015). Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(4), 1345–1350.
- [167]- You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., ... Mak, T. W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1657–1663.
- [168]- Dey, P., Ström, A., & Gustafsson, J. A. (2014). Estrogen receptor  $\beta$  upregulates FOXO3a and causes induction of apoptosis through PUMA in prostate cancer. *Oncogene*, 33(33), 4213–4225.
- [169]- Teplicky, T., Danisova, M., Valica, M., Chorvat, D., & Marcek Chorvatova, A. (2017). Fluorescence properties of chlorella sp. Algae. *Advances in Electrical and Electronic Engineering*, 15(2), 352–357.
- [170]- Satomi, Y. (2017). Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. *Anticancer Research*, 37(4), 1557–1562.
- [171]- Takahashi, K., Hosokawa, M., Kasajima, H., Hatanaka, K., Kudo, K., Shimoyama, N., & Miyashita, K. (2015). Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues. *Oncology Letters*, 10(3), 1463–1467.
- [172]- Kumar, S. R., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2013). Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine Drugs*, 11(12), 5130–5147.
- [173]- Nigjeh, S.E.; Yusoff, F.; Banu, N.; Alitheen, M.; Rasoli, M.; Keong, Y.S.; Rahman, A. Cytotoxic effect of ethanol extract of microalga, *Chaetoceros calcitrans*, and its mechanisms in inducing apoptosis in human breast cancer cell line. *Biomed. Res. Int.* 2013, 2013, 1–9.
- [174]- Shah, M.R.; Kalpa, W.S.; Ju-Young, K.; Lakmal, H.H.C.; Ji-Hyeok, L.; So-Jeong, A.; You-Jin, J.; Joon-Baek, L. Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *Afr. J. Biotechnol.* 2014, 13, 792–805.

- [175]- Samarakoon, K.W.; Ko, J.Y.; Shah, M.M.R.; Lee, J.H.; Kang, M.C.; O-Nam, K.; Lee, J.B.; Jeon, Y.J. In vitro studies of anti-inflammatory and anticancer activities of organic solvent extracts from cultured marine microalgae. *Algae* 2013, 28, 111–119.
- [176]- Lin, P.-Y.; Tsai, C.-T.; Chuang, W.-L.; Chao, Y.-H.; Pan, I.-H.; Chen, Y.-K.; Lin, C.-C.; Wang, B.-Y. *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo. *BMC Complement. Altern. Med.* 2017, 17, 88.
- [177]- Hussein, H. A., Mohamad, H., Ghazaly, M. M., Laith, A. A., & Abdullah, M. A. (2020). Cytotoxic effects of *Tetraselmis suecica* chloroform extracts with silver nanoparticle co-application on MCF-7, 4 T1, and Vero cell lines. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 127–143.
- [178]- Safarpour, A., Ebrahimi, M., Fazeli, S. A. S., & Amoozegar, M. A. (2019). Supernatant metabolites from Halophilic Archaea to reduce tumorigenesis in prostate cancer in-vitro and in-vivo. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(1), 241–253.
- [179]- Samarakoon, K. W., Ko, J. Y., Lee, J. H., Kwon, O. N., Kim, S. W., & Jeon, Y. J. (2014). Apoptotic anticancer activity of a novel fatty alcohol ester isolated from cultured marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 231–240.
- [180]- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., & Arad, S. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 17(3), 215–222.
- [181]- Bergé, J. P., Bourgoignon, N., Carbonnelle, D., Le Bert, V., Tomasoni, C., Durand, P., & Roussakis, C. (1997). Antiproliferative effects of an organic extract from the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) cleve. Against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Anticancer Research*, 17(3 C), 2115–2120.
- [182]- Davy, P. M. C., Allsopp, R. C., Donlon, T. A., Morris, B. J., Willcox, D. C., & Willcox, B. J. (2018). FOXO3 and Exceptional Longevity: Insights From Hydra to Humans. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 127).
- [183]- Petruk, G., Gifuni, I., Illiano, A., Roxo, M., Pinto, G., Amoresano, A., ... Monti, D. M. (2018). Simultaneous production of antioxidants and starch from the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 34(March), 164–174.
- [184]- Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., ... Nakamura, S. (2014). Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAR), 1–5.
- [185]- Abbes, M., Baati, H., Guerhazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13.
- [186]- Sikkandar, A., Murugan, K., Al-Sohaibani, S., Rayappan, F., Nair, A. & Tilton, F. (2013) Halophilic Bacteria – A Potent Source of Carotenoids with Antioxidant and Anticancer Potentials. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. Vol 7 (4), p.2825-2830

- [187]- Carter, C. G. (2015). Feeding in hatcheries. In *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*.
- [188]- Meloni, M., Candusso, S., Galeotti, M., & Volpatti, D. (2015). Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following in vivo infection with *Vibrio anguillarum*. A time course experiment. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(1), 82–90.
- [189]- Li, L., Wu, Q., Wang, X., Lu, H., Xi, X., Zhou, M., ... Wang, L. (2018). Discovery of Novel Caeridins from the Skin Secretion of the Australian White's Tree Frog, *Litoria caerulea*. *International Journal of Genomics*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8158453>
- [190]- Apponyi, M. A., Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Maselli, V. M., Bowie, J. H., Tyler, M. J., ... Llewellyn, L. E. (2004). Host-defence peptides of Australian anurans: Structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*, 25(6), 1035–1054.



## X. ANEXOS E APÊNDICES

### ANEXO 1

**Tabela X.1. - Dados de identificação dos extratos proteicos, pigmentares, celulares, de *Haloarqueas* e de microalgas utilizados no estudo.** O código original e código atribuído aos extratos de microalgas, assim como a espécie e o solvente de extração estão indicados.

<b>Código do Extrato</b>	<b>Código original</b>	<b>Espécie</b>	<b>Solvente de extração</b>
Alg1	CTP4-Water_WS	<i>Tetrasemis</i> sp.	Água
Alg2	CTP4-Ethanol_WS	<i>Tetrasemis</i> sp.	Etanol
Alg3	CTP4-EA_WS	<i>Tetrasemis</i> sp.	EA
Alg4	Iso G-Water_WS	<i>Isochrysis</i> sp.	Água
Alg5	Iso G-Ethanol_WS	<i>Isochrysis</i> sp.	Etanol
Alg6	Iso G-EA_WS	<i>Isochrysis</i> sp.	EA
Alg7	Nanno-Water_WS	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Água
Alg8	Nanno-Ethanol_WS	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Etanol
Alg9	Nanno-EA_WS	<i>Nannochloropsis</i> sp.	EA
Alg10	PAT-Water_WS	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Água
Alg11	PAT-Ethanol_WS	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Etanol
Alg12	PAT-EA_WS	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EA
Alg13	POC-Water_WS	<i>Porphyridium</i> sp.	Água
Alg14	POC-Ethanol_WS	<i>Porphyridium</i> sp.	Etanol
Alg15	POC_WS	<i>Porphyridium</i> sp.	EA
Alg16	SkPtn-Water_WS	<i>Skeletonema costatum</i>	Água
Alg17	SkPtn-Ethanol_WS	<i>Skeletonema costatum</i>	Etanol
Alg18	SkPtn-EA_WS	<i>Skeletonema costatum</i>	EA
Alg19	HA C5 E1	<i>Haloarcula</i>	Hexano
Alg20	HA C5 E2	<i>Haloarcula</i>	Diclorometano
Alg21	HA C5 E3	<i>Haloarcula</i>	EA
Alg22	HA C5 E4	<i>Haloarcula</i>	Clorofórmio
Alg23	HA C5 E5	<i>Haloarcula</i>	-
Alg24	HA C5 E6	<i>Haloarcula</i>	Acetona
Alg25	HA C5 E7	<i>Haloarcula</i>	-
Alg26	HB C18 E1	<i>Halobacterium</i>	Hexano
Alg27	HB C18 E2	<i>Halobacterium</i>	Diclorofórmio
Alg28	HB C18 E3	<i>Halobacterium</i>	EA
Alg29	HB C18 E4	<i>Halobacterium</i>	Clorofórmio
Alg30	HB C18 E5	<i>Halobacterium</i>	-
Alg31	HB C18 E6	<i>Halobacterium</i>	Acetona
Alg32	HB C18 E7	<i>Halobacterium</i>	-

**Tabela X.2. - Dados de identificação das frações do extrato da microalga Alg11 utilizados no estudo.** O nome atribuído às frações, assim como a espécie e o solvente de extração do extrato da microalga Alg11 estão indicados.

Fração	Extrato	Espécie	Solvente de extração
EPS	Alg11	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> stock	-
F1	Alg11	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Hexano
F2	Alg11	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diclorometano
F3	Alg11	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acetato de Etilo
F4	Alg11	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Água e Etanol

**Tabela X.3. -Dados de identificação dos péptidos utilizados no estudo.** O nome original e código atribuído aos péptidos, assim como a sua espécie e o tamanho estão indicados.

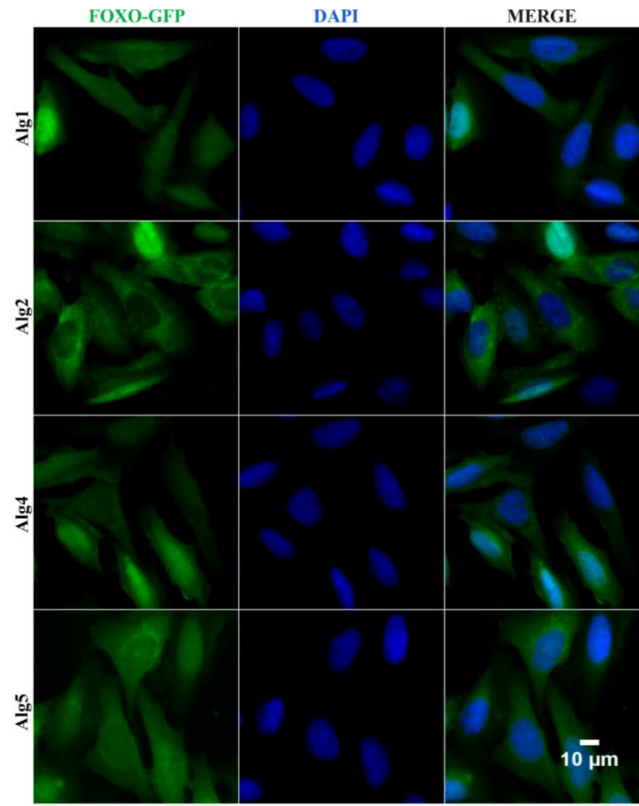
Extrato	Código	Espécie	Péptido	Tamanho (aa)
Pep1	NK27	-	Péptido sintético	27
Pep2	DICE	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Dicentracin	30
Pep3	CAE	<i>Litoria gilleni</i>	<i>Caerina</i>	25

## ANEXO 2

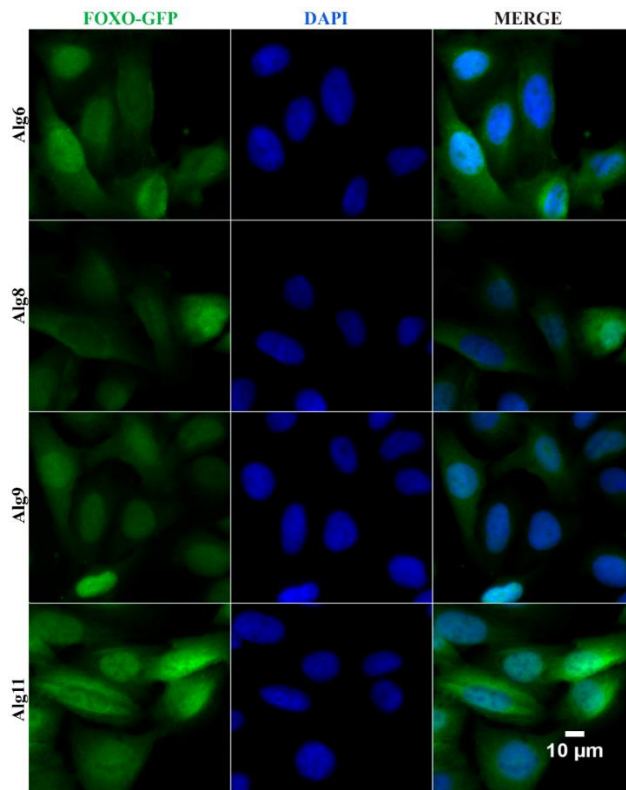
**Tabela X.4. -Análise qualitativa dos extratos de microalgas Alg1-Alg18.** A observação de células U2OS FOXO tratadas com os extratos de microalgas Alg1-Alg18 através de microscopia fluorescente permitiu analisar a localização subcelular da proteína FOXO-GFP. As células também foram tratadas com o controlo positivo-Leptomomicina B- e com os controlos negativos- DMSO e etanol.

Composto	Localização
DMSO	Algumas células apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Etanol	
Leptomomicina B	FOXO encontra-se localizado no núcleo de todas as células.
Alg1	Quase não existem células, mas as existentes apresentam FOXO localizado no núcleo e no citoplasma uniformemente.
Alg2	Demasiadas células para se obter um bom campo de visão. Algumas apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Alg3	Poucas células e em mau estado. Impossível analisar a localização de FOXO.
Alg4	Demasiadas células. Algumas aparentavam ter FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos e outras localizado apenas no núcleo.
Alg5	FOXO localizado uniformemente no núcleo e no citoplasma de algumas células, mas a maioria apresentava FOXO apenas no núcleo.
Alg6	No geral, as células estão em muito mau estado. FOXO está uniformemente localizado no núcleo e no citoplasma.
Alg7	Demasiadas células e muitas em mau estado. Campo de visão pequeno porque a preparação tem uma bolha. As células analisadas apresentavam FOXO uniformemente distribuído nos dois compartimentos.
Alg8	Poucas células e em péssimo estado. Impossível analisar a localização de FOXO.
Alg9	Demasiadas células. Algumas apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Alg10	A preparação tem uma bolha. Algumas apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Alg11	A maioria das células apresenta FOXO localizado no núcleo.
Alg12	
Alg13	Algumas apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Alg14	As células estão em mau estado e com forma arredondada.
Alg15	Algumas apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Alg16	Demasiadas células e muitas em mau estado. No geral, apresentam FOXO uniformemente distribuído nos dois compartimentos celulares.
Alg17	Algumas apresentam FOXO apenas no núcleo, mas a maioria apresenta FOXO localizado uniformemente nos dois compartimentos.
Alg18	Muitas células e em mau estado. Impossível analisar a localização de FOXO.

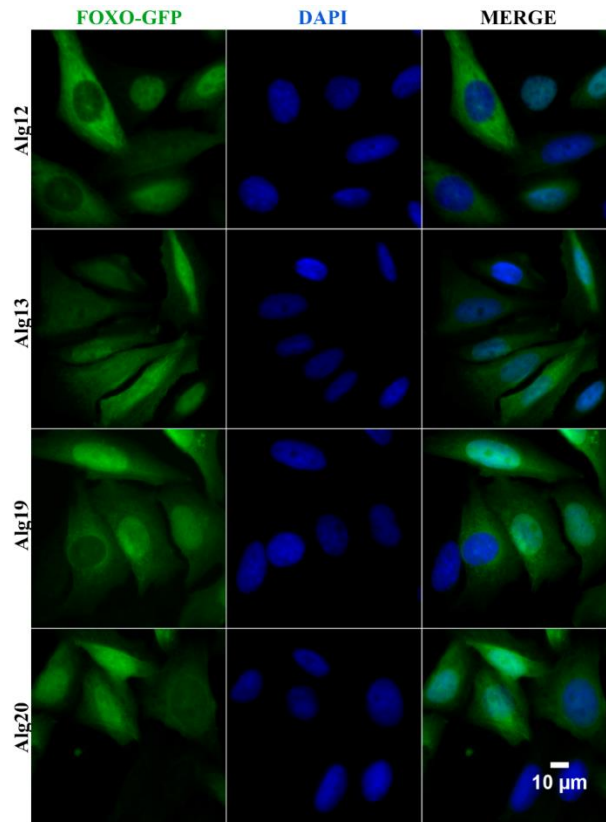
### ANEXO 3



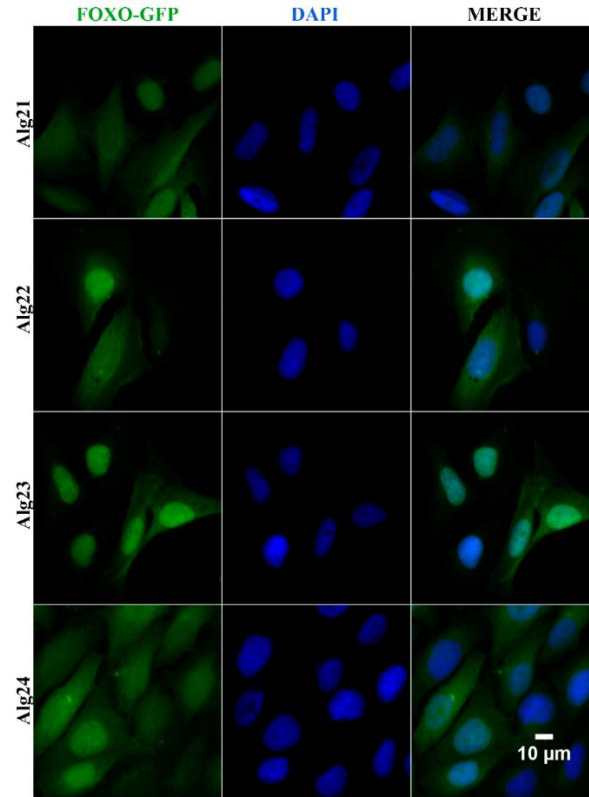
**Figura X.1. - FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg1, Alg2, Alg4 e Alg5.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg1, Alg2, Alg4 e Alg5 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.



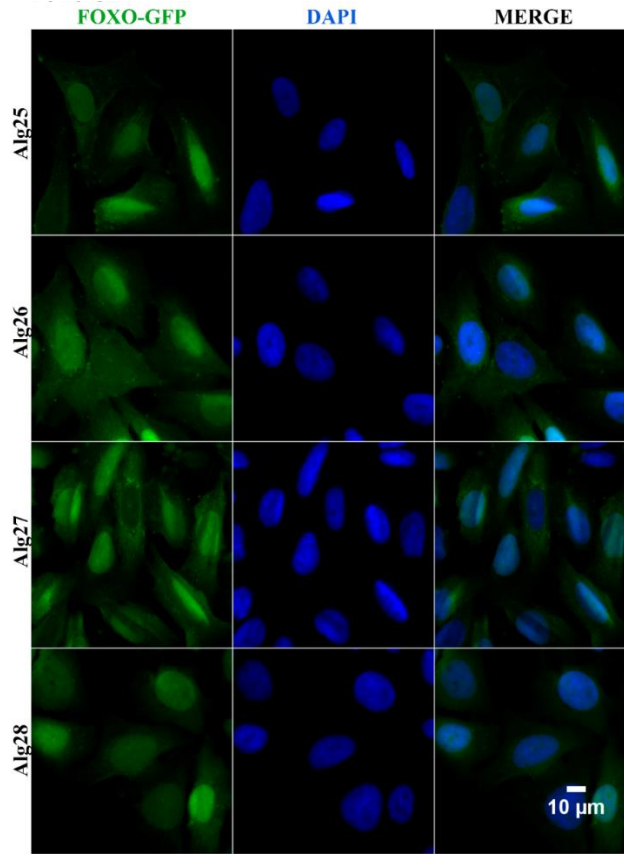
**Figura X.2. FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg6, Alg8 e Alg9 e Alg11.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg6, Alg8 e Alg9 e Alg11 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.



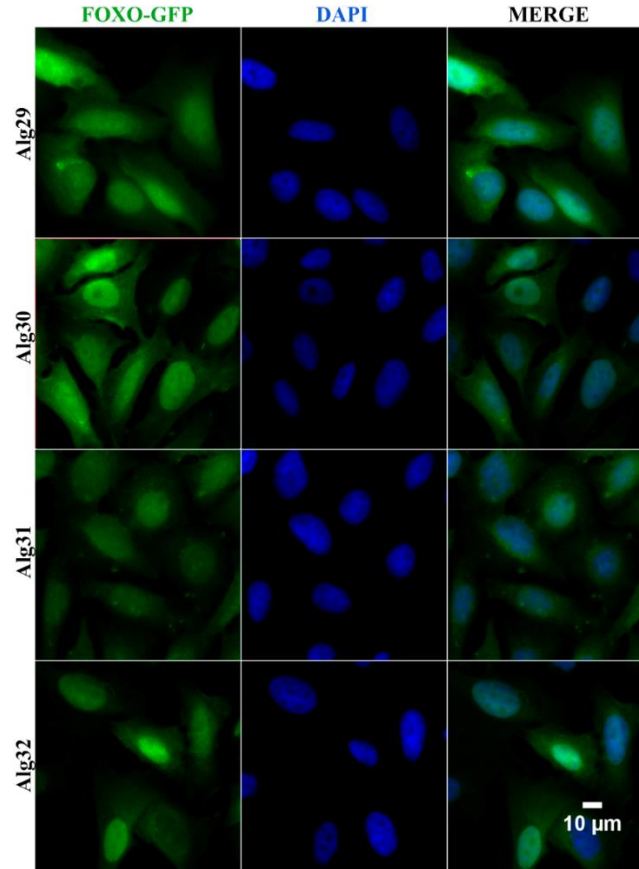
**Figura X.3. FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de microalgas Alg12, Alg13 e extratos de Haloarqueas Alg19 e Alg20.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de microalgas Alg12, Alg13 e com os extratos de Haloarqueas Alg19 e Alg20, durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.



**Figura X.4. FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de Halorubras Alg21, Alg22 e Alg24.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de Halorubras Alg21, Alg22 e Alg24 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

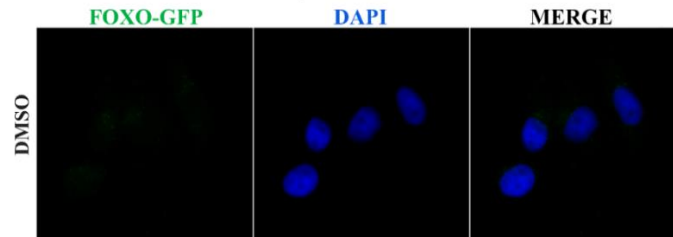


**Figura X.5. - FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de *Halorqueas* Alg25-Alg28** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de *Halorqueas* Alg25-Alg28 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

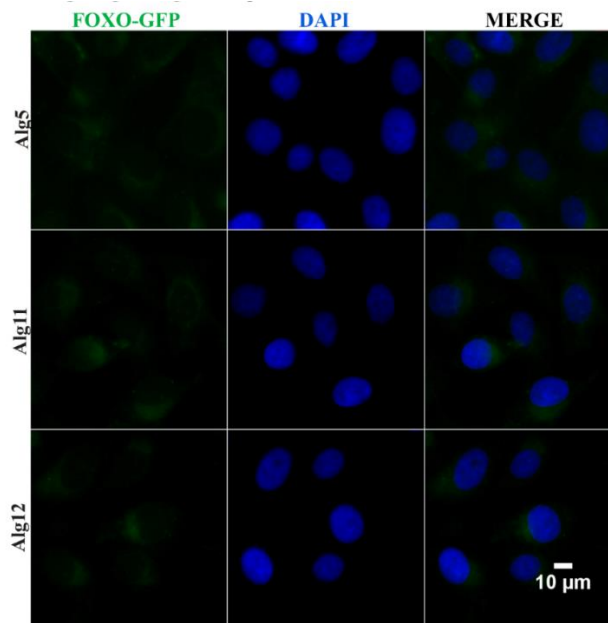


**Figura X.6.- FOXO-GFP está localizado no núcleo e no citoplasma de células tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg29- Alg32.** As células U2OS FOXO foram tratadas com os extratos de Haloarqueas Alg29- Alg32 durante 1h. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.

## ANEXO 4



**Figura X.7. - As células U2OS PARENTAL sem tratamento não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com DMSO que foi utilizado como controlo negativo. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.



**Figura X.8 - As células U2OS PARENTAL tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12 não apresentam fluorescência.** As células U2OS PARENTAL foram tratadas com os extratos de microalgas Alg5, Alg11 e Alg12. O GFP (verde) representa a localização subcelular de FOXO. DAPI (azul) representa o núcleo das células. Merge representa a sobreposição de GFP e DAPI. A observação e aquisição de imagem foi realizada através da objetiva 40X do Microscópio trinocular Vertical de Fluorescência Motorizado AxioImager Z2 com câmara fotográfica (AxioCamHR3) acoplada ao sistema de análise de imagem AxioVision 4.8.2. A análise de imagens foi realizada no programa de análise de imagem Image J 1.52, acoplado à extensão Fiji.