

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Determinação da eficácia de um morfolino contra o mTOR na
sobrevivência e proliferação de células de cancro gástrico

Mestrando: Miguel Oliveira Pereira

Orientador: Prof. Doutora Ana Ramos Coelho^{1,2}

1-Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

2-Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2020

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Determinação da eficácia de um morfolino contra o mTOR na sobrevivência e proliferação de células de cancro gástrico

Mestrando: Miguel Oliveira Pereira

Júri:

Presidente- Doutora Maria Helena Soares¹

Orientador- Doutora Ana Ramos Coelho^{1,2}

Arguente- Doutor Alexandre Rui de Sampaio Teixeira^{3,4}

1-Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

2-Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

3-HiSeedTech

4-ABC- Algarve Biomedical Center

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Versão Final

(esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2020



Mestrado em
Tecnologias
Moleculares em
Saúde (MTMS)

**Determinação da eficácia de um morfolino
contra o mTOR na sobrevivência e
proliferação de células de cancro gástrico**

Miguel Oliveira
Pereira

2020

Este projeto foi desenvolvido nos laboratórios da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) com o apoio do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), nomeadamente do departamento de genética -laboratório Doutora Luísa Romão.

Um agradecimento pela oportunidade dada para a utilização dos espaços e equipamentos destas instituições para a elaboração deste projeto.



Resumo

Cancro é o termo genérico para nos referirmos à totalidade dos tumores malignos. Esta doença é responsável por cerca de 8 milhões de mortes por ano em todo o mundo, sendo que este número tem vindo a aumentar de ano para ano tornando-se uma prioridade a procura de terapias para cancro cada vez mais específicas.

A via de sinalização mTOR encontra-se alterada em mais de 70% dos cancros que surgem atualmente incluindo cancro gástrico que evidencia grandes alterações nesta via. A proteína mTOR está inserida na via PI3K/AKT/mTOR, dividindo-se em dois complexos (mTORC1 e mTORC2) e desempenha um papel fundamental sendo responsável pela regulação do crescimento celular, proliferação, sobrevivência e síntese proteica. Alterações nesta via estão muitas vezes associadas com a tumorigénese, angiogénese, crescimento tumoral e metastização.

Atualmente são usadas drogas que inibem mTOR à base de rapamicina (rapalogs) na terapia de vários tumores, no entanto são conhecidas várias limitações deste tipo de inibidores devido aos seus mecanismos de feedback, à seletividade tumoral, e instabilidade enzimática (funcionam principalmente como citoestáticos). Apesar da existência de novas gerações de inibidores, estes ainda se encontram em fase de teste não sabendo ainda qual o seu efeito clínico.

Neste projeto utilizou-se um Vivo-morfolino contra mTOR bloqueando a sua ação em linhas celulares de cancro gástrico. Foram realizados ensaios de proliferação, cujo resultados preliminares sugerem um aumento da morte celular e diminuição geral da proliferação celular. Para além disso verificou-se que o tratamento com o Vivo-morfolino induziu alterações da morfologia celular.

Verificando a efetividade do bloqueio da via mTOR com o Vivo-morfolino podemos abrir portas para o desenvolvimento de inibidores de mTOR mais dirigidos e eficazes no tratamento de vários tumores, levando assim a um aumento da sobrevivência e qualidade de vida dos doentes.

Palavras-Chave: Via de sinalização mTOR; Cancro Gástrico; Morfolino; Inibição mTOR; Diminuição da expressão proteica.

Abstract

Cancer is the generic term for all malignant tumors. This disease is responsible for about 8 million deaths per year worldwide, and this number has been increasing from year to year making it a priority to seek therapies for cancer more and more specific.

The mTOR signaling pathway is altered in more than 70% of cancers that currently appear, including gastric cancer that shows major changes in this pathway. The mTOR protein is inserted in the PI3K / AKT / mTOR pathway, dividing into two complexes (mTORC1 and mTORC2) and plays a fundamental role being responsible for the regulation of cell growth, proliferation, survival and protein synthesis. Changes in this pathway are often associated with tumorigenesis, angiogenesis, tumor growth and metastasis.

Currently, drugs that inhibit rapamycin-based mTOR (rapalogs) are used in the treatment of various tumors, however several limitations of this type of inhibitor are known due to their feedback mechanisms, tumor selectivity, and enzymatic instability (they function mainly as cyto-static). . Despite the existence of new generations of inhibitors, they are still in the testing phase, not yet knowing what their clinical effect is.

In this project, a Vivo-morpholino against mTOR was used, blocking its action in gastric cancer cell lines. Proliferation assays were carried out, whose preliminary results suggest an increase in cell death and a general decrease in cell proliferation. In addition, it was found that treatment with Vivo-morpholino induced changes in cell morphology.

By verifying the effectiveness of the blockade of the mTOR pathway with Vivo-morpholino, we can open doors for the development of more targeted and effective mTOR inhibitors in the treatment of various tumors, thus leading to increased survival and quality of life for patients.

Key words: mTOR signaling pathway; Gastric Cancer; Morpholino; MTOR inhibition; Decreased protein expression.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Ana Ramos Coelho, por toda a paciência, dedicação e empenho, mesmo quando o pequeno Francisco não queria estudar a via mTOR ela sempre estava presente.

À minha família, que me apoiou sempre nos bons e maus momentos no decorrer deste projeto.

Ao meu pai, o grande responsável por eu querer fazer isto e atingir o objetivo a que me propus.

Ao João, Andreia, Jéssica e Pedro por serem o meu braço direito.

Aos meus colegas Marcela e Ricardo por me incentivarem a procurar e fazer mais e melhor.

Por último, ao Afonso, Ana, Constança, Caetana, Anamar e Dinis por serem o futuro. Que este mundo das ciências vos inspire.

A todos muito obrigado!

“A pandemia não vai impedir o mundo de girar”

Lista de abreviaturas

DNA- ácido desoxirribonucleico

RNA- ácido ribonucleico

mTOR -alvo mecanístico da rapamicina

AKT- proteína cinse B

EGFR- *epidermal growth factor receptor*

Elf4E- fator de iniciação da tradução

FKBP12- recetor intracelular

mRNA- RNA mensageiro

TSC- complexo esclerose tuberosa

VeGF- fator de crescimento endotelial vascular

OMS- organização mundial de saúde

4E-BP1 – proteína 1 ligante a 4E iniciadora de tradução eucariótica

CO2 – dióxido de carbono

mTORC – complexo de mTOR

p70S6K – cinase da proteína ribossomal S6

PBS – tampão fosfato-salino

PDK1 – cinase 1 dependente de fosfoinosítídeo

PI3K – fosfoinosítídeo 3-cinase

PIP2 – fosfatidilinositol-4,5-bifostato PIP3 – fosfatidilinositol-3,4,5-trifostato

p-mTOR – mTOR fosforilado

p-AKT- AKT fosforilado

p-4EBP1- 4EBP1 fosforilado

PTEN – homólogo da fosfatase e tensina

Raptor – proteína regulatória associada ao mTOR

Rheb – homólogo do Ras enriquecido no cérebro

Rictor – porção do mTOR Insensível à rapamicina

S6K1 – proteína ribossomal S6 cinase 1

SFB – soro fetal bovino

MO- morfolino

Índice Geral

<i>I- Introdução</i>	1
<i>II- Estado de arte</i>	5
2.1-O cancro.....	5
2.2-Mecanismos moleculares em cancro.....	8
2.3- A via de sinalização mTOR.....	10
2.3.1-Sinalização a montante do mTOR.....	12
2.3.2-Sinalização a jusante do mTOR.....	14
2.4- A via mTOR e cancro.....	15
2.4.1-A via mTOR e cancro gástrico.....	16
2.5-Inibidores de mTOR.....	17
2.6-Inibição génica com morfolino(MO).....	19
<i>III- Objetivos</i>	21
3.1-Objetivo geral.....	21
3.2-Objetivos específicos.....	21
<i>IV- Metodologias</i>	23
4.1-Cultura celular.....	23
4.2-Desenho e inoculação de morfolino.....	25
4.2.1-Plaqueamento em placas 6-well e contagem celular.....	26
4.2.2-Inoculação do morfolino.....	28
4.3-Estudo de proliferação e lise celular.....	29
4.4-Western Blotting.....	30
4.4.1-Western Blot para p-4EBP1.....	31
4.4.2-Western Blot para mTOR e p-AKT.....	32

4.5-Purificação e quantificação de mRNA por Real-Time qPCR.....	33
<i>V- Resultados</i>	37
5.1-Resultados dos ensaios de proliferação celular.....	37
5.2-Resultados esperados da expressão de mTOR e ativação de mTORC1 e mTORC2..	41
5.3-Resultados esperados da quantificação do mRNA de mTOR.....	42
<i>VI- Discussão</i>	43
<i>VII- Conclusão</i>	47
<i>VIII- Referencias Bibliográficas</i>	48
<i>i- Apêndice</i>	I
i.i-Resultados do ensaio de proliferação- Otimização de resultados.....	I
i.ii-Otimização de Western Blot.....	XI
<i>ii. Anexos</i>	XII
ii.i-Preparação de soluções.....	XII
ii.ii-Marcas e consumíveis.....	XIII

Índice de tabelas

Tabela 1.1-Número de mortes devido aos 4 cancros mais prevalentes em 2019	1
Tabela 4.1- Western Blot para p-4EBP1	31
Tabela 4.2- Western Blot para mTOR e p-AKT.....	32
Tabela 5.1- Resultados de estudo de proliferação- 24h	35
Tabela 5.2- Resultados de estudo de proliferação- 48h	35

Índice de figuras

Figura 2.1 Etapas da Carcinogénese.....	5
Figura 2.2 Vias de sinalização envolvidas no cancro	9
Figura 2.3 Via de sinalização mTOR.....	10
Figura 2.4 Composição de mTOR.	11
Figura 2.5 Morfolino.....	19
Figura 4.1 Fluxo de trabalho do projeto.....	23
Figura 4.2 Células GP202 24h após descongelamento (10x)	24
Figura 4.3 Identificação de placas para inoculação de morfolino.....	26

Figura 4.4 Contagem celular em hemocitómetro	27
Figura 4.5 Morfolino adicionado a cada poço na placa 6-well 1 (24h)	29
Figura 4.6 Morfolino adicionado a cada poço na placa 6-well 1 (48h)	29
Figura 4.7 Purificação de RNA-NZYTech.....	34
Figura 5.1 Representação gráfica de resultados-24h.....	36
Figura 5.2 Representação gráfica de resultados-48h.....	37
Figura 5.3 Morfologia celular após inoculação de morfolino (48h)	38

I- Introdução

O cancro é atualmente a segunda maior causa de morte no mundo e, foi devido a esta condição que se estimou cerca de 96 milhões de mortes em 2018. (Organization, 2020)

De acordo com os dados da agência da Organização Mundial de Saúde (OMS), um quarto da população em Portugal está em risco de desenvolver cancro até aos 75 anos e 10% corre risco de morrer de doença oncológica (Organization, 2020). Em termos de mortalidade, o cancro do pulmão é o mais mortal em Portugal, tal como acontece a nível mundial, seguido do cancro do cólon, do estômago e da próstata, estando o cancro da mama em quinto lugar (Organization, 2020). (Tabela 1.1)

Tabela 1.1 Número de mortes devido aos 4 cancros mais prevalentes em 2019 (fonte: American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. Atlanta: American Cancer Society; 2019. Acesso em Maio 2020)

Estimated Number of Deaths for the Four Major Cancers by Sex and Age Group, 2019

	<u>All ages</u>	<u>Younger than 45</u>	<u>45 and Older</u>	<u>Younger than 65</u>	<u>65 and Older</u>
All sites					
Male	321,670	8,490	313,180	97,010	224,660
Female	285,210	9,630	275,580	85,040	200,170
Colon & rectum					
Male	27,640	980	26,660	9,710	17,930
Female	23,380	740	22,640	6,460	16,920
Lung & bronchus					
Male	76,650	580	76,070	21,620	55,030
Female	66,020	560	65,460	17,220	48,800
Breast (female)	41,760	2,340	39,420	16,860	24,900
Prostate	31,620	*	*	3,450	28,170

Apesar de todos os esforços da comunidade médico-científica ainda não se conseguiu adotar uma terapêutica standard que englobe todos os tipos de tumores devido à complexidade de cada tipo (De Palma & Hanahan, 2012).

Os protocolos e esquemas terapêuticos para os diversos tipos de tumores muitas vezes não conseguem responder eficazmente a todos os grupos de doentes, estando em constante promoção de novas descobertas de prevenir, detetar e tratar de forma mais específica e seletiva o cancro, tendo sempre em vista a qualidade de vida do utente

durante o tratamento. Sendo que é neste momento adotado um modelo de tratamento direcionado a cada tipo de tumor (De Palma & Hanahan, 2012).

Médicos e cientistas têm vindo adotando o lema “cada caso é um caso”, tornando-se imprescindível a adoção de modelos terapêuticos mais complexos e inovadores, distanciando-nos da desatualizada quimioterapia/radioterapia focalizando-nos na terapia dirigida. Seguindo esta linha de raciocínio cada vez mais a comunidade científica aposta nos métodos moleculares como ferramenta para o diagnóstico e terapêutica de um vasto leque de tumores, reduzindo assim de forma drástica a mortalidade e aumentando a sobrevivência do doente (Mills, et al., 2003).

Estas novas técnicas trouxeram consigo a possibilidade de clonar e sequenciar genes, de estudar a sua expressão *in vitro* e *in vivo*, de os introduzir em linha celulares ou mesmo em células germinais de animais, de deduzir facilmente os produtos que codificam e obter as respetivas proteínas em quantidades virtualmente ilimitadas (Pereira, 1991).

O poder desta versatilidade tecnológica não se esgotou na investigação fundamental da oncogénese, sendo que a sua aplicação astuta no campo do diagnóstico, teve já profundas implicações na oncologia clínica, sendo talvez o caso mais marcante o exemplo da imunohistoquímica que utiliza anticorpos como marcadores moleculares em tecidos para verificar a sua expressão, sendo hoje-em-dia banal em qualquer laboratório de Anatomia patológica e essencial para o diagnóstico e prognóstico de qualquer tumor (Muller, Burgart, Krause-Paulus, Thibodeau, & Almeida, 2001).

Além da imunohistoquímica, estamos a dar grandes passos no campo da genética molecular e será possível num futuro próximo que esta tecnologia possa modificar radicalmente as estratégias terapêuticas que dispomos atualmente.

Neste projeto, pretendemos bloquear a via de sinalização mTOR em linhas celulares de cancro gástrico pois esta encontra-se hiperativada em quase 70% dos cancros humanos conhecidos, um dos quais é o cancro gástrico.

Apesar de já se terem desenvolvido vários inibidores para esta via, como por exemplo os análogos da rapamicina (rapalogs) ou os competidores de ATP, existem ainda grandes limitações na sua transposição para a clínica devido à falta de uma inibição total da via mTOR e em grande parte à co-inibição de outras proteínas-alvo que este tipo de inibidores induz, tendo consequências para a saúde do doente podendo potenciar efeitos secundários exacerbados (Moschetta, Reale, Marasco, Vacca, & Carratú, 2014).

Perante esta situação torna-se imprescindível o desenvolvimento de um inibidor capaz de bloquear totalmente a via de sinalização mTOR, sendo para este totalmente específico, proporcionando uma inibição completa desta proteína.

Neste estudo será utilizado um análogo de DNA -morfolino- que se irá ligar de forma específica a um RNA-alvo, com o qual é complementar, em linhas celulares de cancro gástrico (CG), bloqueando desta forma a ligação ou passagem de proteínas. Assim, será contruído um morfolino complementar ao mRNA do mTOR, no sentido de inibir a tradução e assim restringir a hiperativação da via de sinalização mTOR.

Se verificarmos esta hipótese, esta poderá ser uma oportunidade para investimento na terapêutica de certos tumores, aumentando assim a sobrevivência do doente.

Página em branco

II- Estado de arte

2.1 O cancro

O cancro é um grupo complexo de doenças de grande latência, pois o tempo que decorre entre a exposição ao carcinogéneo e a manifestação clínica da doença pode exceder os 20 anos (Douglas & Lowy, 1996). Existem múltiplas causas para este tipo de doenças como a ação dos carcinogéneos químicos tais como os produtos da pirólise do tabaco, físicos como as radiações, biológicos como agentes infecciosos (vírus), hormonas, inflamação crónica e stress oxidativo (Santos & Teixeira, 2011).

Cancro é o termo geral usado para referir todos os tipos de tumores malignos, sendo estes definidos de acordo com o tecido onde se iniciam. Assim, se o tumor tiver origem nos tecidos epiteliais é designado como carcinoma, se tiver origem no tecido conjuntivo é conhecido por sarcoma. O cancro pode, igualmente, envolver linfócitos (linfomas) e células da glia (gliomas) (Santos & Teixeira, 2011).

O processo de carcinogénese é dividido em quatro fases: a iniciação, a promoção, a transformação maligna e a progressão (invasão e metastização). (Figura 2.1)

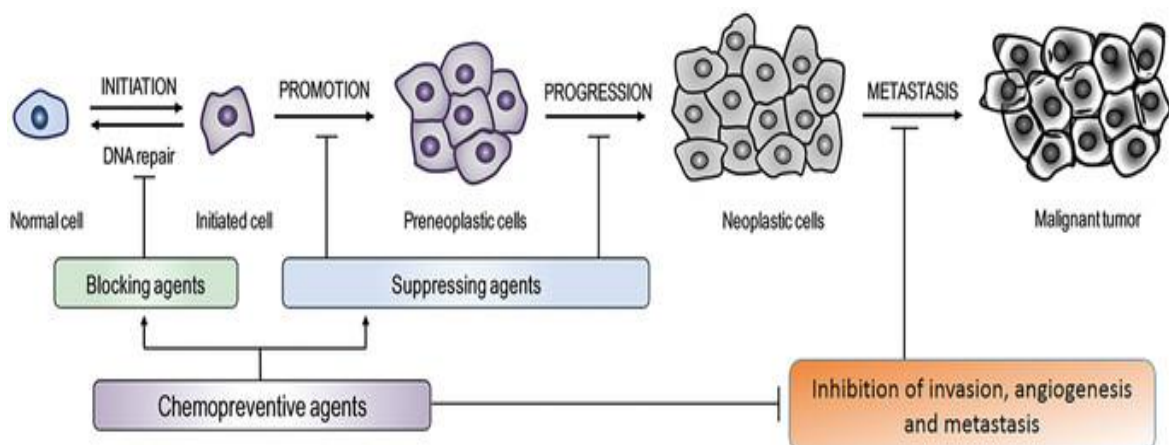


Figura 2.1 Etapas da Carcinogénese (Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Carcinogenesis-phases-initiation-promotion-progression-and-metastasis-A-Initiation_fig2_279304092; Acesso em Maio 2020.

A primeira etapa consiste numa mutação e/ou alterações genéticas numa única célula, ou seja, é a ocorrência de um evento que altera o genoma celular.

Ainda é desconhecida a natureza das alterações iniciais que levam ao despoletar deste processo, contudo uma só alteração no DNA não é suficiente para provocar doença, são necessárias várias mutações em sequência, para o desenvolvimento de cancro.

Por outro lado, apesar destas alterações ocorrerem, o organismo está apetrechado com mecanismos de reparação, e além disso é necessário que estas ocorram em locais específicos, como genes supressores de tumores e protooncogenes (Stevens & Lowe, 2002).

A seguir à iniciação segue-se a promoção que consiste na indução da proliferação celular das células iniciadas. Nesta fase as células alteradas estão dependentes de um estímulo para proliferar e estas são agrupados em três grupos tendo em conta o mecanismo através do qual induzem o surgimento de neoplasias.

A primeira classe são os genotóxicos que causam danos direto ao DNA através da formação de adutos de DNA. A segunda classe são os mitogénicos que se ligam a recetores nas células e estimulam a divisão celular causando deste modo uma hiperplasia sustentada. Por fim, temos os citotóxicos que induzem dano tecidual levando à hiperplasia sem causar danos diretos ao nível do DNA (Cohen & Ellwein, 1990). O acumular destas alterações (mutações), responsáveis pela perda do controlo fisiológico da proliferação celular e de múltiplas atividades biológicas, leva à transformação maligna (Stevens & Lowe, 2002).

Por último, temos a progressão que é uma fase durante a qual o crescimento celular se torna autónomo, ou seja, independente do carcinogénico ou promotor e neste momento já existem mutações suficientes para imortalizar as células.

O desenvolvimento de uma neoplasia invasiva é o ponto final da progressão (Stevens & Lowe, 2002).

Os fatores de risco aumentam a probabilidade de uma pessoa desenvolver cancro, contudo não significa que uma pessoa estando exposto a um determinado fator de risco vá, no futuro, desenvolver esta condição. Este é um tema bastante complexo e de difícil compreensão, pois não se entende porque uma pessoa desenvolve cancro e a outra não, se ambas estiveram sujeitas ao mesmo fator de risco, embora a carga genética de cada indivíduo influencie o seu percurso.

Os fatores de risco mais conhecidos e mais comuns são: a idade (envelhecer), o tabaco, a exposição solar, a radiação ionizante, determinados produtos químicos, alguns vírus e bactérias, algumas hormonas, álcool e má alimentação associado à falta de atividade física regular; com o passar do tempo vários fatores podem agir em conjunto para causar cancro (Douglas & Lowy, 1996). Com o envelhecimento da população, o risco de desenvolver cancro é maior uma vez que grande parte dos cancros ocorre em pessoas com idade superior a 65 anos, porém isto não significa que pessoas mais novas ou mesmo crianças não desenvolvam cancro contudo, é menos provável (Douglas & Lowy, 1996).

Outro fator extremamente importante é o tabaco e este representa a maior causa evitável de morte. O uso do tabaco ou produtos relacionados com o mesmo aumenta consideravelmente o risco de desenvolver cancro; os fumadores estão mais suscetíveis a desenvolver cancro do pulmão, laringe, boca, esófago e garganta, daí ser essencial a cessação tabágica como método de prevenção (Douglas & Lowy, 1996).

A radiação ultravioleta é outro grande fator de risco implicado no cancro. Este fator causa envelhecimento da pele, provocando lesões que podem evoluir para cancro, daí ser extremamente importante limitar o tempo de exposição solar, evitando as horas em que a intensidade solar é maior, utilizar protetores com fator de proteção solar (SPF) de, pelo menos, 30 e utilizar mangas compridas, chapéu e óculos de sol (Douglas & Lowy, 1996).

A radiação ionizante também pode causar danos celulares levando ao desenvolvimento de cancro. Esta radiação pode provir do espaço ou resultar de acidentes em centrais nucleares utilizadas para a produção de energia ou armas. As pessoas expostas a este tipo de radiação têm um risco aumentado de desenvolver cancro da tiroide, mama, pulmão e leucemia. A radiação ionizante também é utilizada em procedimentos médicos para obter imagens do interior do corpo, mas nesta situação o risco de desenvolver cancro é extremamente baixo uma vez que a dose utilizada é muito pequena e, portanto, o benefício supera o risco (Ames, Gold, & Willett, 1995).

Estar infetado com determinadas bactérias ou vírus pode aumentar o risco de desenvolvimento de cancro: o vírus do papiloma humano (HPV) é a principal causa de cancro cervical podendo também estar implicado noutros tipos de cancro. Outro vírus muito comum é o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus que causa a SIDA. Os doentes infetados com HIV têm um maior risco de desenvolver cancro, como linfoma ou mesmo sarcoma de Kaposi. Por outro lado, temos as bactérias como a *Helicobacter*

pylori, que pode causar úlceras estomacais que podem evoluir para cancro (Ames, Gold, & Willett, 1995).

2.2 Mecanismos moleculares em cancro

A suspeita de que alterações no material genético de uma célula poderiam estar na base da transformação maligna foi pela primeira vez formulada no início do século XX por Theodor Boveri. Boveri baseou a sua teoria no facto de células cancerígenas evidenciarem, com alguma frequência, alterações da cromatina e figuras mitóticas anormais (McKusick & Boveri, 1985).

Observações de outro tipo, acumuladas ao longo dos anos seguintes convergiram na mesma conclusão, constatando que agentes químicos e físicos genotóxicos poderiam induzir cancro e que certas formas de neoplasias teriam transmissão hereditária (Bishop, 1987).

No entanto, foi a partir da análise experimental com retrovírus oncogénicos, que em 1970, se revelou pela primeira vez a existência de genes capazes de induzir a transformação maligna. Estes achados foram corroborados quando genes, isolados a partir de DNA tumoral, foram transfectados em linhas celulares, induzindo nestas a transformação maligna (Bernstein & Weinberg, 1985).

Durante o curso da progressão tumoral, as células cancerígenas adquirem um grande número de alterações nas suas características. Algumas incluem capacidade de proliferar de forma anárquica e desregulada, invadindo assim as proximidades dos tecidos vizinhos e metastizar outros locais anatómicos, provocar uma resposta angiogénica, e invadir mecanismos que limitam a proliferação celular, tal como a apoptose (Martin, 2003). Estas propriedades refletem alterações nas vias de sinalização célula, que em condições normais, controlam a proliferação célula, motilidade e sobrevivência.

As vias de sinalização celular não estão isoladas umas das outras, estando conectadas para formar redes complexas de sinalização. (Figura 2.2)

As células recebem informação de diferentes recetores de fatores de crescimento e de contactos célula-célula e célula-matriz, que depois integram a mesma para regular diversos processos, como a síntese proteica, crescimento celular, motilidade,

arquitetura celular e polaridade, diferenciação e programação de morte celular. A complexidade das redes de sinalização celular tem implicações importantes para a compreensão do comportamento das células tumorais e para a nossa capacidade de usar esse conhecimento para terapia do cancro.

A proliferação celular, a motilidade e a sobrevivência são reguladas por múltiplas vias, e as alterações que ocorrem nas células cancerígenas são o resultado de múltiplas alterações na maquinaria de sinalização celular. As células cancerígenas são geneticamente instáveis, sofrendo múltiplas alterações genéticas e epigenéticas e evoluem continuamente em resposta a pressões seletivas.

Mesmo que uma via mutacionalmente ativada possa ser bloqueada por um inibidor, as células tumorais podem evitar o inibidor ativando outras vias.

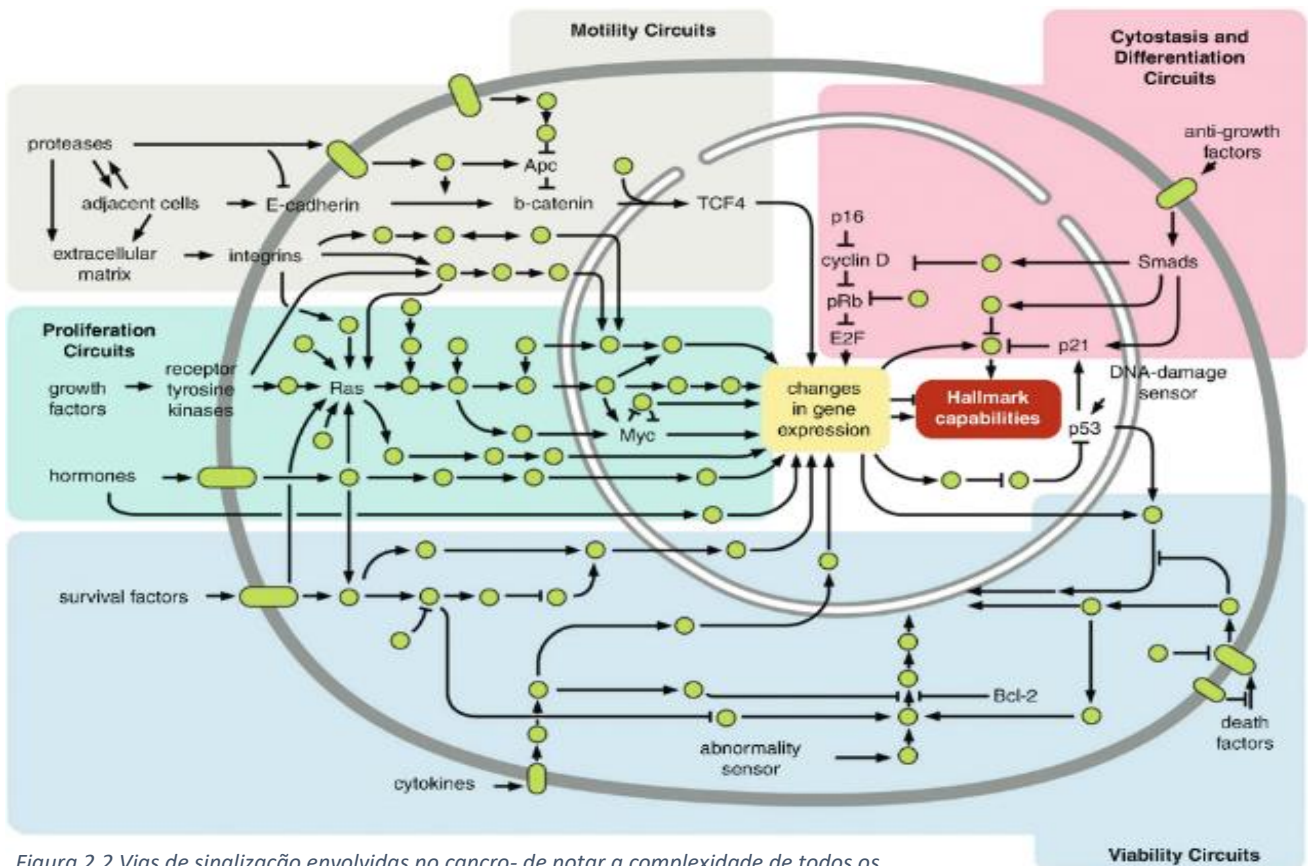


Figura 2.2 Vias de sinalização envolvidas no cancro- de notar a complexidade de todos os intervenientes desta cascata regulatória no decorrer da oncogénese. (fonte: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-95228-4_12); Acesso Maio 2020

Assim, embora as neoplasias em estágio inicial possam responder a um único inibidor, como por exemplo o mesilato de imatinib para o tratamento de leucemias mieloides crônicas e certos tumores estromais gastrointestinais (GIST), terapias eficazes para neoplasias mais avançadas podem exigir combinação de inibidores de sinalização.

2.3 A via de sinalização mTOR

Em 1964, Shegal e os seus colegas, durante uma expedição a Rapa Nui (conhecida também por Ilha de Páscoa), identificaram num isolado bacteriano de uma amostra de solo um componente com propriedades antifúngicas, imunossupressivas e anti-tumorais, a que mais tarde se chamou de rapamicina (em homenagem ao local da descoberta)(Eng, Shegal, & Claude, 1984) (Martel, Killicius, & Galet, 1977).

Várias análises a este novo componente revelaram que atua em parte devido à formação de um complexo com peptidil-prolil-isomerase FKBP12 para inibir as vias de sinalização necessárias ao crescimento celular e proliferação (Chung, Kuo, Crabtree, & Blenis, 1992).

Apesar das ideias estabelecidas à data, o mecanismo de ação completo da rapamicina permaneceu ilusório até 1994, quando estudos bioquímicos identificaram o mecanismo (antigamente chamado de “mammalian”) Target of Rapamycin (mTOR) com o alvo direto do complexo rapamicina-FKB12 em mamíferos.

O mTOR é uma proteína cinase serina/treonina que regula o crescimento celular e tem um papel de grande importância na regulação da síntese de proteínas. (Figura 2.3)

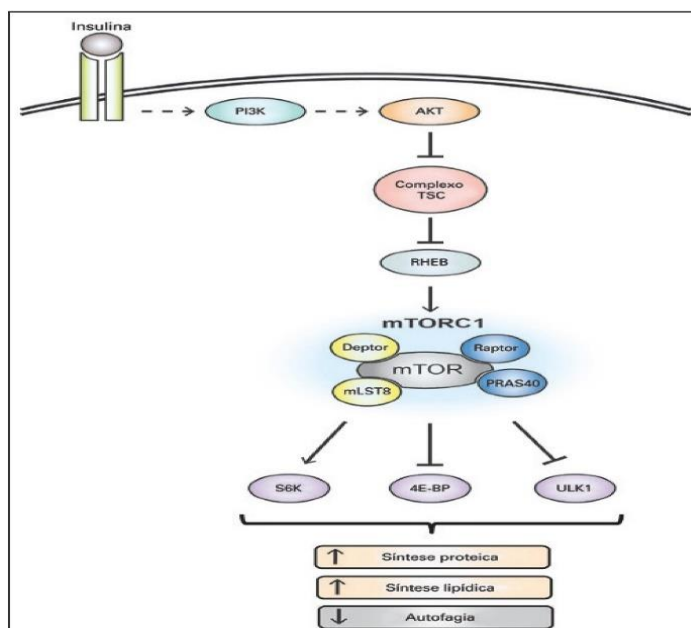


Figura 2.3 Via de sinalização mTOR. De notar que a via mTOR é responsável pela síntese proteica, síntese lipídica e diminuição da autofagia

(fonte: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-45082017000400507&script=sci_arttext&tIng=pt) ; Acesso em Maio 2020

A montante do mTOR os principais reguladores de atividade são PI3K/PTEN/AKT e Ras/Raf/MEK/ERK. A via do mTOR é fundamental para a vida da célula, sendo que a desregulação do gene que codifica o mTOR implica graves consequências para a mesma. Esta via regula funções celulares extremamente importantes, onde estão incluídas a tradução, a transcrição, a estabilidade da proteína e a organização do citoesqueleto (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011) (Inoki, Corradetti, & Guan, 2005).

O mTOR existe em dois complexos diferentes, o mTORC1 e o mTORC2. (Figura 2.4)

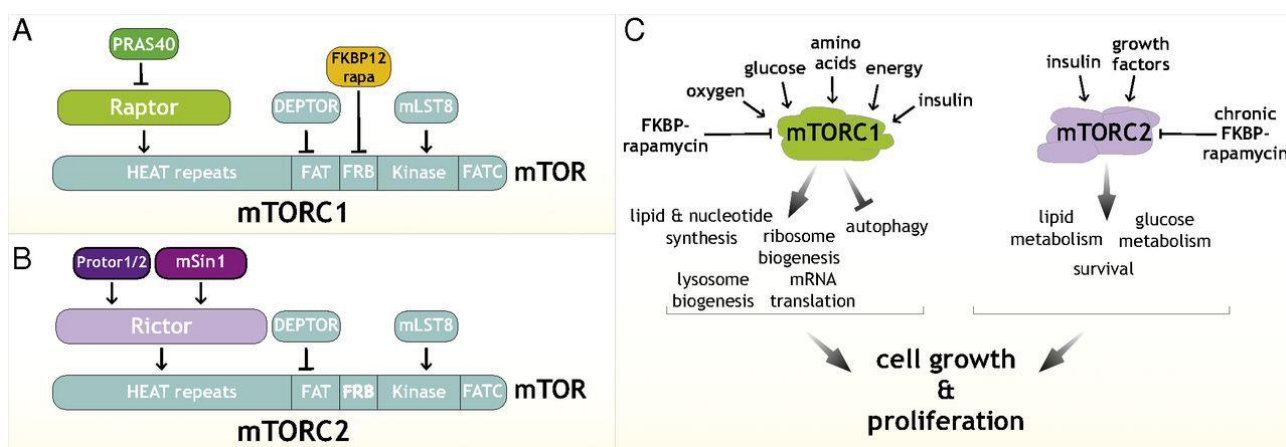


Figura 2.4 (A e B) Composição de mTORC1 e mTORC2- respectivamente; (C) Esquema que demonstra os sinais enviados por mTORC1 e mTORC2 e os processos que regulam para controlar o crescimento celular. (fonte: <https://www.pnas.org/content/114/45/11818>); Acesso em Junho 2020

O mTORC1 é um complexo proteico heterotrimérico, constituída por uma subunidade catalítica, o mTOR e várias outras proteínas, entre elas, a mLST8, DEPTOR, a PRAS40 e uma proteína associada à regulação celular (RAPTOR). Este complexo é sensível à rapamicina e a sua função está relacionada com a síntese de proteínas. O mTORC2 é constituído pelas proteínas mTOR, Rictor, GβL e mSin1, envolvidas na regulação das funções do citoesqueleto estimulam fibras de actina, paxilina, RhoA, RAC1 e proteína cinase (PKCα). Este complexo não é sensível à rapamicina, a não ser com tratamentos prolongados (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011) (Jiang, 2008).

A inativação do complexo esclerose tuberosa 1 (TSC1), ou harmatina e o complexo esclerose tuberosa 2 (TSC2) ou tuberina, que funcionam como um elemento regulador negativo do mTOR, pode resultar na síndrome do complexo esclerose tuberosa. O heterodímero TSC1-TSC2 é uma GTPase da proteína de ativação Rheb, e é

fundamental na ativação do mTORC1 (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011) (Jiang, 2008).

A inativação de certos genes supressores tumorais, como a PTEN, a serina-treoninacina 11 (STK11) (também designada como LKB1) ou p53 leva à inibição do complexo TSC1-TSC2, tendo como consequência a ativação da via do mTOR. A inativação ou mutação do PTEN ativa a AKT, que vai fosforilar e inibir o complexo TSC1-TSC2. A perda da STK11 suprime a AMPK (proteína que é ativada por AMP cinase), que geralmente regula uma fosforilação ativante do complexo TSC1-TSC2. O envolvimento da p53 na regulação da via de sinalização mTOR também é extremamente importante; a ativação da p53 é regulada pela ativação de AMPK com a consequente ativação do complexo TSC1-TSC2. A ativação de p53 aumenta a expressão de mRNA, PTEN, e TSC2 e deste modo a inativação de p53 leva à ativação do mTOR pela inibição do complexo TSC1-TSC2 (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011) (Feng, Zhang, Levine, & Jin, 2005) (Zhang, 2017).

2.3.1 Sinalização a montante do mTOR

- PI3K/AKT

A PI3K é uma enzima lipídica heterodimérica composta por uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora/adaptadora. No Homem existem 8 formas divididas em três classes (I,II e III) de acordo com a homologia da sequência e preferência do substrato (Corlot, Armand, & Soria, 2006).

A subunidade reguladora/adaptadora é representada pela enzima p85 e a combinação destas duas subunidades forma um complexo heterodimérico.

Uma função da PI3K é fosforilar o fosfoinositol, o que resulta na formação de lípidos tais como o Pi3-Fosfato [Pi(3)P], PI3,4-bifosfato [Pi(3,4)P2] e Pi3,4,5 trifosfato [PIP3(3,4,5)]. Estes lípidos estão envolvidos em vários processos intracelulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência da célula, a reorganização do citoesqueleto, o transporte de membrana, adesão celular, motilidade celular, angiogénese e ação da insulina; o PIP3 (3,4,5) é o lípido principal produzido *in vivo* e duas fosfatases diferentes são capazes de degradar este lípido, as fosfatases Src (SHIP1) e a fosfatase PTEN (Corlot, Armand, & Soria, 2006).

A PI3K e a PTEN são proteínas implicadas na perda de sensibilidade à insulina de tumores malignos. Mutações no gene que codifica a PTEN são verificadas em algumas doenças benignas congénitas (ex: Cowden, Bannayan Zonana), bem como em vários

tumores (ex: mama, melanoma, próstata, rim, ovário, endométrio) enfatizando o papel da PTEN e conseqüentemente do PI3K na carcinogénese (Zhang, 2017).

Alterações a nível da PTEN (mutações de inativação), estão implicadas no cancro da próstata, do colon, mama, tiroide, rim, linfomas, melanomas e glioblastomas (Corlot, Armand, & Soria, 2006).

- PDK1

A proteína cinase fosfatidilinositol-3-dependente 1, é a última a interagir com o PiP3 (3,4,5). Tem a capacidade de fosforilar as cinases T. Algumas destas cinases requerem uma interação da membrana através de domínios PH (Marat, Wallroth, Wen-Ting, & Muller, 2017).

- AKT

A AKT é uma cinase serina/treonina com homologia para o oncogene V-AKT-AKT8. Existem três tipos (AKT 1,2,3), cada um codificado por um gene diferente e a sua expressão varia, sendo a AKT2 mais abundante nos tecidos sensíveis à insulina sendo que a expressão de AKT1 e 3 não compensa a perda de AKT2 (Corlot, Armand, & Soria, 2006). A proteína AKT está envolvida na sobrevivência celular a vários níveis, incluindo através da ativação de mTOR, inibindo a GSK3 (sintetase cinase glicogénio 3), provocando um aumento dos níveis de β -catetina, ou inibindo a proteína BAD que se encontra envolvida no processo apoptótico (Zhang, 2017) .

Anomalias ao nível da AKT, nomeadamente a sua amplificação, estão envolvidas no cancro da próstata, ovário e da mama, em seres humanos, e linfomas em ratinhos (Corlot, Armand, & Soria, 2006) sendo a AKT a molécula sinalizadora mais estudada a jusante de PI3K.

A ativação da AKT é responsável pelas alterações na atividade nuclear do fator KB, alterações no fator relacionado com a hipoxia e alterações nos fatores de transcrição o que resulta numa modificação do ciclo celular e inibição da apoptose. A AKT aparece frequentemente ativada nos tumores do pâncreas, representando um indicador biológico da agressividade tumoral (Marat, Wallroth, Wen-Ting, & Muller, 2017).

A AKT é o principal elo de ligação entre PI3K e o complexo TSC a montante de mTORC1 e de facto, a inibição de AKT pode ser suficiente para o bloqueio da ativação de

mTORC1, sendo a AKT a molécula-chave para a ativação deste complexo (Dibble & Cantley, 2015)

2.3.2 Sinalização a jusante do mTOR

Como dito anteriormente, o mTOR desempenha um papel fulcral na síntese de proteínas, evolução do ciclo celular e sobrevivência celular. O mTORC1 regula portanto o crescimento celular, no entanto este é realizado por intermédio de reguladores de tradução como o 4EBP1 e o p70S6K1.

- 4EBP1

O 4EBP1 atua como um repressor da tradução por ligação e inativação de eIF4E. O mTOR fosforila diretamente e inibe a atividade da 4EBP1, podendo também, indiretamente inibir a fosfatase da proteína, que por sua vez desfosforila 4EBP1 durante as etapas do ciclo celular G1 para S (Wang, et al., 2019).

O eIF4E é um fator de iniciação, que é ativado por vários estímulos mutagénicos. A fosforilação do 4EBP1 conduz à libertação de eIF4E, que juntamente com outros fatores de iniciação, vão permitir que haja a identificação do codão de iniciação AUG permitindo deste modo o início da tradução.

O eIF4E aumenta a proliferação, sobrevivência celular e angiogenese, através do aumento da tradução de mRNA que codifica para proteínas como a ciclina D1, Bcl-2 e Bcl-xl (Ciuffreda, Sanza, Desideri, & Ricciardi, 2010).

Este processo sofre regulação através da proteína Raptor, pois quando esta está presente no complexo mTOR, este fosforila eficientemente tanto o 4EBP1 como o p70S6K1, contudo quando a Raptor está ausente existe uma diminuição da capacidade do mTOR fosforilar os seus substratos. (Inoki, Corradetti, & Guan, 2005) (Jiang, 2008)

- P70S6K1

A cinase p70S6K1 é outra importante molécula a jusante do mTOR, podendo também ser ativada por PDK1 e MAPK. O mTOR fosforila p70S6K1 conduzindo deste modo à recolha de subunidades 40S dos ribossomas aumentando conseqüentemente a tradução de mRNAs que codificam proteínas ribossomais, fatores de alongamento e fator de crescimento da insulina (Jiang, 2008).

Existem pelo menos três locais onde pode ocorrer fosforilação da p70S6K1, e todos eles podem ser bloqueados por inibidores do mTOR. A fosforilação da p70S6K1 é fundamental porque leva à substituição deste resíduo por blocos de alanina e à conseqüente ativação da cinase.

O mTOR pode bloquear a serina/treonina fosfatase que vai desfosforilar locais na p70S6K1 que são sensíveis à rapamicina. Isto explica o porquê da p70S6K1 sofrer uma desfosforilação rápida quando as células são tratadas com inibidores do mTOR. O p70S6K1 tem como alvos, proteínas ribossomais e fatores de crescimento de insulina (Jiang, 2008).

2.4 A via mTOR e cancro

A via de sinalização mTOR é frequentemente ativada em cancros humanos, sendo que estudos demonstraram que mutações ao nível desta via provocam perturbações no crescimento celular e no metabolismo que contribuem significativamente para o desenvolvimento de tumores (Yecies & Manning, 2011).

Estudos recentes realizados em modelos animais, demonstram uma ligação entre a via mTOR e o metabolismo, uma vez que o mTORC1 hiperativo leva a alterações metabólicas, que incluem defeitos na glucose e lípidos que podem, no futuro progredir no sentido do aparecimento de cancro (Cornu, Albert, & Hall, 2012).

As alterações da via PI3K/mTOR estão relacionadas com cancro através de complexos mecanismos que incluem a amplificação ou hiperativação de proto-oncogenes como a RAS, PI3K, AKT, recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), HER2/neu, BCR-ab, ou perda de funções dos genes supressores tumorais como por exemplo o PTEN, TSC ou LBK. (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011)

São vários os artigos que dão ênfase à relação da via mTOR com cancro dando uma visão geral dos níveis proteicos de vários componentes da via em várias neoplasias distintas, podemos descrever algumas das alterações:

- PTEN inativada/reduzida em gliomas, melanomas, cancro da próstata e cancro da mama (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011);
- Proteína TSC mutada em cancro de bexiga (Jiang, 2008);
- Cinase de ligação a GTP K-Ras mutada em cancro de bexiga (Jiang et al., 2008);
- Várias proteínas integradas na via mTOR com atividade tirosina cinase, sobre-expressas em tumores gastrointestinais, fígado, pâncreas e pulmão (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011);
- Componentes da via PI3K/AKT/mTOR desregulados em carcinoma de células renais (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011).

2.4.1 A via mTOR e cancro gástrico

O cancro gástrico é a quarta forma de cancro mais comum por todo o mundo, com cerca de 600000 novos casos anuais em homens e 300000 casos em mulheres, sendo esta a segunda causa de morte por cancro mais prevalente com uma estimativa de 700000 mortes anuais (Ferlay, Shin, Bray, Mathers, & Parkin, 2010).

Atualmente o tratamento de cancro gástrico é baseado na remoção cirúrgica do tumor primário, no entanto isto só é possível nas fases menos avançadas da doença, sendo que a grande maioria dos doentes não é passível de intervenção cirúrgica.

Em pacientes em fases mais avançadas, após a cirurgia, aposta-se na quimioterapia para o prolongamento da sobrevivência do utente e manter a qualidade de vida. Atualmente não existe um tratamento quimioterápico standard para o tratamento do cancro gástrico.

Determinar os perfis de expressão de moléculas-chave na sobrevivência celular e progressão de cancro gástrico poderá ajudar no diagnóstico e prevenção da doença. Devido ao seu potencial na progressão do cancro gástrico, a via mTOR tornou-se foco de desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos (Yu, et al., 2010).

Vários estudos pré-clínicos indicaram uma desregulação da atividade da via mTOR em modelos celulares de cancro gástrico. Mutações em reguladores “*upstream*” da via mTOR foram observadas em pacientes com cancro gástrico, além de que vários estudos

demonstraram evidencia de ativação da via mTOR em células deste tumor (Lang, et al., 2007).

Estes doentes demonstraram um aumento da expressão de mTOR, indicando a ativação desta via que tem sido positivamente correlacionada com progressão tumoral e sobrevivência destes utentes (Murayama, et al., 2009)

O tratamento de linhas celulares de cancro gástrico com inibidores do mTOR, mais concretamente *sirolimus* e *everolimus* resultaram num decréscimo na fosforilação de S6K1 e 4E-BP1 assim como na atenuação de HIF- α e VEGF (Cejka, et al., 2008).

O tratamento com *everolimus* resultou também no bloqueio do ciclo celular em G1 o que inibiu a proliferação da linha celular. Além disso o *everolimus*, em combinação com ciplastina, oxaliplatina ou docetaxel resultou na inibição sinérgica do crescimento das linhas celulares de cancro gástrico. Consistentes com os efeitos anti-proliferativos observados *in vitro*, os inibidores de mTOR isolados ou em combinação com outros agentes retardam significativamente a progressão tumoral em modelos de cancro gástrico. (Cejka, et al., 2008)

2.5 Inibidores de mTOR

Os inibidores de mTOR mais estabelecidos são a rapamicina e os seus análogos, também chamados de rapalogs, que demonstraram algum efeito na terapia anti-tumoral.

A rapamicina é uma lactona macrocíclica, produzida por *Streptomyces hygroscopicus*, e foi o primeiro inibidor de mTOR a ser descoberto. (Eng, Shegal, & Claude, 1984)

A rapamicina entra nas células e liga-se ao recetor intracelular FKBP12 formando um complexo inibidor. Este liga-se à região C-terminal de proteínas denominadas TOR FRB, onde exerce um efeito citotóxico, inibindo as funções de sinalização TOR para alvos a jusante. Alguns estudos propõem que o complexo rapamicina-FKBP12 pode inibir a função mTOR pela inativação de RAPTOR, impedindo que este se ligue a mTORC1 (Oshiro, et al., 2004)

A rapamicina apresenta como grandes desvantagens a sua fraca solubilidade em água e a sua baixa estabilidade físico-química. Para contornar estas limitações, foram desenvolvidas inúmeros análogos de rapamicina (rapalogs) com propriedades farmacocinéticas melhoradas. Podemos citar alguns exemplos de rapalogs como o

temsirolimus que atua inibindo a fosforilação do mTOR ao nível de S6K1 e 4E-BP1 e o *deforolimus* que diminui a fosforilação também de 4E-BP1 (Zhou, Yan, & Shile, 2010).

O sucesso clínico dos análogos da rapamicina tem sido limitado a alguns cânceros raros e as taxas de resposta em grandes tumores têm sido modestas. Apesar destas moléculas atuarem como inibidoras parciais de mTOR, é cada vez mais reconhecido que este mecanismo é insuficiente na obtenção de um efeito anticancerígeno extenso e potente, quando usados sozinhos (Zhou, Yan, & Shile, 2010).

Apesar da constante procura, ainda não se conseguiu desenvolver uma molécula enzimaticamente estável que consiga a inibição total da via mTOR nem a co-inibição de outras proteínas presentes nesta via que possam modular os mecanismos de *feedback* (Nassar, Hamieh, Gray, Thoner, & Fray, 2020).

Atualmente estão a ser desenvolvidos outras classes de inibidores de mTOR como os inibidores competitivos ATP-cinase que se encontram em fase de ensaios clínicos. O desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir mTOR por processos diferentes da rapamicina apresenta uma abordagem mais eficaz e consegue contornar problemas relacionados com a utilização dos análogos da rapamicina que só inibem mTORC1. Estas pequenas moléculas possuem um mecanismo competitivo-ATP capaz de inibir ambos os complexos de mTOR obtendo um efeito inibitório mais potente. Podemos incluir aqui algumas moléculas como a PP242 e PP30 que inibem tanto p70S6K1 como 4E-BP1. (Zhang, 2017) (Shenone, Brullo, Musumeci, Radi, & Botta, 2011)

Outras moléculas em fase de estudo são os chamados inibidores seletivos que também elas inibem ambos os complexos de mTOR. Entre estas moléculas encontram-se o INK128 e o AZD8055 que estão ambos em fase I dos ensaios clínicos e que estão a mostrar grandes resultados em leucemias (pela indução da apoptose) e carcinomas hepatocelulares em estado avançado, respetivamente. (García-Echeverría, 2010)

2.6 Inibição génica com Morfolino (MO)

Técnicas de silenciamento de genes são comumente usadas na área da biologia molecular e biologia do desenvolvimento. As abordagens *knockdown* baseadas em morfolino permitem identificar e caracterizar genes envolvidos em vários processos celulares tendo como vantagens a sua alta eficácia, especificidade e baixo custo (Gene Tools, LLC, 2020).

Geralmente, os morfolino são moléculas sintéticas constituídas por 25 oligonucleotídeos conectados por um “backbone” com carga neutra que se ligam por complementariedade a moléculas de mRNA alvo. (Figura 2.5)

Embora estes sejam muito parecidos com DNA, contêm anéis de morfolina no lugar dos grupos de açúcar encontrados no seu esqueleto. Esta simples conversão aumenta a estabilidade do morfolino nas células e reduz o custo de produção. (Figura 2.5)

As técnicas comuns para a introdução de um morfolino em cultura de células utilizam um péptido Endo-Porter. Este é um péptido com função de fornecer substâncias ao citosol das células por um processo mediado por endocitose que evita danificar a membrana plasmática das células. Este também evita a perda do conteúdo celular vital com a toxicidade associada. O Endo-Porter não requer interação com a carga a ser entregue o que permite que a carga endocitada saia do endossoma e entre no citosol (Summerton, et al., 2009). (Figura 2.5)

No interior das células, os morfolino são direcionados ao RNA de interesse por meio de emparelhamento de bases complementares. A localização no RNA onde o morfolino híbrida determina o seu mecanismo de ação específico reduzindo a expressão de proteínas-alvo funcionais. (Reissner, Sartor, & Vazey, 2012)

A ação do morfolino afeta essencialmente a expressão proteica que, como sabemos, nos eucariotas, o pré-mRNA é transcrito no núcleo, eliminando-se os intrões e posteriormente o mRNA maduro é transportado para o citoplasma associando-se aos ribossomas. Para a tradução do mRNA, a subunidade menor do ribossoma liga-se à extremidade 5' do mRNA à qual se ligam vários fatores de iniciação, formando o complexo de iniciação. Este complexo ao encontrar o codão de iniciação, permite a junção da subunidade maior do ribossoma iniciando a tradução do mRNA e a produção da proteína correspondente. (Milo, 2013) (Reece, et al., 2011)

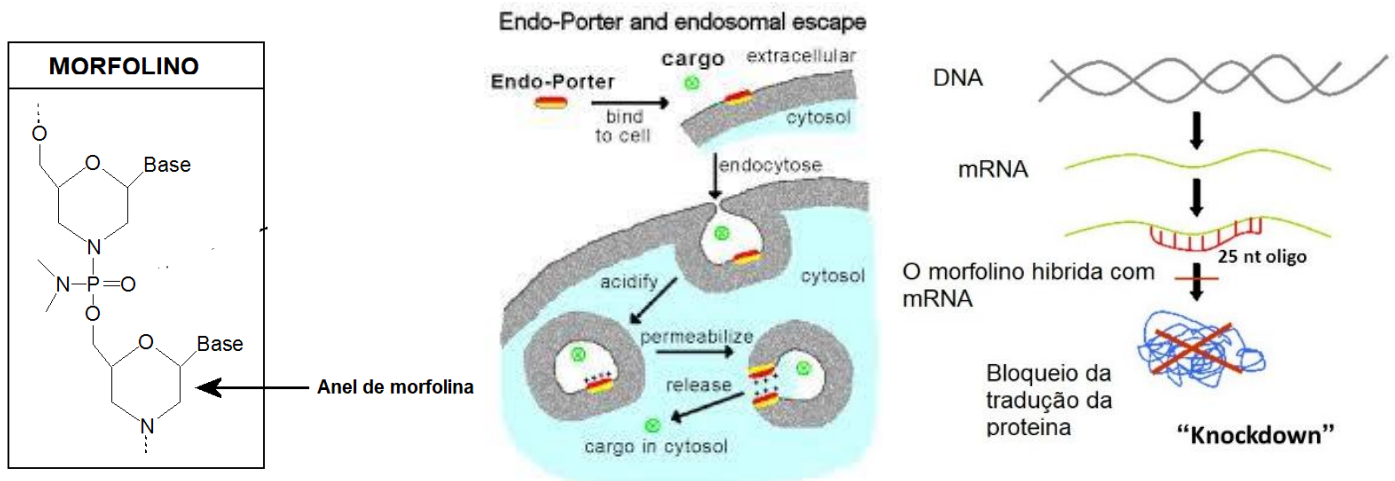


Figura 2.5 Morfolino: (Esq) Estrutura molecular do morfolino- de notar o anel de morfolina; (Cen) Mecanismo de entrada por Endo-Porter: formação de vesícula e entrada na célula por endocitose, acidificação da vesícula, permeabilização e liberação do cargo (Dir) Mecanismo de ação do morfolino na célula- o morfolino híbrida com o mRNA bloqueando assim a tradução da proteína (fonte: <https://www.gene-tools.com/>; Acesso em Junho 2020)

O morfolino pode modificar o splicing ou bloquear a tradução, dependendo da sua sequência de bases. No que respeita ao bloqueio da tradução, o morfolino irá ligar-se à região 5'UTR de um mRNA podendo interferir com o complexo de iniciação ribossômica desde o cap 5' do mRNA até ao codão de iniciação. Isto vai impedir a tradução da região codificante do transcrito alvo levando ao knockdown da expressão genética. Alguns morfolino bloqueiam a expressão proteica tão completamente que chegam a ser indetetáveis por Western Blot (Stancheva, Collins, & Van den Veyver, 2003).

Por terem esqueletos moleculares completamente artificias, os morfolino não são reconhecidos pelas proteínas celulares, as nucleases não os degradam nem são degradados no soro ou células. Como não ativam recetores do tipo Toll, não ativam resposta imunitária como a indução de interferão ou resposta mediada por NF-KB (Stancheva, Collins, & Van den Veyver, 2003).

III- Objetivos

3.1- Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto é a determinação da eficácia de um morfolino (MO) contra mTOR na sobrevivência e proliferação de células de cancro gástrico.

3.2- Objetivos Específicos

1. Desenho de um morfolino específico para o mRNA do mTOR;
2. Otimização de crescimento de linhas celulares de cancro gástrico para inoculação de morfolino contra mTOR;
3. Realização de estudo de proliferação celular e contagem celular com Azul de Tripano;
4. Planear e descrever a avaliação da eficácia da inibição de mTOR pelo morfolino na diminuição da via de sinalização mTOR em linhas celulares de cancro gástrico; *
5. Prever o efeito do morfolino específico contra mTOR na sobrevivência e proliferação em linhas celulares de cancro gástrico. *

*Os objetivos específicos 4 e 5 foram reavaliados no decorrer da realização do projeto devido à atual crise pela pandemia da Covid-19. Posto isto, estes dois objetivos não serão experimentais, mas sim uma descrição e previsão de resultados conforme a literatura disponível.

Página em branco

IV- Metodologias

Este projeto foi desenhado e planejado tendo um fluxo de trabalho fluido com etapas co dependentes umas das outras como mostra o esquema abaixo. (Figura 4.1)

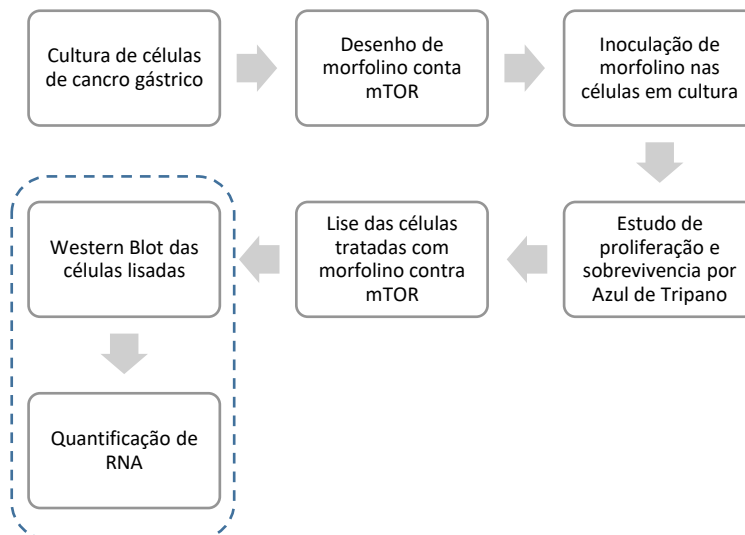


Figura 4.1 Fluxo de trabalho do projeto. De notar que a tracejado se encontram os passos não experimentais, referindo-se, portanto, a metodologias que irão ser descritas, mas sem resultados obtidos

4.1- Cultura Celular

Cultura celular refere-se à remoção de células de animais ou plantas e o seu subsequente crescimento em condições de ambiente artificial favoráveis.

Para este projeto foram utilizadas células GP202 proveniente de carcinoma gástrico primário difuso de uma mulher caucasiana de 53 anos. As células foram obtidas através do Ipatimup, garantindo a esterilidade por microrganismos incluindo Mycoplasma. (Gatner, Machado, & Sobrinho-Simões, 1996).

Estas são células epiteliais aderentes com uma morfologia hexagonal ou em forma de sinete (figura 4.2), foram cultivadas em meio RPMI-1640 com l-glutamina (aminoácido essencial para a proliferação celular) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) e 1% de streptomina e penicilina para inibição de agentes microbianos. Todos os reagentes utilizados foram comprados à empresa *Sigma Aldrich*.

As células foram congeladas antes da sua utilização, sendo que para as cultivar em frascos T15 (volume de 5 mL) ou T75 (volume 15 mL) a ampola foi colocada a 37°C para descongelar rapidamente. Após este passo, as células foram pipetadas em

condições de esterilidade, em camara de fluxo laminar, para frascos com meio de cultura.

As células foram mantidas em condições ideais em estufa com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Em média, a cada 1-2 dias era realizada a troca do meio de cultura e conforme a confluência das células, a posterior passagem das mesmas em dias intercalados. No decorrer da otimização da cultura das células GP202 verificámos que estas apresentam melhores resultados se no dia anterior à passagem para outro frasco, se realizar a mudança de meio.

Para a mudança de meio, conforme o frasco utilizado, retirava-se o meio antigo com pipeta graduada estéril e adicionava-se a quantidade adequada de meio novo (previamente aquecido), caso utilizássemos frascos T15, adicionaríamos 5 mL de meio novo, em contraste, nos frascos T75 seria 15 mL de meio (3x superior).

Para a passagem das células para novo frasco, o meio de cultura antigo era descartado e as células lavadas duas vezes com PBS livre de cálcio/magnésio pré-aquecido. No decorrer da otimização da cultura celular verificamos que este passo é crucial para obtenção de resultados viáveis comparando com a lavagem com tripsina. O PBS ajuda a remover catiões divalentes da adesão de proteínas como as caderinas promovendo um melhor destaque dos frascos de cultura.

Terminada a lavagem com PBS, as células foram tratadas com 1 mL de tripsina (Sigma) e incubadas cerca de 5 minutos a 37°C ou até que seja verificada o destaque das mesmas da parede do frasco de cultura. Após o desprendimento das células da placa por digestão enzimática, a tripsina era inativada por adição de cerca do dobro de meio de cultura novo.

De notar que todos os procedimentos envolvidos na cultura celular estavam sujeitos a condições de esterilidade adequadas.

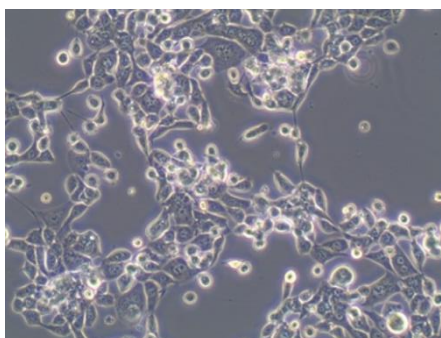


Figura 4.2 Células GP202 24h após descongelamento (10x) – De notar a morfologia hexagonal das células epiteliais (fonte: <https://www.ipatimup.pt/site/ServiceView.aspx?Title=GP202&ServiceId=878>); Acesso Junho 2020

Todas as manipulações foram realizadas em câmara de fluxo laminar previamente sujeita a radiação UV por 30 minutos. Todos os objetos necessários à manipulação na câmara de fluxo laminar eram previamente limpos com álcool a 70% para minimizar o risco de contaminação de microrganismos que pudessem inviabilizar os resultados obtidos.

4.2- Desenho e Inoculação do Morfolino

Para a obtenção de um morfolino, este deve ser complementar ao mTOR de *Homo sapiens* e de *Mus musculus* (para futuros estudos de experimentação animal). Após a comparação das sequências genéticas de ambas as espécies (GenBank) chegou-se à conclusão que a sequência **CCAAGCATCTTGCCCTGAGGTTCCG** possuía 100% de homologia. Contactando a Gene Tools, esta informou que a sequência eleita conseguia inibir a tradução dependente e independente de cap.

Foram aprovados uma série de critérios indicados pela Gene Tools para a melhor eficácia do morfolino que são listados abaixo:

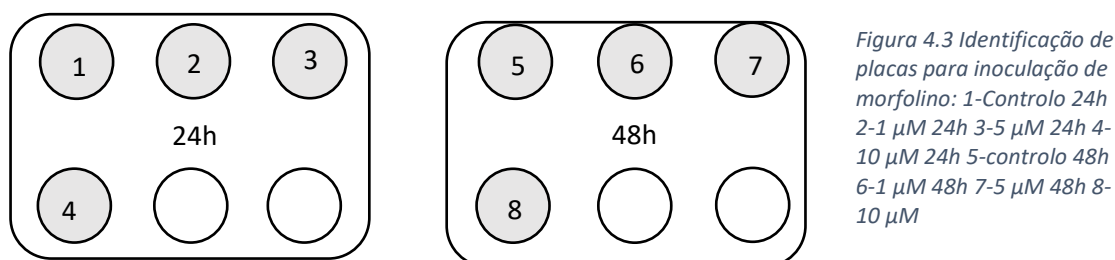
- A sequência deve conter 25 pares de base;
- Deverá existir um elevado número de conteúdo de guanina e citosina (entre 40-60%) – a sequência descrita apresenta 15 guaninas e citosinas obtendo 60% de conteúdo GC na sequência;
- A sequência não deve conter 4 ou mais guaninas seguidas para que permaneçam solúveis em água;
- A sequência deve ter baixa auto-complementariedade.

De notar que todos os critérios foram cumpridos na obtenção da sequência eleita para a elaboração do Vivo-morfolino.

O vivo-morfolino contra mTOR(400 nmol) foi comprado à Gene Tool e este chegou sob a forma liofilizada juntamente com Endo-Porter e Standard Control Oligo (100 nmol).

Para a inoculação do morfolino, foram cultivadas 24h antes células em duas placas 6-well de modo a serem preenchidos 4 pocetos em ambas as placas, assegurando que cada poceto tivesse 400 000 células GP202 (número de células demonstrado como tendo melhores resultados- ver cálculos em Apêndice i.i). Cada placa 6-well correspondeu a um tempo diferente de incubação (24 e 48h- para a comparação de tempo de atuação de MO-mTOR na sobrevivência e proliferação celular) e cada poceto

dos mesmos a uma concentração diferente de morfolino (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M- concentrações recomendadas pela Gene Tools) como demonstrado na figura 4.3.



4.2.1- Plaqueamento em placa 6-well e Contagem Celular

Para o plaqueamento das 400 000 células (número ótimo aferido) em cada poço da placa de 6-well foi necessário proceder à contagem prévia das células em hemocítmetro com azul de tripano (Sigma Aldrich) verificando a viabilidade celular. Para tal, removeu-se o meio dos frascos T75 contendo células GP202 a uma confluência de 80% e procedeu-se ao destacamento das células de acordo com o procedimento de tripsinização anteriormente descrito.

Após o correto destaque das células das paredes do frasco, retirou-se cerca de 100 μ L de células para um tubo eppendorf estéril contendo 100 μ L de azul de tripano.

O método de exclusão do azul de tripano é usado para a determinação de células viáveis presentes numa suspensão celular e é baseada no princípio de que células vivas possuem membranas celulares intactas e excluem corantes, como o azul de tripano.

Passado cerca de 3 minutos de incubação das células com o azul de tripano (nunca exceder os 5 minutos para não aumentar a morte celular), proceder à contagem em hemocítmetro previamente preparado e limpo com álcool a 70%.

O hemocitômetro é levado ao microscópio, permitindo a visualização da malha e dos quadrantes. (figura 4.4)

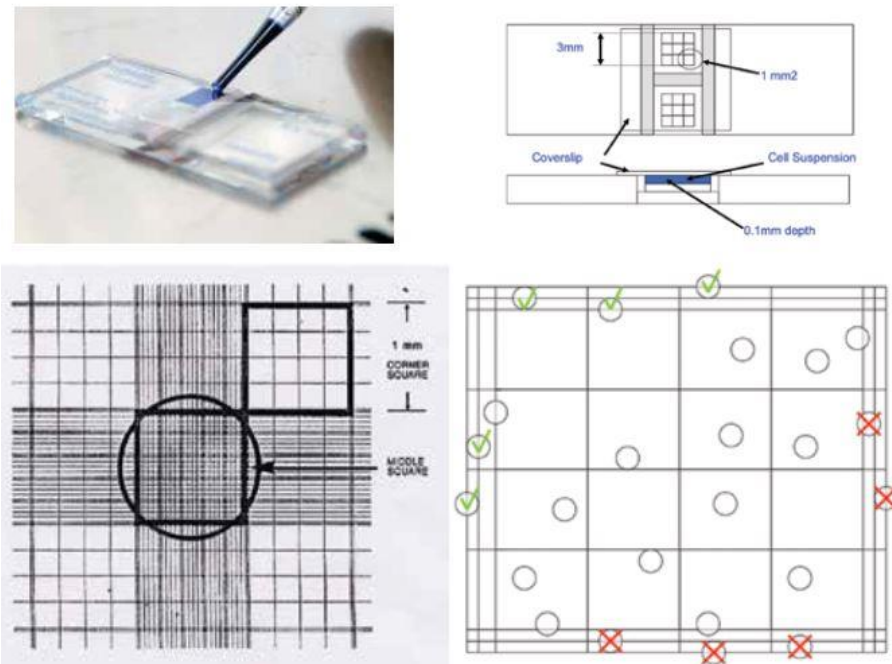


Figura 4.4 Contagem celular em hemocitômetro (fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>); Acesso Junho 2020

São então contados os 4 quadrantes à periferia como mostra a figura 4.4. Para uma contagem mais fidedigna impôs-se como regra a contagem das células que caem no limiar superior e esquerdo, mas não as que se encontram no limiar direito e inferior.

Terminada a contagem em hemocitômetro é calculada a média das células viáveis e procedeu-se ao cálculo de células através da seguinte equação:

$$\text{Contagem celular} = \text{média das células viáveis nas 4 grelhas} \times 10000 \times \text{fator de diluição em azul de tripano}$$

Sendo o fator de diluição 2 (100µL de células + 100µL de azul de tripano)

Após o cálculo de células em 1mL é possível calcular o volume de células a ser pipetado do frasco T75 para cada poço das placas de 6-well para que em cada um deles haja 400 000 células vivo que cada um tem um volume de 2mL. Tomemos como exemplo o seguinte cálculo:

Média de células contada no hemocitômetro: 21.75 células

Aplicando a equação acima apresentada verificamos que existe uma quantidade de 435 000 células/mL.

Se em 1mL obtemos 435 000 células, serão necessários cerca de 0.92 mL de células para obter as 4000 000 células necessárias em cada poço.

4.2.2- Inoculação do Morfolino

A ressuspensão do morfolino foi realizada tendo em conta as indicações da casa comercial (Gene Tool). Como dito anteriormente o morfolino encontrava-se em forma liofilizada pelo que foi necessário a ressuspensão em 800µL de água destilada estéril, para atingir uma concentração de 0.5 mM e agitar bem. Após a ressuspensão foram realizadas 8 alíquotas de 100µL para estudos futuros (guardadas à TA). Também o Standard Control Oligo se encontrava sob a forma liofilizada pelo que também ele se ressuspendeu em 200µL de água destilada estéril, para atingir a concentração de 0.5 mM e fizeram-se 4 alíquotas para estudos futuros (guardadas à TA).

Antes da inoculação do morfolino nas células GP202, estas foram observadas ao MO para garantir que se encontravam a uma confluência de 80-100%. Foi substituído o meio antigo por 2mL de meio novo (RPMI) em cada poço das placas 6-well.

Após agitação do morfolino e do standard controlo oligo, foram inoculados da seguinte maneira:

Tabela 4.1 Esquema demonstrando o volume de morfolino adicionado a cada poço na placa 6-well 1 (24h)

<i>Condição</i>	<i>1µM controlo 24h</i>	<i>1µM MO- mTOR 24h</i>	<i>5µM MO- mTOR 24h</i>	<i>10µM MO- mTOR 24h</i>
<i>Volume Vivo- MO</i>	4µL de standard control	4µL de MO-mTOR	20µL de MO-mTOR	40µL de MO-mTOR

Tabela 4.2 Esquema demonstrando o volume de morfolino adicionado a cada poço na placa 6-well 1 (48h)

Condição	1 μ M controlo 48h	1 μ M MO- mTOR 48h	5 μ M MO- mTOR 48h	10 μ M MO- mTOR 48h
Volume Vivo- MO	4 μ L de standard control	4 μ L de MO- mTOR	20 μ L de MO- mTOR	40 μ L de MO- mTOR

Após agitação devida de cada uma das placas, adicionou-se 12 μ L de Endo-Porter a cada um dos poços.

As placas 1 e 2 foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante 24h e 48h respetivamente.

4.3- Estudo de Proliferação e Lise Celular

Após o tempo de incubação adequado de cada uma das placas (24h e 48h) foi realizado o estudo de proliferação para verificar a viabilidade das células inoculadas com o morfolino. Para tal foram observadas as células ao MO e registada a aparência microscópica de cada uma das placas. Foi realizado o ensaio de proliferação de cada um dos poços através do método de contagem em hemocítmetro através da coloração de azul de tripano como descrito anteriormente.

Após a contagem celular e posterior registo das células viáveis e mortas, transferiram-se as células para um tubo *falcon* de 15 mL devidamente identificado com a concentração de morfolino a trabalhar e centrifugaram-se durante 15 min a 700g.

Após a centrifugação, colocámos os *falcon* em gelo (fora da câmara de fluxo laminar) e retirou-se o sobrenadante deixando apenas o *pellet* formado. O *pellet* foi cuidadosamente lavado com 2mL de PBS 1x agitando levemente em círculos. O PBS foi retirado não perturbando o *pellet* e este foi ressuscitado com 100 μ L de SDS-SB 2x previamente preparado (Ver Anexo 1) fazendo *up and down* vigoroso para libertar todo o *pellet* e lisar eficazmente as células. Retirámos o SDS-SB 2x e colocámos no poço respetivo da placa de 6-well e respámos o conteúdo de forma vigorosa para posterior recolha para tubo *ependorf* estéril devidamente identificado com tempo de incubação/concentração.

Os tubos foram guardados a -20°C para posterior realização de Western Blot no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

4.4- Western Blotting

O Western Blotting é uma técnica usada para a visualização de proteínas que foram separadas por uma eletroforese em gel. O gel está colocado perto de uma membrana de nitrocelulose e uma corrente elétrica faz com que as proteínas migrem do gel para a membrana. Esta membrana pode então ser marcada com anticorpos específicos para os alvos de interesse e visualizados usando anticorpos secundários e reagentes de deteção.

Nos passos anteriores descrevemos a utilização de SDS-SB 2x que é um tampão de lise que vai ajudar no decorrer da técnica de Western Blotting. Esta solução contém vários elementos que dão suporte à técnica como 2-mercaptoetanol que reduz as ligações dissulfeto intra e intermoleculares, o detergente SDS que tem como função a desnaturação de proteínas e dá um impulso da carga negativa generalizada que permite separar as proteínas. O azul de bromofenol serve como corante que permite a visualização durante a inoculação da amostra. Também está na constituição do SDS-SB o glicerol que aumenta a densidade da amostra para que seja mais fácil o depósito no gel. Além destes constituintes foi utilizada benzonase (Tebu-bio) como nuclease para que não houvesse qualquer atividade e contaminação do extrato proteico com ácido nucleico.

Para verificar as consequências da inoculação de um morfolino contra mTOR é necessário verificar a expressão das proteínas envolvidas nesta via de sinalização, assim é pertinente estudar a expressão das proteínas p-4EBP1 (como alvo do complexo mTORC1), mTOR e p-AKT (como alvo do complexo mTORC2).

Importante referir que os procedimentos de Western Blotting descritos neste trabalho são o produto de um estudo de otimização de anticorpos prévio através da utilização de uma amostra normal (sem tratamento), reunindo as condições ótimas para se proceder a esta metodologia. A otimização das condições focou-se na variação do agente de bloqueio e do tampão de incubação do anticorpo primário.

Para tal foi realizada uma corrida de acordo com as condições descritas anteriormente no trabalho, incubando os poços do gel da seguinte maneira:

Tabela 4.3 Condições para otimização de resultados Western Blot

Poço 1	Poço 2	Poço 3 (cortar a meio)	Poço 4	Poço 5
mTOR 245 kDa TBST milk 1:200	mTOR 245 kDa TBST milk 1:500	marcador	p-Akt1 60 kDa TBST milk 1:200	p-Akt1 60 kDa TBST milk 1:500
GADPH: 37 kDa			GADPH: 37 kDa	

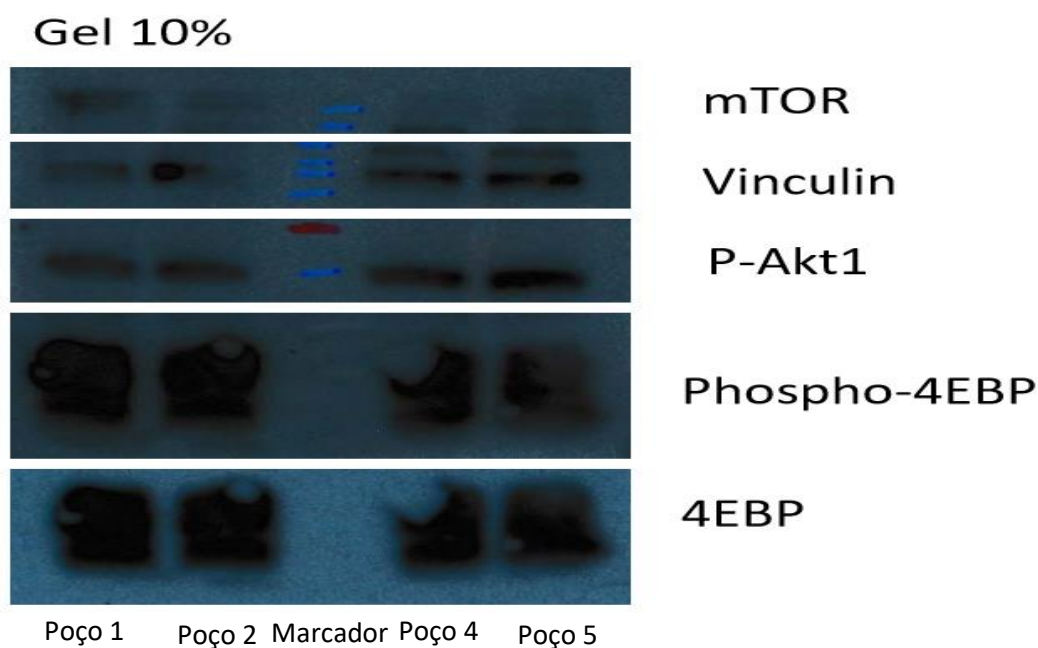


Figura 4.5 Resultado Western Blot (SDS-PAGE) para otimização das condições da experiência. (fonte: imagem obtida pela equipa)

Tabela 4.4 Condições de otimização de Western Blot- concentração de anticorpo

Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5
marcador	α tubulina 55kDa			
	p4EBP 15-20kDa <u>TBST BSA</u> 0.1 µg/mL (concentração do anticorpo é 0.5 mg/ml)	p4EBP 15-20kDa <u>TBST BSA</u> 1 µg/mL (concentração do anticorpo é 0.5 mg/ml)	p4EBP 15-20kDa <u>PBSTween M</u> 0.1 µg/mL (concentração do anticorpo é 0.5 mg/ml)	p4EBP 15-20kDa <u>PBSTween M</u> 1 µg/mL (concentração do anticorpo é 0.5 mg/ml)

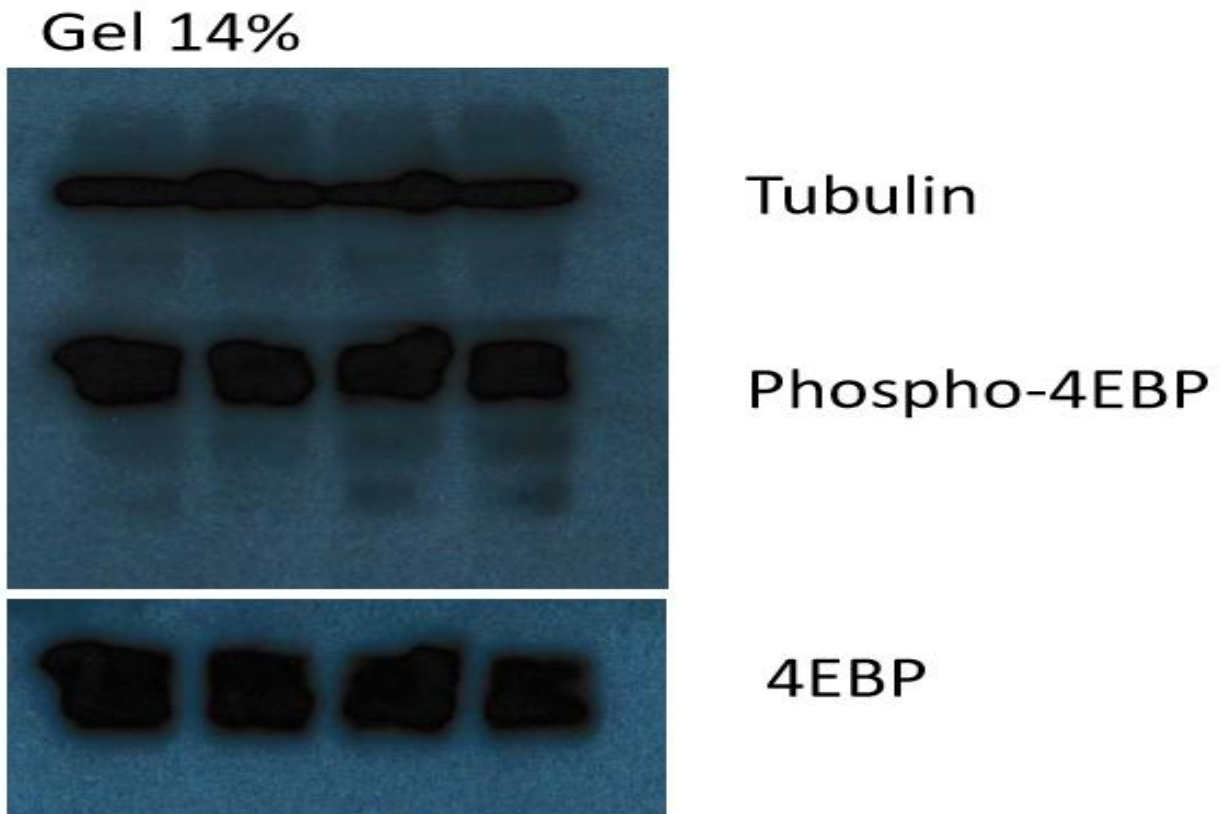


Figura 4.6 Resultados da otimização de Western Blot (SDS-PAGE) (fonte: imagem obtida pela equipa)

De acordo com os resultados obtidos da otimização de anticorpo primário, optámos pela diluição de anticorpo **1:200** em TBST milk no caso de mTOR e p-AKT pois são talvez os mais favoráveis quando comparados com uma diluição 1:500 (figura 4.5).

Já os resultados de p-4EBP mostram-se muito idênticos podendo incubar o anticorpo com uma concentração de **0.1 µg/mL ou 1 µg/mL** (figura 4.6).

Só após os resultados da otimização da técnica de Western Blot estarem concluídos delineamos o protocolo final para a execução das experiências.

4.4.1- Western Blot para p-4EBP1

Após a preparação do gel de acrilamida (a 15%) e instalação apropriada da cassete de corrida para a eletroforese, preencher com tampão de corrida.

Inocular os poços do gel da seguinte forma:

Tabela 4.1 Western Blot para p-4EBP1

Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9
7µL de marcador	15 µL de amostra C24	15 µL de amostra 1M24	15 µL de amostra 5M24	15 µL de amostra 10M24	15 µL de amostra C48	15 µL de amostra 1M48	15 µL de amostra 5M48	15 µL de amostra 10M48

Correr o gel 1:30h a 20 mA e voltagem constante, em gelo até que o bromofenol atinja o fim do gel.

Após a corrida, preparar a montagem da “sandwich” para a transferência cortando a membrana PDVF nas dimensões do gel e dois papeis Whatmann de 3mm do mesmo tamanho. Passar a membrana por metanol ou isopropanol cerca de 1-2 minutos e depois por água (10 minutos) antes do uso (diferença para membrana de nitrocelulose).

Umedecer a superfície da plataforma inferior do aparelho transferidor com tampão de transferência assim como os papeis Whatmann. Montar o aparelho de transferência de forma adequada não se formando bolhas entre o gel e a membrana sendo fulcral que a membrana fique do lado do eletrodo positivo e o gel do negativo. Correr 1h a 100 V, sendo que a intensidade de corrente deve ser entre 200 e 220 mA. Após a corrida, bloquear a membrana com TBST BSA (40mL TBS-0.05% Triton X-100+ 2.5g BSA) ou PBSTween M (PBS-0.1% Tween 5% w/v leite) durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação e de seguida lavar com TBST(TBS-0.05% Triton X-100). Proceder à incubação do anticorpo primário monoclonal rabbit anti- p-4EBP1 (Werfen) diluído em TBST BSA ou PBSTween M durante 1 hora, com as seguintes condições de anticorpo: 0.1µg/mL ou 1µg/mL. Incubar com anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG (Bio Rad) conjugado com peroxidase e revelar membrana.

Realização do stripping da membrana:

Ativar a membrana com metanol ou água bidestilada. Colocar 5 minutos em NaOH 0.25M(12mL) e lavar 3x com água bidestilada ou TBST. Realizar o bloqueio da membrana com TBST BSA (40mL TBST+2.5g BSA) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, incubar com anticorpo primário Ac rabbit anti-4EBP1(Werfen) durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavar com TBST 1x durante 10 minutos e incubar o anticorpo secundário Ac goat anti-rabbit IgG (Bio Rad) conjugada com peroxidase durante 1 hora à temperatura ambiente e revelar.

4.4.2-Western Blot para mTOR e p-AKT

Após a preparação do gel de acrilamida (a 15%) e instalação apropriada da cassete de corrida para a eletroforese, preencher com tampão de corrida.

Inocular os poços do gel da seguinte forma:

Tabela 4.2 Western Blot para mTOR e p-AKT

Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9
7µL de marcador	15 µL de amostra C24	15 µL de amostra 1M24	15 µL de amostra 5M24	15 µL de amostra 10M24	15 µL de amostra C48	15 µL de amostra 1M48	15 µL de amostra 5M48	15 µL de amostra 10M48

Como *loading control* para mTOR (245Kda) e p-AKT (60 Kda) utilizar GADPH (37 Kda).

Correr o gel 1h a 20 mA e voltagem constante, em gelo até que o bromofenol atinja o fim do gel. Após a corrida, preparar a montagem da “sandwich” para a transferência cortando a membrana PDVF nas dimensões do gel e dois papeis Whatmann de 3mm do mesmo tamanho. Passar a membrana por metanol ou isopropanol cerca de 1-2 minutos e depois por água (10 minutos) antes do uso (diferença para membrana de nitrocelulose).

Umedecer a superfície da plataforma inferior do aparelho transferidor com tampão de transferência assim como os papeis Whatmann.

Montar o aparelho de transferência de forma adequada não se formando bolhas entre o gel e a membrana sendo fulcral que a membrana fique do lado do elétrodo positivo e o gel do negativo. Correr 1h a 100 V, sendo que a intensidade de corrente deve ser entre 200 e 220 mA. Após a corrida, bloquear a membrana com TBST BSA (40mL TBS-0.05% TritonX-100 + 2.5g BSA) ou PBSTween M (PBS-0.1% Tween 5% w/v leite) durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação e de seguida lavar com TBST (TBS-0.05% Triton X-100). Proceder à incubação do anticorpo primário monoclonal mouse anti-mTOR (Werfen) e rabbit anti-p-AKT (Werfen) diluídos em TBST BSA ou PBSTween M (1:200) durante 1 hora. Incubar com anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG (Bio Rad) para o caso de p-AKT e goat anti-mouse IgG (Bio Rad) para mTOR ambos conjugados com peroxidase e revelar membrana.

4.5 – Purificação e Quantificação de mRNA por Real-Time PCR

Para a quantificação de mRNA de mTOR presente nas amostras após inoculação de morfolino recorreremos a qPCR ou PCR em tempo real. Esta metodologia permite-nos verificar a quantidade de mRNA existente que posteriormente será traduzido numa sequência proteica.

A PCR em tempo real é uma variação da técnica de PCR, a qual permite que a amplificação e deteção ocorram em simultâneo. Como resultado é visualizado em tempo real durante a amplificação da sequência de interesse, com capacidade de gerar resultados quantitativos com maior precisão.

Para a purificação do mRNA usaremos o kit de purificação da Nzytech e o protocolo de purificação será levado a cabo recorrendo às instruções do fabricante. (Figura 4.7)

As células em cultura devem ser tripsinizadas e coleadas para um *falcon* de 15mL que será centrifugado a 6000g por 5min a 4°C formando assim um *pellet*. O sobrenadante é descartado e adicionado 350µL de tampão NR e 3.5µL de β-mercaptoetanol para desnaturar as Rnases presentes.

O lisado será colocado numa coluna de homogeneização acoplada a um tubo coletor de 2mL e centrifugado 1 minuto a 11000g. O conteúdo é transferido para um novo tubo de microcentrifuga e é adicionado 350µL de etanol a 70% para a desnaturação das proteínas homogeneizando bem com a pipeta. O lisado será pipetado para uma nova coluna e centrifugada a 11000g durante 30 segundos. Descartar o produto e adicionar

a coluna a um novo tubo coletor. Adicionar 350µL de tampão NI e centrifugar a 11000g por 30 segundos. Descartar o produto e adicionar um novo tubo coletor.

Será depois adicionado na coluna 95µL de mistura de digestão e incubada à TA por 15 minutos. Após a incubação é adicionado 200µL de tampão NWR1 e centrifugar a 11000g por 1 min. O produto é descartado, adicionada novo tubo coletor e 600µL de tampão NWR2 (previamente adicionado álcool absoluto) e repetir a centrifugação. Adicionar novamente 240µ de tampão NWR2 repetindo a centrifugação anterior descartando depois o produto. Por fim a coluna é colocada num tubo novo e adicionado 40-60µL de água livre de Rnases, centrifugar 1 minuto a 11000g e armazenar o eluído a -20°C.

O RNA será reversamente transcrito através da transcriptase reversa e o novo cDNA será subsequentemente amplificado por PCR usando a Master mix Brilliant II Ultra-Fast SYBR Green qPCR de acordo com as recomendações da casa comercial na plataforma LightCycler 2.0 (Roche).

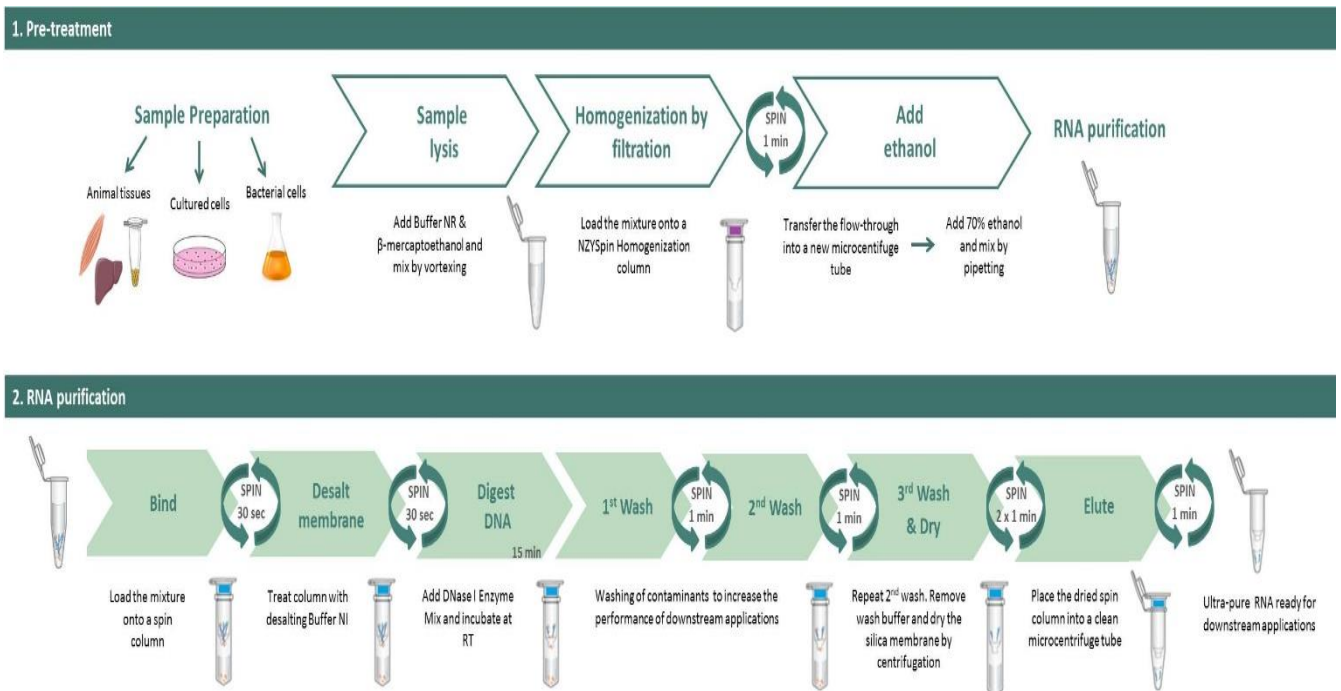


Figura 4.5 Sequência de tratamento para purificação de RNA de acordo com o protocolo da NZYTech (fonte: <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/real-time-pcr/one-step-rt-qpcr-kits/mb349/>) Acesso Junho 2020

Serão usados os *housekeeping* genes GAPDH e ACTB como controlos normalizados. Os primers para mTOR (STAB Vida) utilizados serão testados para a determinação da sua concentração ótima para análise de PCR. Por último a eficácia da reação da PCR em tempo real será calculada através de curvas standard.

Página em branco

V- Resultados

5.1- Resultados do Ensaio de Proliferação e Sobrevivência

A viabilidade celular após o tratamento com um morfolino contra mTOR foi avaliada através de um estudo proliferativo pelo método de azul de tripano em hemocítmetro.

A inoculação do morfolino foi realizada em várias concentrações diferentes recomendadas pela Gene Tools e tempos de incubação distintos para verificar os efeitos do morfolino na célula, uma vez que o tempo de semi-vida da proteína mTOR é de 18h, estipulámos as 24h e 48h para verificar os resultados.

Através da obtenção da quantidade celular (viva e morta) pela equação de contagem celular verificamos os seguintes resultados:

Tabela 5.1 Resultados de estudo de proliferação- 24h

	<i>Standard Control</i>	<i>1µM/24h Morfolino</i>	<i>5µM/24h Morfolino</i>	<i>10µM/24h Morfolino</i>
<i>Células vivas</i>	665500 cel/mL	200000 cel/mL	305000 cel/mL	295000 cel/mL
<i>Células mortas</i>	130 000 cel/mL	95000 cel/mL	140000 cel/mL	90000 cel/mL
<i>% células vivas</i>	83.6%	67.80%	68.5%	76.6%
<i>% células mortas</i>	16.4%	32.2%	31.5%	23.8%

Tabela 5.2 Resultados de estudo de proliferação- 48h

	<i>Standard Control</i>	<i>1µM/48h Morfolino</i>	<i>5µM/48h Morfolino</i>	<i>10µM/48h Morfolino</i>
<i>Células vivas</i>	190000 cel/mL	345000 cel/mL	70000 cel/mL	200000 cel/mL
<i>Células mortas</i>	20000 cel/mL	110000 cel/mL	140000 cel/mL	100000 cel/mL
<i>% células vivas</i>	90.5%	75.80%	33.3%	66.7%
<i>% células mortas</i>	9.5%	24.2%	66.7%	33.3%

Analisando os resultados obtidos nas células incubadas com morfolino durante 24 horas verificamos que, quando comparadas com o controlo, todas as células com concentrações diferentes de morfolino têm um maior número de células mortas, podendo ser um indicador do resultado favorável da inibição da via de sinalização mTOR. No entanto e apesar das diferenças serem muito ligeiras, ao aumentar a concentração de morfolino, menor é a quantidade de células mortas observadas. Esta diferença poderá ser explicada pela má homogeneização das células ao inocular o morfolino que pode limitar a ação do Endo-Porter para a entrada do morfolino na célula.

Outras explicações para estes resultados podem também prender-se no erro associado à observação das células ao microscópio ótico pelo operador, contabilizando falsamente certos tipos de células. Para contornar este erro é necessário uma troca contínua das pessoas a observar as células para que não haja erros tendenciosos por parte de uma única pessoa. É de salientar que os resultados obtidos são preliminares pois só foram realizados uma única vez, ao invés das três vezes estipuladas para retirar conclusões fidedignas.

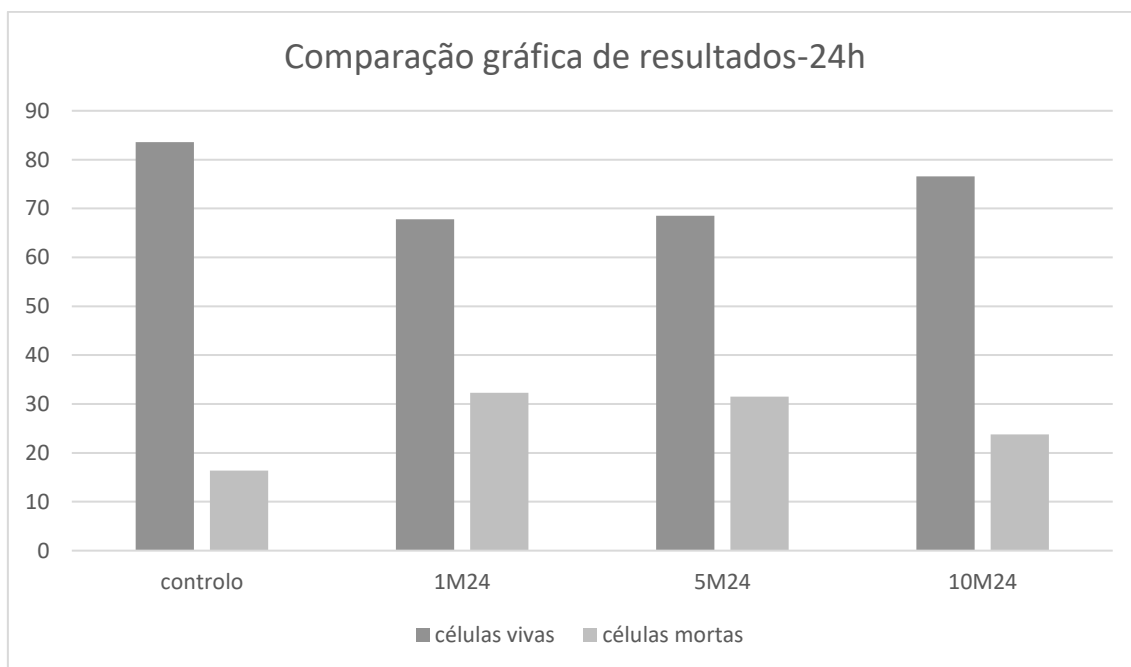


Figura 5.1 Representação gráfica de resultados-24h (1M24: morfolino 1 μ M/24h; 5M24: morfolino 5 μ M/24h; 10M24: morfolino 10 μ M/24h)

Verifica-se assim que em 24 horas de incubação com morfolino, as células inoculadas com 1 μ M de morfolino apresentam resultados mais satisfatórios.

Analisando em contraste os resultados obtidos pela inoculação de morfolino em 48 horas de incubação verifica-se mais uma vez que quando comparado com o controlo, todas as concentrações obtiveram maiores resultados de células mortas, comprovando mais uma vez que o morfolino contra mTOR pode ter surtido efeito na célula.

Ao verificar mais atentamente estes resultados deparamo-nos com um aumento significativo das células mortas quando inoculadas células com 5 μ M de morfolino por 48h. Cerca de 66.7% do total de células contadas no hemocitómetro encontravam-se mortas. No entanto a concentração seguinte sofreu um inverso, tendo sido verificadas cerca de 33.3% das células totais mortas. Mais uma vez este fenómeno pode ser explicado através da pobre homogeneização das células durante a inoculação do morfolino e Endo-Porter, tendo apenas uma parte parcial do morfolino ter entrado na célula. Outra explicação prende-se na provável má pipetagem dos inibidores nos poços da placa 6-well que pode provocar erros aleatórios como se verifica aqui.

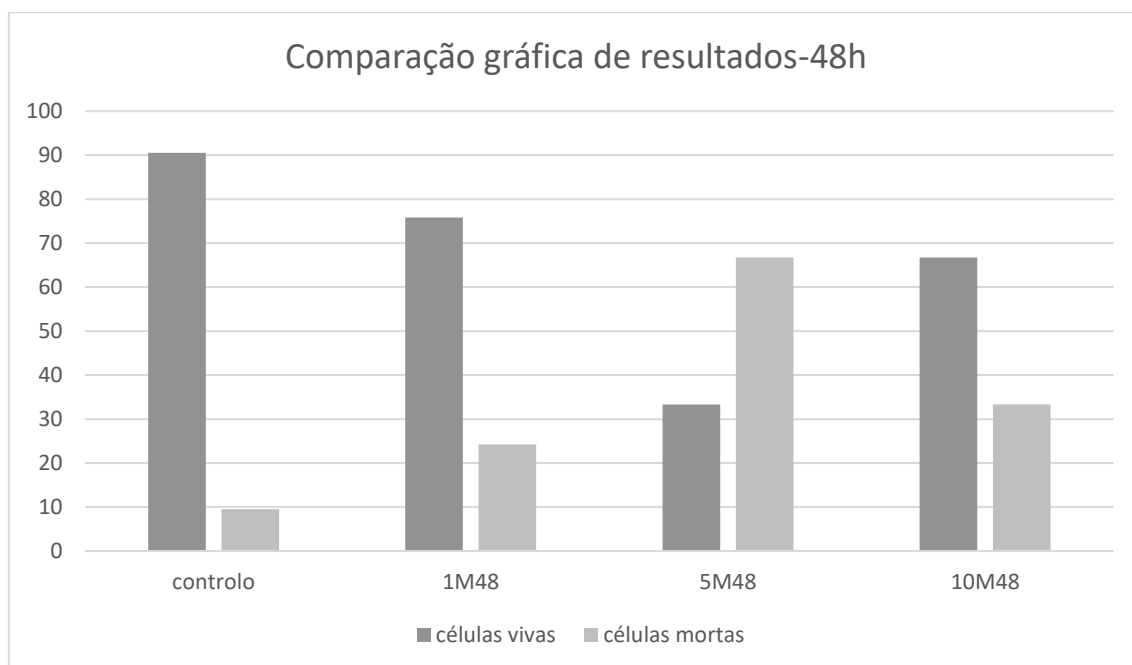


Figura 5.2 Representação gráfica de resultados-48h (1M48: morfolino 1 μ M/48h; 5M48: morfolino 5 μ M/48h; 10M48: morfolino 10 μ M/48h)

Quando comparados os resultados máximos de células mortas obtidas de ambos os tempos de incubação verifica-se que a incubação de células com morfolino por 48 horas obtém uma maior percentagem de células mortas (66.7%- 5 μ M de morfolino) em comparação com as células incubadas 24 horas com morfolino (32.2%- 1 μ M de morfolino).

De um modo geral também a proliferação celular diminuiu, quando comparada com o controlo em ambas as concentrações incubadas 24 horas, o que é um bom indicador de que o ciclo celular possa ter sido interrompido. No entanto o controlo de 48 horas possui pouquíssimas células o que não pode ser considerado como um indicador da fraca proliferação, mas sim talvez um erro no processo de destaque das células pela tripsina. Podemos justificar isto pelo facto deste ter uma confluência de cerca de 80% antes do início da técnica nesse dia pelo que muito provavelmente estamos perante um erro de técnica. Outro dado que pode justificar este erro é o facto de não haver grandes diferenças entre a quantidade celular das células inoculadas em ambos os tempos de incubação, pelo que o fenómeno da quantidade de células do controlo 48h é isolado.

No que toca à morfologia das células observada em microscópio ótico verificou-se uma diminuição geral da célula, que pode ser entendida como mecanismo de agragação dos componentes celulares no processo apoptótico.



Figura 5.3 Imagens de células observadas ao microscópio ótico (40x) às 48h de incubação com 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M respetivamente (fonte: imagens retiradas pela equipa) Recorrendo ao programa Image J verificamos que 1cm na imagem equivalem a 4.02 nm na realidade

Também os núcleos das células sofreram alterações, nomeadamente às 48 horas de incubação com morfolino, obtendo um aspeto fragmentado, podendo estar ligado a processos de cariorréxis derivado novamente do fenómeno de apoptose.

5.2- Resultados Esperados da Expressão do mTOR e Ativação de mTORC1 e mTORC2

Apesar de não termos acesso a resultados dos Western Blot devido à sua não execução podemos esperar que a ação do Vivo-Morfolino diminua a expressão de mTOR assim como a fosforilação de AKT (alvo do complexo mTORC1) e a fosforilação de 4EBP1 (alvo do complexo mTORC2).

Os resultados de mTOR deveriam ser avaliados pela comparação da intensidade das bandas de mTOR, normalizadas a GADPH (controlo de loading) com a intensidade das bandas de Standard Control 24h e 48h. Aqui devemos esperar uma diminuição da intensidade das bandas de mTOR.

Já os resultados de p-AKT também eles se esperam com bandas de intensidade diminuída quando comparado com as bandas de Standard Control 24h e 48h.

No que toca à intensidade das bandas de p-4EBP1 (normalizadas a α -tubulina) espera-se mais uma vez uma intensidade menor, quando comparada com os controlos significando que a fosforilação diminuiu na presença do morfolino.

Por vezes não se consegue verificar apenas com o p-4EBP1 se realmente houve uma diminuição, sendo necessário comparar com 4EBP1 total pois o anticorpo p-4EBP1 apenas deteta as isoformas fosforiladas ao invés do 4EBP1 que deteta as isoformas não-fosforiladas. Posto isto será pertinente realizar o stripping da membrana, ou seja, retirar o anticorpo anti p-4EBP1 e substituí-lo pelo anticorpo anti-4EBP1 total na mesma membrana.

Como os resultados dos Western Blots podem ser de difícil interpretação visual pois existem diferenças muito subtis que impedem o olho humano de as reconhecer, devemos recorrer a programas de processamento de imagem, como o Image J para nos ajudar na sua quantificação.

5.3- Resultados Esperados da Quantificação do mRNA de mTOR

Quanto à quantidade de mRNA de mTOR existente, espera-se que como o morfolino se liga à região 5'UTR de um mRNA, este vai interferir com o complexo de iniciação ribossômica podendo a quantidade de mRNA permanecer inalterada e apenas haver um efeito na tradução desse mRNA. Se isto se verificar quer então dizer que o morfolino conseguiu parar a etapa da expressão gênica havendo um *knockdown* do gene.

A comparação de resultados da quantidade de mRNA obtido e expressão proteica será necessária para a verificação dos efeitos do morfolino contra mTOR na quantidade de mRNA presente, pois o objetivo da quantificação do mRNA é a confirmação de que apenas a tradução está a ser alterada. Com esta metodologia é passível de se verificar que não há interferência de destabilização do mRNA tanto na sua produção como na sua estabilidade.

VI- Discussão

O mTOR tem um papel preponderante no desenvolvimento de cancro e doenças metabólicas nomeadamente diabetes e obesidade.

A sobreexpressão de proteínas reguladoras da via mTOR é reportada em diversos tipos de cancro, e esta realidade instiga a pesquisa e o desenvolvimento de terapias antineoplásicas que tenham por alvo a proteína mTOR. Este trabalho segue essa tendência, ao propor a investigação dos efeitos biológicos de um morfolino contra mTOR em linhas celulares de cancro gástrico.

Múltiplas vias de sinalização foram ligadas ao desenvolvimento de cancro gástrico e entre elas verificou-se a PI3K/AKT/mTOR que é crítica na regulação de várias funções, maioritariamente na regulação de proteínas que levam à proliferação e à diminuição de reguladores negativos de tradução da progressão do ciclo celular. (Hay & Sonenberg, 2004) (Yap, Garrett, Watson, & Raynaud, 2008) (Yang & Guan, 2007)

Em situação de formação tumoral existe um padrão comum, verificando-se um aumento na sinalização de PI3K/AKT e por consequente também o aumento da atividade do complexo mTORC1. Em contraste verifica-se uma diminuição na atividade de feedback entre P70S6K1 e o complexo mTORC2. Todos estes eventos induzem processos descontrolados de aumento do metabolismo, angiogénese e aumento da biogénese ribossomal que leva a um crescimento celular, proliferação, autofagia entre outros que ajudam na formação do cancro. (Matsuoka & Yashiro, 2014) (Greenfield & Jones, 2013)

Estudos anteriores envolvendo os principais alvos da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e os níveis de expressão das suas proteínas medidos em técnicas imunohistoquímica (IHQ) em tecidos de cancro gástrico e tecidos normais, mostraram que os níveis de PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR, P70S6K1, 4EBP1, p-EBP1, eIF4E e p-eIF4e estão geralmente elevados em amostras tumorais quando comparadas com amostras normais. (Matsuoka & Yashiro, 2014) Em contraste, níveis proteicos de PTEN encontram-se diminuídos em tumores gástricos. (Tapia, et al., 2014)

Estes resultados estão associados com as características patológicas do doente como metáteses (PI3K), baixa sobrevivência (p-AKT), patogénese e progressão (m-TOR e p-P70S6K1), entre outras.

Em linhas celulares de cancro gástrico ACG e MKN28, verificaram-se níveis significativamente mais elevados da expressão genética de AKT, mTOR e eIF-4E e níveis significativamente mais baixos de PTEN. (Tapia, et al., 2014)

Para nosso conhecimento não existem estudos acerca do bloqueio da via de sinalização mTOR através da incubação de um morfolino. Apesar de não haver resultados de western blot e quantificação de mRNA devido à pandemia por Covid-19, os resultados dos ensaios de proliferação mostram uma tendência na diminuição da proliferação celular assim como aumento da morte celular após a inoculação do morfolino. Não conseguindo tecer uma evidencia científica que o morfolino contra mTOR funciona como um bloqueador desta via de sinalização devido à falta de resultados, é notável uma alteração fenotípica na morfologia da célula cancerígena ao ser inoculada com um morfolino tendo sido alterada a sua forma, diminuindo de tamanho e apresentando fragmentação celular indicando evidencias visuais de morte celular o que vai de encontro com os resultados esperado.

É necessário a repetição dos ensaios de proliferação corrigindo alguns erros de manipulação para uma melhoria dos resultados obtidos diminuindo os fenómenos aleatórios que podem causar entropia na conclusão de resultados. Além disso é imprescindível a realização dos ensaios de Western Blot e quantificação de mRNA presente para se comprovar que in vitro o morfolino contra mTOR diminui a expressão de proteínas alvo desta via de sinalização.

Caso se verifique, seria interessante a inoculação de morfolino contra mTOR em modelos animais induzidos com cancro gástrico para verificar as alterações fenotípicas nomeadamente da alteração do tumor na mucosa gástrica e posteriormente a realização de estudos de imunohistoquímicos para verificar se os resultados obtidos vão ao encontro dos resultados de experiências deste tipo.

Os paradigmas de tratamento com inibidores do mTOR para cancro gástrico parecem bastante promissores como o temsirolimus e o everolimus (ambos aprovados para tratamento de cancro de células renais), no entanto trabalho adicional deve ser desenvolvido para a otimização da terapêutica e determinar biomarcadores preditivos do sucesso da terapia. (Al-Batran, Ducreux, & Ohtsu, 2012)

Uma seleção de pacientes com base em eventos moleculares devidamente caracterizados como sendo associados à via mTOR, tal como a sobreexpressão de PI3K/AKT, HER2 e IGFR, bem como mutações no PI3K e AKT ou baixa regulação de PTEN pode apresentar uma maneira apropriada de identificar populações com maior probabilidade de mostrar benefícios significativos quando tratadas com inibidores de

mTOR. Outro aspeto importante seria saber qual o componente a jusante de p70S6K que ativa a tradução do mRNA fundamental na estimulação do crescimento celular. (Hay & Sonenberg, 2004)

Um melhor entendimento desta via de sinalização poderá levar ao desenvolvimento de fármacos para tratar a patologia oncológica, quiçá baseando-se na ação do morfolino contra mTOR. O sucesso da rapamicina e dos seus análogos em ensaios clínicos para o tratamento de cancro demonstra bem o potencial do tratamento que existe associado a esta via.

São vários os estudos futuros passíveis de se projetar nesta área devido à constante nova informação que vamos recebendo. Sendo este tema tão amplo podemos albergar várias áreas de interesse, como por exemplo a área da microbiologia médica em que seria extremamente interessante a associação da via mTOR sobreexpressa em doentes com cancro gástrico com a microbiota humana nomeadamente com a quantidade de probióticos e pré-bióticos existentes. Estando o *Streptomyces hygroscopicus* (produtor natural de rapamicina) presente no microbioma entérico humano, seria possível uma correlação entre disbiose por falta deste microrganismo e aumento da expressão de mTOR? (Bolourian & Mojtahedi, 2018)

O futuro o dirá, no entanto, uma coisa podemos concluir, passos largos estão a ser dados no caminho para encontrar formas de terapia oncológica mais dirigida, minimizando assim a mortalidade por esta doença.

Página em branco

VII- Conclusão

Diante dos objetivos propostos é possível observar que a via de sinalização mTOR é essencial no processo neoplásico.

Os resultados preliminares obtidos do tratamento de células de cancro gástrico com um morfolino contra mTOR sugerem um aumento da morte celular quando comparadas com uma população controlo. Estas evidências vão ao encontro de estudos anteriores que afirmam que o mTOR tem um papel central na proliferação e sobrevivência celular.

Também a morfologia celular se apresentou alterada mostrando diminuições no aspeto ficando mais arredondadas ao invés da sua forma hexagonal. Houve evidências da presença de cariorrexe em células tratadas com morfolino e incubadas durante 48h, verificando uma fragmentação destrutiva do núcleo, o que pode ser resultado da picnose celular pela falta de fatores de crescimento. Mais uma vez estas observações sugerem que a via mTOR foi perturbada.

De forma geral, este trabalho permitiu reunir uma série de conclusões de estudos anteriores que demonstraram que a via mTOR estão associados ao processo oncogénico e que níveis aumentados de fosforilação de mTOR, AKT e 4EBP1 podem estar relacionados com a agressividade e prognóstico da doença.

A continuação deste projeto na qual se deverão realizar as etapas experimentais em falta, nomeadamente Western Blot das proteínas e quantificação de mRNA, deverão ajudar melhor a tecer uma conclusão mais sólida da ação de um morfolino contra mTOR em linhagem celular de cancro gástrico.

VIII- Referencias Bibliográficas

- Al-Batran, S., Ducreux, M., & Ohtsu, A. (2012). mTOR as therapeutic target in patients with gastric cancer. pp. 491-496.
- Al-Batran, S.-E., Ducreux, M., & Ohtsu, A. (Agosto de 2012). mTOR as a therapeutic target in patients with gastric cancer. pp. 491-496.
- Ames, B., Gold, L., & Willett, W. (1995). The causes and prevention of cancer. pp. 5258-5265.
- Bernstein, S., & Weinberg, R. (1985). Expression of the metastatic phenotype in cells transfected with human metastatic tumor DNA. pp. 1726-1730.
- Bishop, J. (1987). The molecular genetics of cancer. pp. 305-311.
- Bolourian, A., & Mojtahedi, Z. (2018). Immunosuppressants produced by Streptomyces: evolution, hygiene hypothesis, tumor rapalog resistance and probiotics. pp. 123-126.
- Cejka, D., Preusser, M., Feureder, T., Sieghart, W., Werzowa, J., Stommer, S., & Wacheck, V. (2008). mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy in vivo. pp. 18-20.
- Chung, J., Kuo, C., Crabtree, G., & Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 Kinases. pp. 1227-1236.
- Ciuffreda, L., Sanza, C., Desideri, M., & Ricciardi, M. (2010). Effect of a novel cross-talk mechanism of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in melanoma. pp. 8574-8574.
- Cohen, S., & Ellwein, L. (1990). Cell proliferation in carcinogenesis. pp. 1007-1011.
- Corlot, A., Armand, J., & Soria, J. (2006). PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors. pp. 19-26.
- Cornu, M., Albert, V., & Hall, M. (2012). mTOR in aging, metabolism and cancer. pp. 53-62.

- De Palma, M., & Hanahan, D. (2012). The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. pp. 111-127.
- Dibble, C., & Cantley, L. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. pp. 545-555.
- Douglas, R., & Lowy, M. (1996). The causes of cancer. *Molecular oncology*. pp. 41-59.
- Eng, C., Shegal, S., & Claude, V. (1984). Activity of rapamycin against transplanted tumors. pp. 1231-1237.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A., & Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathway in cells. pp. 8204-8209.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Mathers, C., & Parkin, D. (2010). Estimatives of worldwide burden of cancer in 2008. pp. 2893-2917.
- Gatner, D., Machado, S., & Sobrinho-Simões, M. (1996). *Ipatimup*. Obtido de www.ipatimup.pt
- *Gene Tools, LLC*. (2020). Obtido de www.gene-tools.com
- Greenfield, L., & Jones, N. (2013). Modulation of autophagy by *Helicobacter pylori* and its roles in gastric carcinogenesis. pp. 602-612.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development*(18), pp. 1926-1945.
- Inoki, K., Corradetti, M., & Guan, K.-L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. pp. 19-24.
- Jiang, B.-H. (2008). Role of mTOR in anticancer drug resistance: Perspectives for improved drug treatment. pp. 63-76.
- Lang, L., Gaumann, A., Khoel, G., Seidel, U., Bataille, F., Klein, D., & Bolder, U. (2007). Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. pp. 1830-1810.
- Marat, A., Wallroth, A., Wen-Ting, L., & Muller, R. (2017). mTORC1 activity repression by late endosomal phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. pp. 968-972.

- Martel, R., Killicius, J., & Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. pp. 48-51.
- Martin, G. (2003). Cell signaling and cancer. pp. 164-174.
- Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric carcinoma. pp. 1441-1463.
- McKusick, V., & Boveri, M. (1985). The cromosome theory of cancer. *Journal of Medical Genetics* , pp. 431-440.
- Mills, G., Kohn, E., Lu, Y., Eder, A., Fang, X., & Wang, H. (2003). Linking molecular diagnostics to molecular therapeutics: targeting the PI#K pathway in breast cancer. pp. 93-104.
- Milo, R. (2013). What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. pp. 1050-1055.
- Moschetta, M., Reale, A., Marasco, C., Vacca, A., & Carratú, M. (2014). Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitantions. pp. 3801-3813.
- Muller, W., Burgart, L., Krause-Paulus, R., Thibodeau, S., & Almeida, M. (2001). The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. pp. 87-93.
- Murayama, T., Inokuchi, M., Takagi, Y., Yamada, H., Kojima, K., Kumagai, J., . . . Sugihara, K. (2009). Relation between outcomes and localization of p-mTOR expression in gastric cancer. pp. 782-788.
- Nassar, A., Hamieh, L., Gray, K., Thoner, A., & Fray, A. (February de 2020). Mutations and responses to rapalogs in patients with mestastatic renal cell carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*.
- Organization, W. H. (2020). *Cancer Statistics Worldeide*. Obtido de www.who.int
- Oshiro, N., Yoshino, K.-i., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., & Eguchi, S. (April de 2004). Dissociation of raptor from mtor is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells*, pp. 359-366.
- Pereira, L. (1991). Importância da Genética Molecular em Oncologia. *Ata Médica Portuguesa*, pp. 28-34.

- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., & Jackson, R. (2011). *A tour of the cell*.
- Reissner, K., Sartor, G., & Vazey, E. (2012). Use of vivo-morpholino for control of protein expression in adult rat brain. pp. 354-360.
- Salah-Eddin Al-Batran, M. D. (s.d.).
- Santos, L., & Teixeira, L. (2011). *Oncologia geral*. Lidel.
- Shenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., Radi, M., & Botta, M. (2011). ATP-competitive inhibitors of mTOR: an update. pp. 2995-3014.
- Stancheva, I., Collins, A., & Van den Veyver, I. (2003). Retracted: a mutant form of MeCP2 protein associated with man rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by Notch in *Xenopus* embryos. pp. 425-435.
- Stevens, A., & Lowe, J. (2002). Neoplasia, Patologia. pp. 205-210.
- Summerton, J., Stein, D., Huang, S., Matthews, P., Weller, D., & Partridge, M. (2009). Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems. pp. 63-70.
- Tapia, O., Riquelme, I., Leal, P., Sandoval, A., Aedo, S., & Weber, H. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance. pp. 25-33.
- Wang, Z., Feng, X., Molinolo, A., Martin, D., Vitale-Cross, L., Nohata, N., & Wahba, N. (2019). 4E-BP1 is a tumor suppressor protein reactivated by mTOR inhibition in head and neck cancer. pp. 1438-1450.
- Worls. (s.d.).
- Yang, Q., & Guan, K.-L. (2007). Expanding mTOR signaling. pp. 666-681.
- Yap, T., Garrett, M., Watson, M., & Raynaud, F. (2008). Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls and promises. pp. 393-412.
- Yecies, J., & Manning, B. (2011). mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. pp. 221-228.
- Yu, G., Wang, J., Chen, Y., Wang, X., Pan Jun, & Li, G. (2010). Overexpression of phosphorylated mammalian of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer. pp. 1821-1828.

- Zhang, Y. e. (2017). A pan-cancer proteogenomic atlas of PI3K/AKT/mTOR pathway alterations. pp. 820-832.
- Zhou, H., Yan, L., & Shile, H. (2010). Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer agents in medical chemistry*, pp. 571-581.

i- Apêndice

Resultados do Ensaio de Proliferação- Otimização de Resultados

Em três dias seguidos foram realizados ensaios de proliferação em células GP202 cultivadas em placas 6-Well para verificar qual a concentração ideal de células para o estudo de proliferação após inoculação de morfolino contra mTOR.

Postularam-se 3 quantidades celulares: 300 000 , 350 000 e 400 000.

- Ensaio 1 (18/2/20)

*300 000
células*

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	8	8	7	6
<i>Células mortas</i>	1	0	0	0

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

Média= 7.25 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 145000 células (1mL) → 290000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 5000 células (1mL) → 10000 células (2mL)

350 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	6	4	6	7
<i>Células mortas</i>	0	0	0	0

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

Média= 5.75 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 115000 células (1mL) → 230000 (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 0 células (1ml) → 0 células (2mL)

400 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	4	4	6	5
<i>Células mortas</i>	0	0	0	0

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

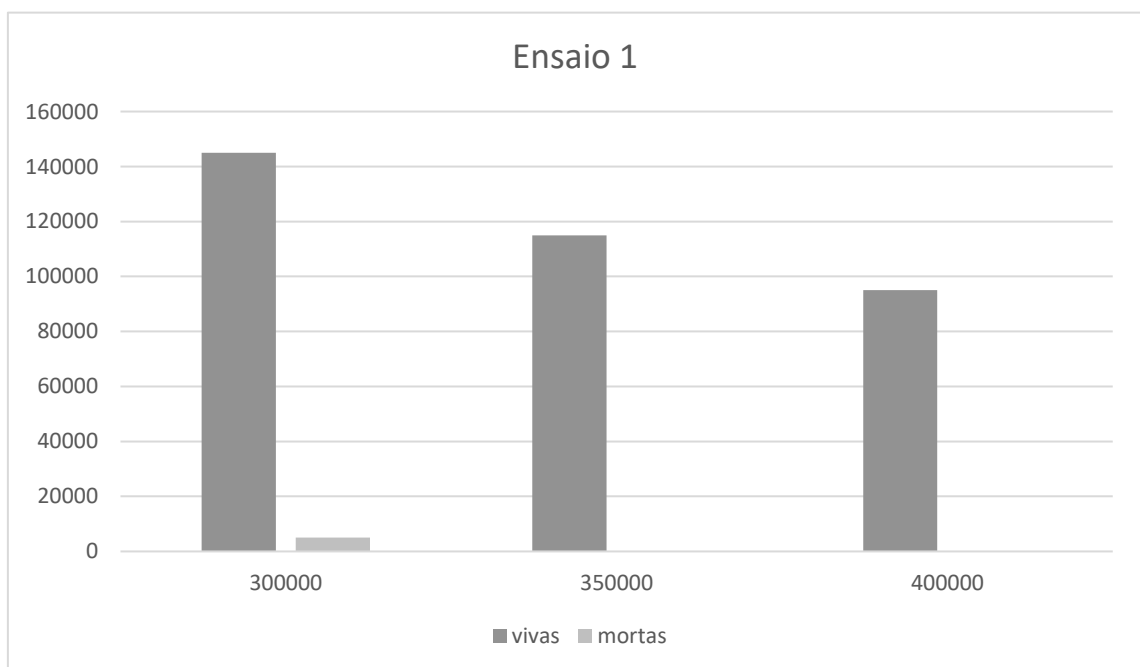
Média= 4.75 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 95000 células (1mL) → 190000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 0 células (1mL) → 0 células (2mL)



- Ensaio 2 (19/2/20)

*300 000
células*

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	13	8	14	10
<i>Células mortas</i>	0	1	0	1

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

Média= 11.25 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 225000 células (1mL) → 450000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 10000 (1mL) → 20000 células (2mL)

350 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	14	50	36	21
<i>Células mortas</i>	0	3	1	0

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

Média= 30.25 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 605000 células (1mL) → 1210000(2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 20000 células (1ml) → 40000células (2mL)

400 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	17	18	9	31
<i>Células mortas</i>	0	1	3	2

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

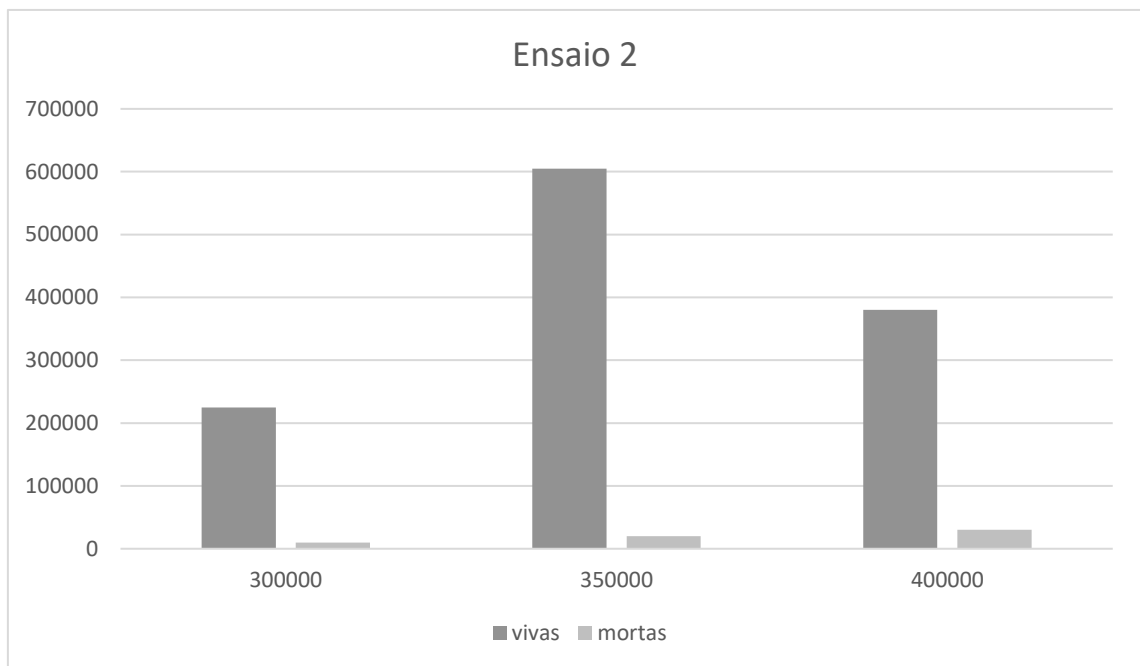
Média= 19 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 380000 células (1mL) → 760000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 30000 células (1mL) → 60000 células (2mL)



- Ensaio 3 (20/2/20)

300 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	11	9	11	13
<i>Células mortas</i>	0	0	2	0

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

Média= 11 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 220000 células (1mL) → 440000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 10000 células (1mL) → 20000 células (2mL)

350 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	13	21	24	23
<i>Células mortas</i>	0	0	0	0

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

Média= 20.25 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

Células vivas= 405000 células (1mL) → 810000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 0 células (1ml) → 0 células (2mL)

400 000
células

	1º quadrante	2º quadrante	3º quadrante	4º quadrante
<i>Células Vivas</i>	23	53	50	71
<i>Células mortas</i>	1	1	2	3

Contagem celular= média das células x 10000 x FD (100 Azul Tripano/ 100 células)

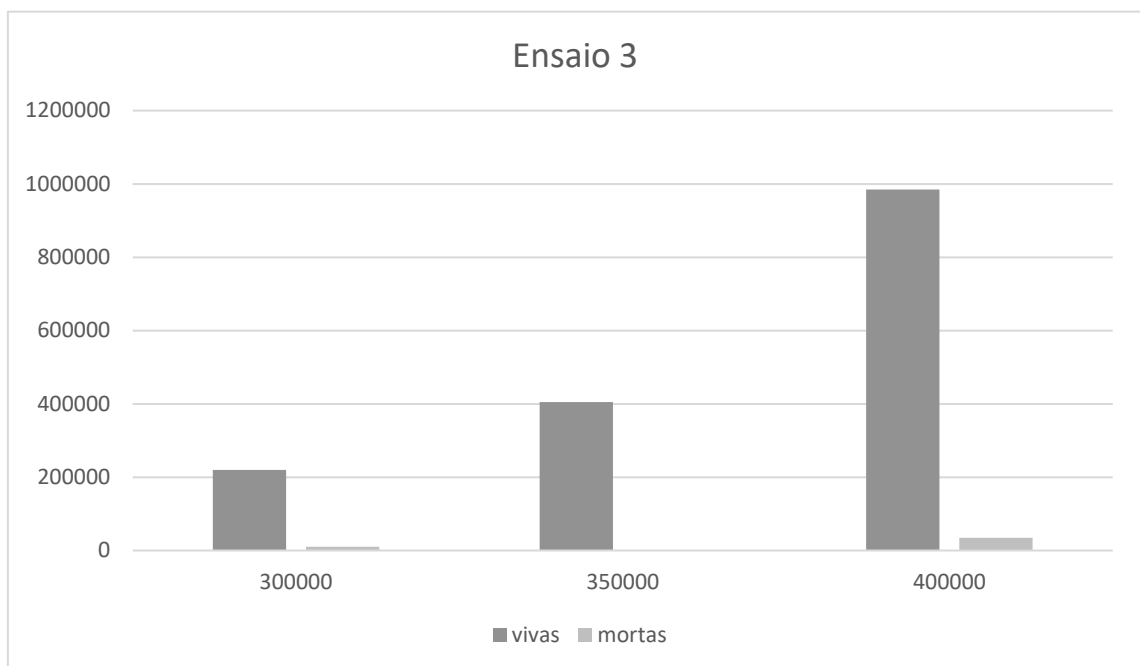
Média= 49.25 células

Células vivas= média células vivas x 10000 x 2

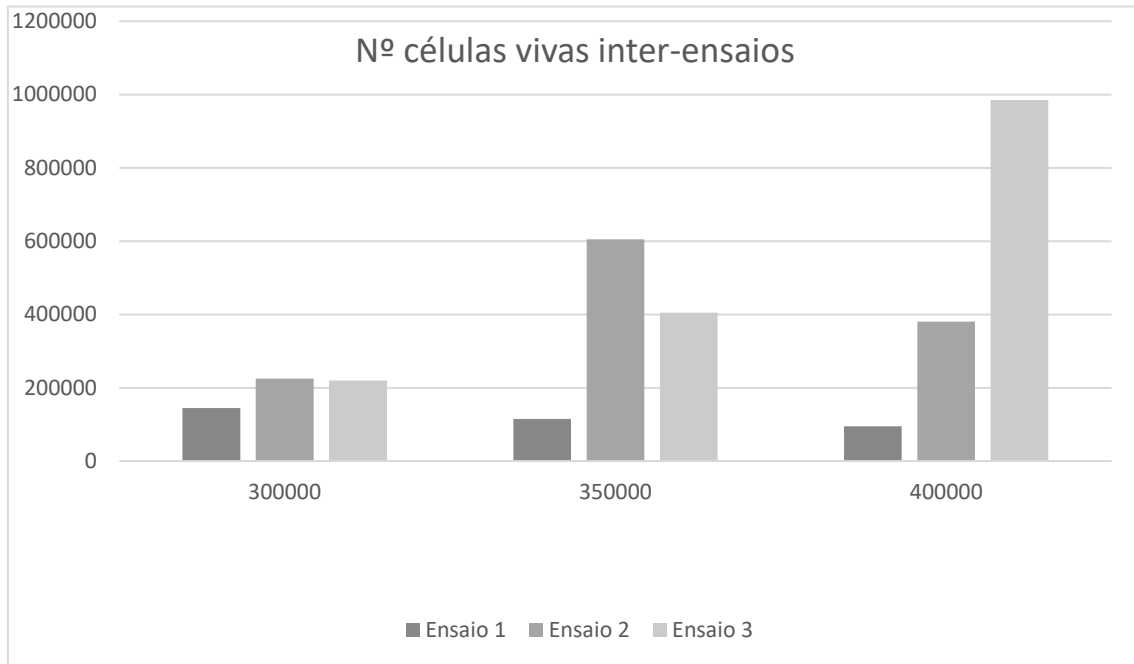
Células vivas= 985000 células (1mL) → 1970000 células (2mL)

Células mortas= média células mortas x 10000 x 2

Células mortas= 35000 células (1mL) → 70000 células (2mL)



Comparação dos 3 ensaios



Ensaio 1

Ensaio 2

Ensaio 3

300000	145000	225000	220000
		+35	-2.2%
350000	115000	605000	405000
		+80%	-33%
400000	95000	380000	985000
		+75%	+61%

ii. Anexos

Preparação de Soluções para Lise Celular

- 0.5 M Tris/HCl pH 6.8
 - 30.28g de Tris
 - 200 mL H₂O
 - Acertar pH com HCl
 - Perfazer H₂O 500 mL
 - Filtrar e guardar à TA

- SDS-SB 2x (Laemmli buffer)
 - 4mL de 0.5M Tris/HCl pH 6.8
 - 3.1 mL de glicerol 80% ou 2.5 mL de glicerol 100%
 - 1.125g SDS
 - Juntar e agitar a 37°C
 - Adicionar 0.5g DDT
 - 3mL de Azul de Bromofenol 0.1%
 - Aliquotar e guardar a -20°C

- Tampão de lise SDS-SB 2x
 - 40µL SDS
 - 60 µL H₂O
 - 1 µL Proteinase inhibition cocktail (1%)
 - 1 µL Benzonase 100x (1%)
 - 1 µL de MgCl₂ 0.5 (5mM)

- Tampão Benzonase
 - 500 µL glicerol 80x
 - 20 µL Tris HCl 1M pH8
 - 4 µL MgCl₂ 0.5M
 - 476 µL H₂O
 - Guardar a -20°C

- Benzonase 100x
 - 94 µL tampão de Benzonase
 - 6 µL Benzonase
 - Guardar -20°C

Preparação de Soluções para Western Blot

- BLOT BUFFER 25x (para Western Blot)
 - Volume: 1L
 - 1.25g SDS
 - 145g Tris
 - 72.5g Glicina
 - Perfazer H₂O 1L
 - Guardar à TA.

- BLOT BUFFER 1x (para Western Blot)
 - Volume: 1L
 - 40mL BB 25x
 - 200mL Metanol
 - Perfazer H₂O 1L
 - Guardar à TA.

- BROMETO de ETÍDIO 10 mg/ml
 - Usar máscara e luvas.
 - Volume: 10 ml
 - Brometo de Etídio: 100 mg
 - perfazer 10 ml com ddH₂O estéril.
 - Agitar até dissolução.
 - Guardar a 4°C, protegido da luz.

TBST (0.05% Triton X-100) (para Western Blot)

	1L	500 mL	100 mL
TBS 10x	100 mL	50 mL	10 mL
Triton X-100	500 uL	250 uL	50 uL
H ₂ O	Perfazer		

*é semelhante a TBS 0.1% Tween

TBS 0.1% TRITON X-100 (para Western Blot)

	1L	500 mL	100 mL
TBS 10x	100 mL	50 mL	10 mL
Triton X-100	1 mL	500 uL	100 uL
H ₂ O	Perfazer		

TBS 0.005% TWEEN 20 (para Western Blot)

	1L	500 mL	100 mL
TBS 10x	100 mL	50 mL	Não aconselhável
Triton X-100	50 uL	25 uL	
H ₂ O	Perfazer		

TBST MILK (5% w/v) (para Western Blot)

2.5g Leite pó Molico Plus (até +/- 5mL em falcon de 50mL)

TBST até 50mL

Colocar primeiro cerca de 25mL de TBST, agitar algum tempo e depois completar.

TBST BSA (6.25% w/v BSA) (para Western Blot)

2.5 g BSA

TBST até 40mL

Colocar primeiro cerca de 20mL de TBST, agitar algum tempo e depois completar.

LOADING CONTROL WESTERN BLOT

Loading Control	Sample type	(kDa)	Caution
Vinculin	Cytoplasmatic/whole cell extracts	116	In muscle tissues, a splice variant with an extra exon with the molecular weight of 150 KDa is also expressed.
Actin	Cytoplasmatic/whole cell extracts	43	Changes in cell-growth conditions and interactions with extracellular matrix components have been found to alter actin protein synthesis (Farmer et al., 1983; Ben Zeev and Amsterdam, 1986).
<i>GAPDH</i>	Cytoplasmatic/whole cell extracts. It is constitutively expressed in almost all tissues at high levels, therefore becoming the marker of choice as loading control in northern/western blots and protein normalization.	30 – 40	Some physiological factors, such as hypoxia and diabetes as well as some sort of cancers increase GAPDH expression in certain cell types.
Tubulin	Cytoplasmatic/whole cell extracts.	55	Tubulin expression is known to vary according to resistance to antimicrobial and antimitotic drugs (Sangrajrang S. et al, 1998, Prasad V et al, 2000).

Marcas e Consumíveis

CONSUMIVEL	MARCA	PREÇO ESTIMADO
VIVO-MORPHOLINO STANDARD CONTROL OLIGO (100µL)	Gene Tools	15000\$
ENDO-PORTER (PEG- 1ML)	Gene Tools	20000\$
VIVO.MORPHOLINO (400NMOL)	Gene Tools	70000\$
RPMI-1640 MEDIUM, WITH L-GLUTAMINE	Sigma-Aldrich	124€
TRYPsin-EDTA SOLUTION 1X 0.05%	Sigma-Aldrich	40.10€
TRIPAN BLUE SOLUTION	Sigma-Aldrich	37.10€
FETAL BOVINE SERUM	Sigma-Aldrich	148€
PONTAS 10-200µL(1000 UND)	Frilabo	5.32€
FRASCOS DE 25CM2 COM FILTRO	Frilabo	72.42€
PIPETA SEROLOGICA 5ML	Frilabo	40.09€
PIPETA SEROLOGICA 2ML	Frilabo	46.95€
TISSUE CULTURE 6-WELL	Microgene	49.61€
PIPETA 10ML	PVL	28€
AC UTILIZADOS PARA WESTERN BLOT	Werfen	-
RNA ISOLATION KIT	Nzytech	322€
PRIMERS MTOR	STABvida	65.04€

BENZONASE

Tebu-bio

260.00€