

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



A tradução não-canónica da proteína UPF1 (*up-frameshift 1*) e a sua relevância na tumorigénese do cancro colorretal

Adriana Antunes Elias

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Dissertação orientada por:

Doutora Rafaela Lacerda Santos (INSA)
Doutora Luísa Maria Ferreira Romão Loison (FCUL)

2023

Agradecimentos

A realização deste projeto concedeu-me um conjunto de conhecimentos e aprendizagens a todos os níveis, nos quais inúmeras pessoas contribuíram das mais diversas formas. Por isso, quero desde já agradecer a todas as pessoas (sem exceção!) que participaram ou acompanharam esta fase da minha vida.

Em especial, quero começar por agradecer ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e ao seu Departamento de Genética Humana (DGH) por me terem permitido desenvolver o trabalho prático nas suas instalações e fornecido condições para a execução do mesmo. Do mesmo modo, agradeço também à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e ao Biosystems and Integrative Sciences Institute (BioISI) por possibilitarem a concretização desta dissertação. Não menos importante, quero agradecer ao laboratório RNA Metabolism and Associated Diseases e a toda a sua equipa (Luísa, Rafaela, Rosário, Juan, Catarina, Patrícia, Inês, Cláudia e Filipa), por me acolherem de braços abertos e proporcionarem a obtenção de todas as competências que adquiri ao longo desta jornada.

Quero agradecer em particular, primeiramente, à Doutora Luísa Romão, orientadora interna desta dissertação e *Head* do laboratório em que esta foi desenvolvida, por me ter proposto este tema e por todas as orientações e sugestões que foi dando ao longo deste trabalho, principalmente nos momentos mais difíceis.

Em segundo lugar, mas não menos importante, agradeço à Doutora Rafaela Lacerda, orientadora externa desta dissertação, por me ter acolhido, acompanhado, orientado, apoiado das mais diversas formas, nos bons e nos maus momentos, e principalmente por ter instruído as bases necessárias para o meu crescimento e para o desenvolvimento deste projeto, que foram fundamentais!

Não podia deixar de destacar também o Juan, a Catarina, a Patrícia e a Inês, que tanto contribuíram para a minha integração no laboratório, a nível profissional e pessoal, e aos quais estou grata por todo apoio, todas as dicas, conselhos e sugestões que me deram.

A toda a equipa de laboratório, quero ainda agradecer, com saudade, todos os momentos de *team building* que fizemos pois, afinal, trabalhar é mais fácil quando a felicidade e o sucesso andam de mãos dadas.

Ainda relativamente ao INSA, queria deixar também um agradecimento especial à Patrícia Barros do Laboratório de Oncobiologia e Vias de Sinalização, que nos ajudou a ultrapassar parte dos problemas técnicos laboratoriais que atravessámos e que afetaram o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, e com todo o carinho, agradeço à minha família e amigos, nomeadamente aos meus pais, à Beatriz e ao Rodrigo, por me terem acompanhado ao longo de todo o processo, por toda a ajuda, força, conselhos, valor e incentivo que me deram para concluir esta etapa da minha vida.

A todos, um grande e sincero OBRIGADO.

Sumário

A iniciação da tradução é o passo limitante da síntese proteica. Em condições de stresse, a tradução canónica é inibida e a tradução de transcritos específicos é mantida por mecanismos alternativos, como os que envolvem IRES (*internal ribosome entry site*). A UPF1 (*up-frameshift 1*) contribui para a tumorigénese no cancro colorretal (CRC, *colorectal cancer*). Anteriormente neste laboratório verificou-se que a região 5'UTR (*5' untranslated region*) do transcrito de *UPF1* apresenta atividade IRES e que esta é mantida em condições de stresse. Assim, esta tese teve como objetivo aferir como a tradução da UPF1 mediada por IRES pode contribuir para a progressão do CRC. As análises *in silico* realizadas através da plataforma Xena, para medir a variação dos níveis de expressão do transcrito e da proteína entre diferentes tipos de cancro e entre tecidos normais e cancerígenos do cólon, mostraram que a expressão de mRNA e proteína é superior nos tecidos de CRC do que noutros tipos de cancro e também em comparação com os tecidos normais do cólon, sugerindo que a expressão da UPF1 é superior quando esta contribui para a tumorigénese. Adicionalmente, a análise da expressão endógena da UPF1 em células epiteliais cultivadas da mucosa normal do cólon humano (NCM460) e em linhas celulares correspondentes a diferentes estádios de desenvolvimento de CRC (HT29, HCT116 e SW480), expostas a 1 μM de tapsigargina (que induz o stresse do retículo endoplasmático e, portanto, inibe a tradução canónica), revelou que a expressão da UPF1 é mantida em condições nas quais a tradução canónica é inibida, sugerindo que ocorre tradução mediada por IRES e que esta permite a manutenção dos níveis de UPF1 nessas condições. Concluindo, a tradução mediada por IRES contribui para a síntese da UPF1 em tecidos de CRC, o que, por sua vez, contribui para a progressão deste tipo de cancro.

Palavras-chave: *Internal ribosome entry site*, expressão génica eucariótica, *up-frameshift 1*, tumorigénese, cancro colorretal

Abstract

Translation initiation is the rate-limiting step of protein synthesis. In stress conditions, canonical translation is inhibited, and the translation of specific transcripts is maintained by alternative mechanisms, such as those involving IRES (internal ribosome entry sites). UPF1 (*up-frameshift 1*) contributes to tumorigenesis in colorectal cancer (CRC), and it was previously shown in our lab that its 5' untranslated region (5'UTR) has IRES activity which is maintained in stress conditions. Thus, the general aim of this thesis was to understand whether and how UPF1 IRES-mediated translation contributes to the progression of CRC. *In silico* analyses through the Xena platform to measure variations in mRNA and protein expression among different types of cancer, and between normal and carcinogenic colon tissues, has shown that mRNA and protein expression is higher in CRC tissues than in other cancers and also higher than in normal colon tissues, suggesting that UPF1 expression is higher when UPF1 contributes to tumorigenesis. Accordingly, the analysis of UPF1 endogenous expression in cultivated epithelial cells of the normal human colon mucosa (NCM460), and in cell lines corresponding to different CRC developmental stages (HT29, HCT116 and SW480), exposed to 1 μM of thapsigargin, which induces endoplasmic reticulum stress and hence inhibits canonical translation, revealed that UPF1 expression is maintained in conditions in which canonical translation is inhibited. These results suggest that the IRES-mediated translation allows the maintenance of endogenous UPF1 levels in these conditions. In conclusion, IRES-mediated translation contributes to the synthesis of UPF1 in CRC tissues, which in turn contributes to the progression of this type of cancer.

Keywords: Internal ribosome entry site, eukaryotic gene expression, *up-frameshift 1*, tumorigenesis, colorectal cancer

Índice

Agradecimentos.....	i
Sumário	ii
Abstract	ii
Índice.....	iii
Lista de figuras	v
Lista de Tabelas.....	v
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Tradução eucariótica	1
1.1.1. Iniciação da tradução.....	2
1.1.1.1. Iniciação da tradução canónica.....	2
1.1.1.2. Iniciação da tradução não-canónica e tradução mediada por <i>internal ribosome entry site</i> (IRES).....	3
1.2. Proteína <i>up-frameshift 1</i> (UPF1)	4
1.3. Do cancro à UPF1	5
1.4. Potencial terapêutico: terapêuticas baseadas em RNA.....	6
1.4.1. Oligonucleótidos antissense	6
1.5. Objetivos	7
2. Métodos.....	8
2.1. Análises <i>in silico</i>	8
2.2. Cultura de células	8
2.3. Tratamento com taspigargina	9
2.4. Quantificação de proteína total.....	9
2.5. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio e Western blot.....	9
2.5.1. Remoção dos anticorpos das membranas e detecção do eIF2 α total.....	10
2.6. Quantificação da intensidade das bandas do eIF2 α e do eIF2 α fosforilado	10
2.7. Extração de RNA.....	10
2.8. Síntese de cDNA e transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.....	10
3. Resultados	11
3.1. Análises <i>in silico</i>	11
3.1.1. Expressão da proteína UPF1	11
3.1.1.1. Os padrões de expressão da UPF1 em CRC apresentam valores geralmente superiores e menor diversidade em relação a outros cancros.....	11
3.1.1.2. Os níveis de expressão da UPF1 são superiores em tecidos de CRC do que em tecidos normais do cólon.....	13

3.1.2.	Expressão do transcrito <i>UPF1</i>	13
3.1.2.1.	Os padrões de expressão do transcrito <i>UPF1</i> apresentam valores geralmente superiores e menor variabilidade no CRC em relação a outros cancros.....	14
3.1.2.2.	Os padrões de expressão de mRNA de <i>UPF1</i> são superiores em tecidos CRC do que em tecidos normais do cólon	15
3.1.2.3.	A diferença entre os padrões de expressão de <i>UPF1</i> em MSI e MSS não é significativa	17
3.2.	Validação experimental da expressão da <i>UPF1</i> em linhas celulares de CRC	17
3.2.1.	Após 16 h, 20 h e 24 h de exposição à TG, a expressão da <i>UPF1</i> mantém-se em condições de stresse do RE e a indução deste é mais eficaz às 20 h e 24 h de tratamento.....	18
3.2.1.1.	A expressão do transcrito <i>UPF1</i> é superior nos tecidos de CRC em que o stresse do RE foi induzido com sucesso	20
3.2.2.	Após 20 h, 22 h e 24 h de exposição à TG, verificou-se que o tempo de exposição mais eficaz para induzir o stresse do RE varia consoante a linha celular e que os níveis de expressão da <i>UPF1</i> se mantêm nestas condições.....	21
4.	Discussão.....	23
5.	Conclusão e perspectivas futuras	28
6.	Referências bibliográficas	29
7.	Informação suplementar	38

Lista de figuras

Figura 1.1. Etapas da iniciação da tradução canónica.	3
Figura 1.2. Iniciação da tradução mediada por <i>internal ribosome entry sites</i> (IRES).....	4
Figura 3.1. O cancro colorretal apresenta níveis de expressão da proteína UPF1 geralmente superiores e de menor variabilidade em comparação com outros tipos de cancro.	12
Figura 3.2. Os padrões de expressão da proteína UPF1 no cólon são inferiores em tecidos normais do que em tecidos cancerígenos.	13
Figura 3.3. Os níveis de expressão do mRNA de <i>UPF1</i> são geralmente superiores e de menor variabilidade no cancro colorretal, em comparação com outros tipos de cancro.	14
Figura 3.4. Os níveis de expressão do mRNA de <i>UPF1</i> em tecidos normais do cólon são inferiores aos dos tecidos cancerígenos.	16
Figura 3.5. A diferença entre os padrões de expressão do transcrito de <i>UPF1</i> em tecidos cancerígenos do cólon com instabilidade de microssatélites (MSI) e com estabilidade de microssatélites (MSS) não é significativa.....	17
Figura 3.6. A expressão da proteína UPF1 mantém-se em condições de stresse do retículo endoplasmático (RE) e a indução deste stresse é mais eficaz após 20 h e 24 h de exposição à tapsigargina (TG).	18
Figura 3.7. Os níveis de expressão do transcrito de <i>UPF1</i> são superiores após 24 h de exposição à tapsigargina (TG).	20
Figura 3.8. O tempo de exposição à tapsigargina (TG) mais eficaz para a indução do stresse do RE difere consoante a linha celular, mas os níveis de expressão da UPF1 mantêm-se nestas condições.	21

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Lista de anticorpos utilizados no Western blot.....	10
Tabela 2.2 Lista de <i>primers</i> utilizados no RT-qPCR.	11
Tabela S1. Composição dos reagentes produzidos em laboratório.	38

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A – Adenina

ABCE1 – *Adenosine triphosphate binding cassette sub-family E member 1*

ASO – Oligonucleótidos antissense (do inglês, *antisense oligonucleotides*)

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

C – Citosina

CRC – Cancro colorretal (do inglês, *colorectal cancer*)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

ECL – Reagente de quimioluminescência (do inglês, *enhanced chemiluminescence*)

eIF – Fator eucariótico de iniciação (do inglês, *eukaryotic initiation factor*)

EMT – Transição epitélio-mesenquimal (do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*)

eRF – Fator de terminação eucariótico (do inglês, *eukaryotic release factor*)

FDA – Food and Drug Administration

G – Guanina

GAPDH – *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GDP – Guanosina-5'-difosfato

GGQ – *Glycine-glycine-glutamine*

GTP – Guanosina-5'-trifosfato

h – Horas

HDACi – Histona desacetilase

IgG – Imunoglobulina G

IRES – *Internal ribosome entry sites*

ITAF – *IRES trans-acting factors*

lncRNA – RNA não codificante de cadeia longa (do inglês, *long non-coding RNA*)

Local A – Local de aminoacil-tRNA (do inglês, *aminoacyl-tRNA site*)

Local E – Local de saída (do inglês, *exit site*)

Local P – Local peptidil-tRNA (do inglês, *peptidyl-tRNA site*)

m/v – Massa por volume

MALAT1 – *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*

mCRC – Cancro colorretal metastático (do inglês, *metastatic colorectal cancer*)

MDR – Resistência a múltiplos medicamentos (do inglês, *multidrug resistance*)

min – Minutos

ml – Mililitros

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, *messenger ribonucleic acid*)

MSI – Instabilidade de microssatélites (do inglês, *microsatellite instability*)

MSS – Estabilidade de microssatélites (do inglês, *microsatellite stability*)

mTOR – *Mammalian target of rapamycin*

NMD – *Nonsense-mediated mRNA decay*

n_{MSI} – Número de amostras com MSI

n_{MSS} – Número de amostras com MSS

p – Probabilidade

PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffered saline*)

PERK – *Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*

PTC – Codão de terminação prematura (do inglês, *premature termination codon*)

PVDF – Fluoreto de polivinilideno (do inglês, *polyvinylidene fluoride*)

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

RNAi – Ácido ribonucleico de interferência (do inglês, *ribonucleic acid interference*)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute–1640

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription coupled to real-time polymerase chain reaction*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl-sulfate*)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SL – *Stem loop*

T – Timina

TBS – *Tris-buffered saline*

TBS-T – *Tris-buffered saline with Tween 20*

TG – Tapsigargina

TGF-β – *Transforming growth factor beta*

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência (do inglês, *transfer ribonucleic acid*)

UPF1 – *Up-frameshift 1*

UPR – Resposta a acumulação de proteínas com conformação tridimensional deficiente ou por formar (do inglês, *Unfolded Protein Response*)

UTR – *Untranslated region*

v/v – Volume por volume

Wnt – *Wingless-related integration site*

μg – Microgramas

μM – Micromolar

1. Introdução

A vida depende da capacidade que cada célula tem de armazenar, reparar e traduzir a informação genética que é necessária para a origem e manutenção de um ser vivo [1].

No *Dogma Central da Biologia Molecular* foi definido o modo como esta informação é decodificada, através da expressão génica que consiste na transcrição do DNA em RNA mensageiro (mRNA, do inglês, *messenger RNA*) e, por vezes, a tradução deste em proteínas que, depois de adquirirem a sua conformação tridimensional, são conduzidas ao respetivo local de atuação [2].

Apenas cerca de 1% do DNA humano codifica proteínas, no entanto, aproximadamente 75% do genoma humano total é transcrito em RNA [3]. Estes RNA não-codificantes desempenham papéis com diversas funções, nomeadamente em diversos mecanismos de regulação génica, tais como a regulação de genes-alvo específicos, o *imprinting* e o silenciamento génico [4]. Apesar do crescente conhecimento relativo aos intervenientes da regulação da expressão génica em células eucarióticas e aos papéis que nela desempenham, este ainda não é suficiente para compreender e descrever o seu funcionamento na plenitude.

1.1. Tradução eucariótica

A tradução do mRNA é um desafio complexo na transferência de informação [5]. Na tradução canónica, a síntese de uma única proteína requer a ação coordenada de numerosos RNA não-codificantes e proteínas [5]. Este processo é normalmente constituído por quatro fases interligadas entre si: 1) iniciação, 2) alongamento, 3) terminação e 4) reciclagem [5–7].

- 1) Na iniciação (fase que será abordada em pormenor na secção 1.1.1), ocorre a localização do codão de iniciação pelas subunidades ribossómicas e fatores de iniciação eucarióticos (eIFs, do inglês *eukaryotic initiation factors*) [5–7];
- 2) No alongamento, os aminoácidos acoplados aos RNA de transferência (tRNA, do inglês *transfer RNA*) são sucessivamente adicionados ao péptido que está a ser sintetizado, de acordo com a sequência codificada na molécula de mRNA, sendo necessários três passos para adicionar cada aminoácido: i) a inserção de um tRNA acoplado a um aminoácido (aminoacil-tRNA) no local do ribossoma que aceita estes aminoacil-tRNA (local A, do inglês *aminoacyl-tRNA site*); ii) a formação da ligação peptídica entre o aminoácido acoplado no tRNA e o último aminoácido da cadeia peptídica em formação, que se encontrava associado a um tRNA (peptidil-tRNA), transferindo assim a cadeia peptídica do peptidil-tRNA para o aminoacil-tRNA; e, por fim, após esta transferência, é necessário iii) o tRNA ser movido do local A para o local do ribossoma ocupado pelo peptidil-tRNA (local P, do inglês *peptidyl-tRNA site*) e, em simultâneo, o tRNA que anteriormente ocupava o local P é movido para o local que permite a dissociação do tRNA ao ribossoma (local E, do inglês *exit site*). É de notar que, quando um tRNA é movido do local A para o local P, um novo aminoacil-tRNA é inserido no local A [5–7];
- 3) A terminação ocorre quando o ribossoma encontra um codão de terminação, reconhecido pelo fator de terminação 1 (eRF1, do inglês *eukaryotic release factor 1*) e, depois de este se ligar ao fator de terminação 3 (eRF3, do inglês *eukaryotic release factor 3*), os eRF inibem a ligação de novos aminoacil-tRNA e desencadeiam a libertação do péptido, visto que o eRF1 contém uma região na sua sequência (GGQ, do inglês *glycine-glycine-glutamine*) que induz a hidrólise do péptido do tRNA, catalizada pelo fator *ATP-binding cassette sub-family E member 1* (ABCE1) [5–7];

- 4) Durante a reciclagem em eucariotas, o ABCE1 induz alterações na conformação do eRF1, o que permite a dissociação das duas subunidades ribossômicas e, conseqüentemente, a libertação dos tRNA e do mRNA que se encontravam associados ao ribossoma. Deste modo, i) os tRNA ligam-se a novos aminoácidos, ii) a pequena e a grande subunidade do ribossoma encontram-se novamente disponíveis para realizar a iniciação da tradução e iii) os fatores eucarióticos com ADP/GDP acoplados que tenham participado em processos de desfosforilação são refosforilados de modo a poderem exercer novamente as suas funções [7, 8].

1.1.1. Iniciação da tradução

A iniciação da tradução é o passo limitante do progresso da síntese proteica devido à quantidade de etapas e fatores envolvidos, pois é principalmente neste que ocorrem os mecanismos de regulação que definem a quantidade de proteína sintetizada num dado momento e sob determinadas condições [1, 9].

1.1.1.1. Iniciação da tradução canônica

A eficiência da tradução canônica depende da presença de i) uma modificação química específica (m^7G , nucleótido de guanina metilado) na sua extremidade 5', conhecida como 5' *cap* ou estrutura *cap*, que permite o recrutamento da subunidade 40S do ribossoma, e ii) uma cauda poli-A na extremidade 3' do mRNA, que favorece o recrutamento dos fatores de iniciação da tradução [4, 5]. Estas modificações protegem o mRNA da degradação e servem de sinalização molecular de modo a permitir que a célula identifique o mRNA para ser traduzido [4, 5].

Para que a tradução canônica seja iniciada com sucesso, a iniciação pode ser descrita por sete acontecimentos interligados entre si e representados na Figura 1.1: 1) formação do complexo ternário; 2) formação do complexo de pré-iniciação 43S; 3) ligação do complexo 43S ao mRNA; 4) *scanning* da região 5' transcrita mas não traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*); 5) reconhecimento do primeiro codão de iniciação em contexto favorável; 6) formação do ribossoma 80S; e 7) reciclagem de eIF2-GTP [5, 10].

O complexo ternário é constituído pelo fator de iniciação eIF2 (composto pelas subunidades α , β e γ), por um tRNA iniciador acoplado a uma metionina e por GTP ligados à subunidade γ do eIF2 [9]. Após a constituição e ativação do complexo ternário [11, 12], este é recrutado pelo eIF5B para se ligar à subunidade ribossômica 40S com o auxílio de quatro fatores eucarióticos de iniciação (eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5), formando o complexo de pré-iniciação 43S [5, 13–17].

Paralelamente à formação do complexo ternário, ocorre a ativação do mRNA através do complexo eIF4F, que é composto por: a) eIF4E, que se liga diretamente à 5' *cap*; b) eIF4A, que tem atividade helicase que é ativada pelo eIF4B ligado à 5' *cap* da molécula de mRNA; e c) eIF4G, que mantém a integridade do eIF4F, por manter os seus componentes unidos, e por se ligar também ao eIF3, permitindo a ligação entre o complexo eIF4F e o complexo de pré-iniciação [5, 13–17].

Após a formação do complexo 43S e da ativação do mRNA, ocorre a ligação entre os complexos de pré-iniciação 43S e eIF4F, formando o complexo 48S que, por sua vez, permite o *scanning* do mRNA até encontrar um codão de iniciação que seja reconhecido pelo anticodão do tRNA iniciador [6, 12, 18–20]. De seguida, o eIF5B hidrolisa o eIF2-GTP, libertando assim o eIF2-GDP e o eIF3 da subunidade ribossômica pequena, deixando o tRNA_i ligado ao codão de iniciação e a subunidade grande do ribossoma liga-se, formando o ribossoma funcional 80S [6, 12, 18–20].

Por fim, os restantes fatores de iniciação também se libertam e ocorre a reciclagem de eIF2-GDP catalisada pelo eIF2B, dando por concluída a fase de iniciação da tradução [21].

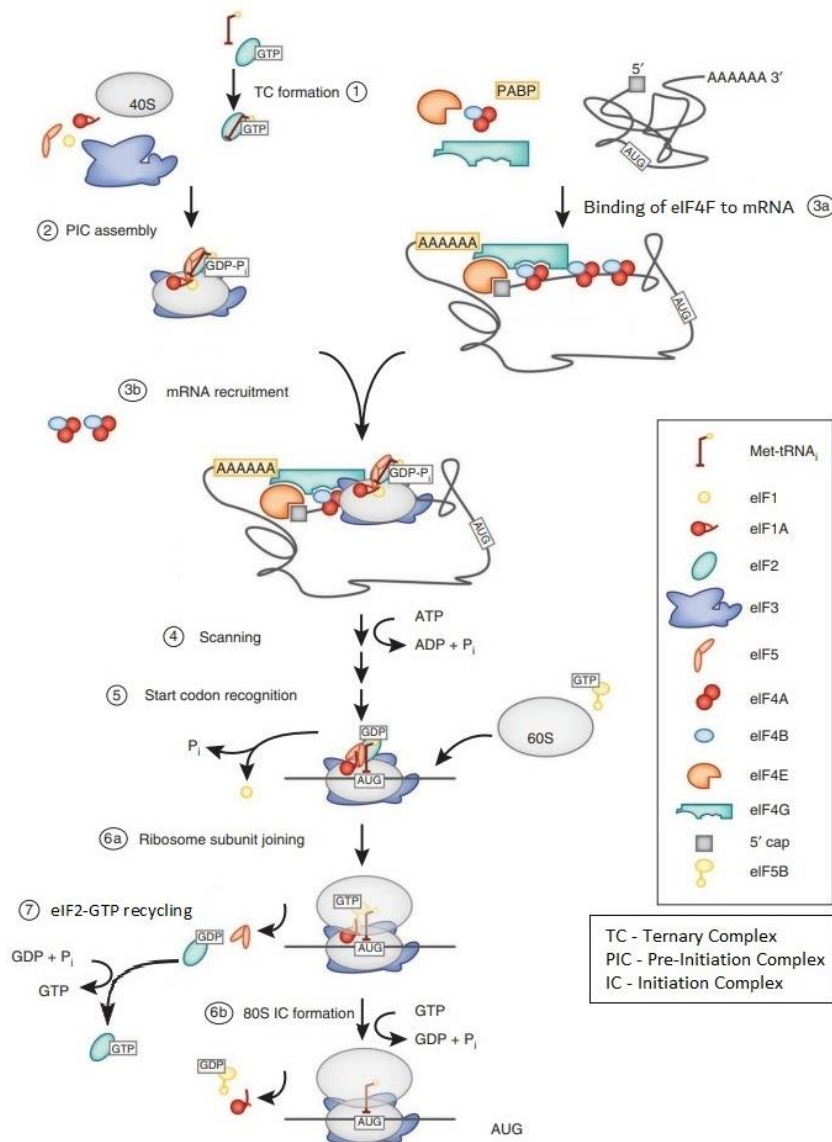


Figura 1.1. Etapas da iniciação da tradução canônica.

A iniciação da tradução canônica envolve as seguintes etapas: (1) formação do complexo ternário; (2) formação do complexo de pré-iniciação 43S; (3) ligação do complexo 43S ao mRNA, o que inclui (3a) a ligação do complexo eIF4F ao mRNA e (3b) o recrutamento do mRNA; (4) *scanning* da região 5' UTR; (5) reconhecimento do primeiro códon de iniciação em contexto favorável; (6) formação do ribossomo 80S, que implica (6a) a ligação da subunidade 60S e (6b) a formação do complexo de iniciação 80S; e (7) reciclagem de eIF2-GTP. Adaptado de Aitken & Lorsh (2012) [10]

1.1.1.2. Iniciação da tradução não-canônica e tradução mediada por *internal ribosome entry site* (IRES)

A maioria dos mRNA eucarióticos é traduzida pelo mecanismo de tradução canônica [22]. No entanto, nomeadamente em condições de stresse, como o stresse do retículo endoplasmático (RE), choque térmico, hipóxia ou privação de nutrientes, ou em condições patológicas, como no cancro, este mecanismo é inviabilizado [22–24]. Isto pode ocorrer devido, por exemplo, à fosforilação da subunidade α de eIF2, que impede a formação do complexo ternário, o que inibe a formação do complexo de pré-iniciação [22–24]. Outra possível causa relaciona-se com a ausência da ligação do complexo eIF4F à estrutura *cap* devido, por exemplo, ao não funcionamento da cinase mTOR, uma vez que esta enzima fosforila proteínas de ligação (do inglês, *binding-proteins*) com o propósito de as dissociar do eIF4E, o que permite que este fator se ligue ao eIF4G, proporcionando a ligação do eIF4F à estrutura *cap* [22–24].

O mecanismo de tradução não-canônica mais conhecido e investigado permite a iniciação da tradução mediada por estruturas secundárias de mRNA existentes na 5'UTR, conhecidas como IRES (do inglês *internal ribosome entry site*) (Figura 1.2) [25]. Estas estruturas recrutam a subunidade 40S do ribossoma diretamente para a proximidade do codão de iniciação sem necessidade de percorrer o transcrito desde a extremidade 5', mesmo em condições que inibem a tradução canônica [25]. Os IRES podem necessitar de proteínas que regulem a iniciação, como as ITAFs (do inglês *IRES trans-acting factors*) (Figura 1.2i, ii e iii) e os fatores de iniciação da tradução canônica (Figura 1.2 i e ii), ou podem funcionar de forma independente (Figura 1.2. iii) [26, 27].

Estima-se que 10 a 15 % dos mRNA celulares possam ser traduzidos por IRES [28]. Nas células eucarióticas, este mecanismo ocorre não só em diversos processos fisiológicos, tais como a mitose [30] e a apoptose [24], mas também em situações patológicas, como o cancro [23, 31, 32].

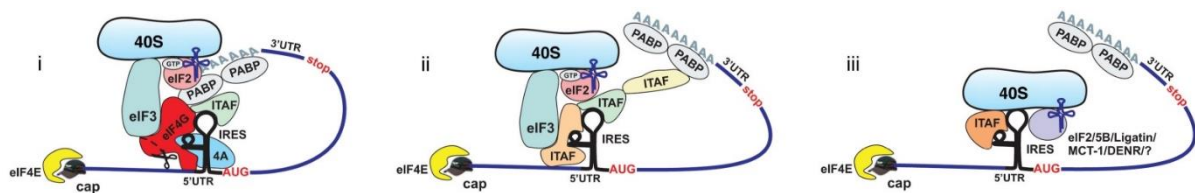


Figura 1.2. Iniciação da tradução mediada por *internal ribosome entry sites* (IRES).

Os IRES são estruturas secundárias de RNA que permitem o recrutamento direto da subunidade 40S do ribossoma para a proximidade do codão de iniciação. O recrutamento pode envolver (i) várias ITAFs (do inglês, *IRES trans-acting factors*) e a maioria ou todos os fatores de iniciação da tradução canônica; (ii) apenas alguns fatores de iniciação da tradução canônica e ITAFs; ou (iii) pode não recorrer a fatores de iniciação da tradução canônica, mas apenas a algumas ITAFs, se necessário. Adaptado de Komar & Hatzoglou (2011) [27]

1.2. Proteína *up-frameshift 1* (UPF1)

A UPF1 humana é uma fosfoproteína que apresenta atividade de RNA helicase e também funciona como uma ATPase dependente de DNA/RNA [33]. Esta proteína é codificada pelo gene *UPF1* (OMIM#601430) localizado no cromossoma 19 (p13.2-p13.11) [34]. A UPF1 desempenha diversas funções em vários mecanismos celulares, nomeadamente sendo um fator essencial no mecanismo de degradação rápida de transcritos aberrantes mediado por mutações nonsense (NMD, do inglês *nonsense-mediated mRNA decay*), necessário para a regulação da expressão génica e para a rápida degradação de mRNAs aberrantes [particularmente os que contêm codões de terminação prematura (PTC, do inglês *premature termination codons*)] [35–37]. É também uma proteína crucial para a progressão da fase S do ciclo celular [38] e a manutenção do tamanho e homeostasia dos telómeros, de um modo totalmente independente das suas funções no NMD [39]. Adicionalmente, contribui para o desenvolvimento embrionário e sobrevivência [40, 41] e, atualmente, é conhecida por desempenhar um papel crítico na proliferação e diferenciação celulares, promovendo um estado proliferativo e indiferenciado à célula [42].

Além disso, como se especificará na secção 1.3, diversos estudos relatam que a UPF1 desempenha um papel importante em vários tipos de cancro, incluindo cancro colorretal [43–45], cancro hepatocelular [46–50], cancro gástrico [51], adenocarcinoma do pulmão [52, 53], cancro pancreático [54], tumor miofibroblástico inflamatório [55], cancro do ovário [56], glioma [57] e cancro da próstata [58].

Os resultados anteriormente produzidos no laboratório em que este projeto de dissertação foi realizado demonstraram que a 5'UTR da UPF1 tem atividade de IRES, que se mantém em condições de stresse (como hipóxia, stresse do RE e bloqueio da via mTOR), o que indica que a tradução da UPF1 pode ser mediada por IRES [59]. Recorrendo a uma análise delecional e mutacional da 5'UTR, identificaram os nucleótidos 1–100 e 151–275 (de um total de 275) como fundamentais para a atividade do IRES [59].

A comparação destas sequências com a estrutura secundária prevista *in silico* permitiu verificar que estes nucleótidos correspondem, respetivamente, a dois *stem loops* (SL) da estrutura secundária do IRES [59].

1.3. Do cancro à UPF1

O cancro pode ser definido como um vasto conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento anormal e descontrolado de células que têm a capacidade de se infiltrar e destruir tecidos [60]. Isto acontece devido à acumulação de mutações originadas por vários fatores, tais como a idade, a dieta, distúrbios inflamatórios, fatores genéticos (mutações na linha germinal) e exposição a agentes infecciosos, físicos ou químicos [60].

Das diversas classes de genes que, quando mutados desencadeiam a tumorigénese, ou seja, o processo que permite a formação de um tumor num organismo, existem duas classes principais a destacar: 1) oncogenes; e 2) genes supressores de tumores [60, 61].

- 1) **Oncogenes** são versões mutadas de genes — os proto-oncogenes —, que geralmente codificam proteínas que aumentam a vantagem seletiva da célula, contribuindo para o desenvolvimento do cancro, nomeadamente devido a estas estimularem a divisão celular, a diminuição da diferenciação celular e a inibição da morte celular, pelo que a proteína resultante apresenta um ganho de função. Normalmente, estes genes atuam de forma dominante, sendo assim necessário sofrerem uma mutação apenas num único alelo para se tornarem oncogenes, sobrepondo-se à regulação do alelo normal [60].
- 2) **Genes supressores de tumores** são genes que codificam proteínas cuja função principal é bloquear/diminuir o desenvolvimento do cancro ao induzir a morte celular programada em células com mutações em genes essenciais ao correto funcionamento da célula, conferindo-lhes uma maior capacidade de proliferação e menor capacidade de diferenciação e de sofrer apoptose [60]. Para que a função destes genes seja comprometida, como acontece em tecidos cancerígenos, normalmente, é necessário que ocorram mutações nos dois alelos que codificam o gene, induzindo a perda de função na proteína resultante; no entanto existem mutações nomeadas de dominante-negativas que dão origem a uma proteína que tem a capacidade de bloquear a função da proteína normal [60, 62–64].

Na maioria dos casos, a UPF1 atua como um supressor de tumor cuja expressão é diminuída, por exemplo no cancro hepatocelular [47–50], em tumores miofibroblásticos inflamatórios [55], em gliomas [57], entre outros [51–54, 56, 58]. O *knockdown* do gene da UPF1 nestes tipos de cancro conduz ao aumento da proliferação celular, invasão e migração das células cancerígenas enquanto a sua sobreexpressão diminui estes acontecimentos; no cancro hepatocelular, adicionalmente, induz a apoptose destas células [48, 51, 52, 56]. Na literatura, a função da UPF1 como supressor de tumor vem várias vezes associada a esta ser um fator essencial no mecanismo de NMD, visto que, como mencionado na secção 1.2, este permite a degradação de transcritos aberrantes e atua também na regulação da expressão génica [65, 66]. Adicionalmente, o papel da UPF1 na supressão da transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), através da via de sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*), constitui um dos fatores de regulação na progressão da tumorigénese visto que a EMT contribui para a metastização do tumor [49, 51, 52, 67, 68].

No entanto, no cancro colorretal (CRC, do inglês *colorectal cancer*), a UPF1 desempenha funções oncogénicas, incluindo na regulação da EMT [43–45, 69]. Em 2021, Chen *et al.* descobriram que a UPF1 poderia ativar o processo de EMT no CRC, levando ao aumento de metástases [69]. Os resultados

deste estudo permitiram também averiguar que o *knockdown* do gene da UPF1 suprime os comportamentos biológicos malignos das células de CRC através do desencadeamento de danos no DNA e que a elevada expressão de *UPF1* promove o crescimento celular e metástase de células malignas do CRC [69]. Anteriormente a este estudo, em 2018, Bokhari *et al.* descobriram que o nível de expressão de *UPF1* é superior em células do CRC primário com instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*) em comparação com células de CRC com estabilidade de microssatélites (MSS, do inglês *microsatellite stability*) [45]. Além disso, a inibição da UPF1 causou diminuição da proliferação celular nas linhas celulares com MSI de CRC, enquanto nenhum efeito foi observado nas linhas celulares MSS de CRC [45]. No ano seguinte, Bordonaro *et al.* revelaram que a sobreexpressão de *UPF1* aumenta a atividade de *Wingless-related integration site* (Wnt) mediada por butirato, um produto derivado da fermentação da fibra dietética no lúmen do cólon, o que se correlaciona com a inibição da indução da apoptose no CRC na medida em que a hiperativação da sinalização Wnt induz o butirato a inibir a histona desacetilase (HDACi), que induz a apoptose das células de CRC [44].

1.4. Potencial terapêutico: terapêuticas baseadas em RNA

Atualmente, o tratamento aplicado em pacientes com CRC é definido consoante o estágio em que este se encontra, sendo que nos estádios I e II o mais usualmente aplicado é a resseção cirúrgica; no estágio III, os pacientes podem ser sujeitos a cirurgia e quimioterapia adjuvante para diminuir o risco de recorrência; e no estágio IV, o principal tratamento para o cancro colorretal metastático (mCRC, do inglês, *metastatic colorectal cancer*) é a quimioterapia, embora possam ser aplicadas terapias direcionadas [70]. No entanto, esta estratégia terapêutica acarreta complicações, como a resistência a múltiplos medicamentos (MDR, do inglês *multidrug resistance*) e efeitos secundários severos, que comprometem a sua eficácia [71, 72].

Uma das vertentes terapêuticas com elevado potencial para superar as desvantagens dos tratamentos atualmente administrados tem por base o RNA [70]. As terapêuticas com base no RNA apresentam elevada especificidade, elevada potência, baixa toxicidade e uma flexibilidade considerável na modulação de uma ampla gama de alvos terapêuticos [70, 73].

RNA de interferência (RNAi, do inglês *RNA interference*), microRNA, oligonucleótidos antissense (ASO, do inglês *antisense oligonucleotides*), aptâmeros, ribozimas e RNA não codificantes de cadeia longa (lncRNA, do inglês *long non-coding RNA*) são alguns dos vários exemplos de terapêuticas com base no RNA atualmente existentes [70].

1.4.1. Oligonucleótidos antissense

Os ASO são polímeros de nucleótidos sintéticos curtos, de cadeia simples, que são desenhados para hibridar com o seu alvo no núcleo (onde entram por difusão) ou no citoplasma (onde entram por endocitose), através do emparelhamento de bases de Watson-Crick, de modo a evitar a síntese da proteína codificada pelo RNA-alvo [74, 75]. Estes podem atuar em diversos mecanismos, como a tradução e o *splicing*, ou até mesmo induzir a degradação do mRNA [76]. Paterson *et al.* foram os primeiros a descobrir a potencialidade dos ASO na inibição da tradução ao descobrirem que podiam hibridar o mRNA com seu DNA complementar (cDNA), visto que desta forma não ocorria a síntese de um polipéptido completo [77].

Nos primeiros estudos realizados com ASO que utilizavam desoxirribonucleótidos, verificou-se que estes não têm capacidade de penetrar a membrana plasmática e são bastante sensíveis à degradação por endonucleases e exonucleases, pelo que têm sido quimicamente modificados de modo a superar esses problemas, nomeadamente a substituição de um dos átomos de oxigénio no grupo fosfato por um grupo

enxofre, grupo metil ou aminas, conferindo aos ASO uma maior resistência a nucleases, modificações de alquil na posição 2' da ribose, para criar maior afinidade ao mRNA, maior resistência às nucleases e menor toxicidade e modificações no anel de furanose, em ligações fosfato ou de riboses, bem como de nucleótidos para melhorar a sensibilidade a nucleases, afinidade com o alvo e perfis farmacocinéticos [78, 79].

Vários estudos têm vindo a contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos do cancro colorretal com base em ASO, sendo que alguns estão atualmente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) [70, 80]. No entanto, este ramo da terapêutica ainda está no início do seu desenvolvimento [70, 80]. Um dos focos das terapias com base em ASO no CRC é a via de sinalização de Wnt, tendo atualmente como alvo os lncRNA [81, 82].

Para a realização destes estudos, muitas vezes recorre-se ao uso de substâncias que induzem stresse nas células. A tapsigargina (TG) é uma substância utilizada como um indutor de stresse do retículo endoplasmático (RE), que inibe irreversivelmente as ATPases intracelulares envolvidas no transporte do ião cálcio (Ca^{2+}) e promove a rápida diminuição deste ião no RE [83]. Em células que apresentam stresse do RE, a tradução canónica é comprometida devido à fosforilação do eIF2 α e ao não funcionamento da cinase mTOR, o que conduz a um aumento da atividade de IRES [84, 85].

O estudo da tradução não-canónica da UPF1 e da sua relevância na tumorigénese do CRC contribui para o conhecimento do funcionamento e expressão de uma proteína que apresenta um papel oncogénico neste cancro e, conseqüentemente, permite abrir caminho para novas abordagens terapêuticas com a finalidade de aumentar a taxa de sucesso de tratamento do cancro colorretal sem acarretar as desvantagens das terapias atualmente aplicadas.

1.5. Objetivos

Uma vez que a UPF1 contribui para o desenvolvimento do cancro colorretal e que a tradução desta proteína pode ser mediada por IRES (conforme referido nas secções 1.1.1.2, 1.2 e 1.3), o objetivo principal deste projeto é aferir se ocorre tradução mediada por IRES da proteína UPF1 nas células de CRC e compreender em que medida é que este mecanismo associado à proteína em estudo contribui para o aparecimento e progressão do cancro colorretal. Para alcançar este objetivo, foram definidas várias tarefas:

- 1) Análises *in silico* da expressão da UPF1 ao nível do RNA e da proteína, de modo a analisar como variam os seus níveis em tecidos de diferentes tipos de cancro e entre tecidos de CRC e tecidos normais do cólon;
- 2) Análise da expressão da UPF1 endógena, com o objetivo de avaliar a variação dos níveis de mRNA e proteína em diferentes linhas celulares de CRC e em comparação com células normais do colon em condições em que a tradução canónica é inibida por indução de stresse do retículo endoplasmático;
- 3) Utilização de ASO para bloquear a tradução dependente de IRES e avaliação da proliferação celular e a apoptose em diferentes linhas celulares;
- 4) Avaliação da importância da tradução dependente de IRES no NMD e no ciclo celular.

2. Métodos

2.1. Análises in silico

A fim de se proceder a uma análise da expressão da proteína UPF1 em vários tipos de cancro e entre tecidos cancerígenos e não cancerígenos do cólon, recorreu-se à plataforma Xena [86], onde foram feitos testes não paramétricos, e aos dados provenientes do estudo de Zhou *et al.* (2020), que realizou análises proteómicas de diversas proteínas em 16 tipos de cancro [87]. Tendo em consideração que estes dados não estão associados à plataforma Xena, foi necessário importá-los utilizando a opção “View my data”. Nesta opção os dados contidos neste ficheiro são categorizados como dados fenotípicos. Após a importação do ficheiro, os dados são filtrados consoante as análises, tendo sido inicialmente excluídas as amostras correspondentes aos tecidos que não são de rim, fígado, estômago, útero, cólon, pulmão e todas as amostras correspondentes a tecidos não cancerígenos, de modo a proceder à análise dos padrões de expressão da UPF1 em diferentes tipos de cancro. De seguida, recorreu-se à função “Chart & Statistics” para realizar a análise estatística dos dados da expressão da UPF1 consoante o sítio primário dos cancros em estudo. As análises realizadas para os padrões de expressão da UPF1 em tecidos normais e cancerígenos do cólon foram procedidas da mesma forma, exceto na filtragem, onde foram excluídos todos os dados referentes aos tecidos não correspondentes ao cólon, mantendo apenas os dados relativos a tecidos normais e cancerígenos do cólon.

Através da plataforma Xena [86], foi também realizada uma análise da expressão de mRNA de *UPF1* (a) em vários tipos de cancro, (b) entre linhas celulares cancerígenas e não cancerígenas do cólon e (c) em tecidos do cólon com instabilidade de microssatélites (MSI) e com estabilidade de microssatélites (MSS), com recorrência a dados provenientes de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) [88] e do *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) [89], disponibilizados pela plataforma Xena [86]. Visto que os dados estavam disponíveis na plataforma, para proceder às análises foi apenas necessário escolher a coorte (TCGA TARGET GTEx para as análises da expressão em diferentes tipos de cancro e em tecidos cancerígenos e normais do cólon; TCGA Colon and Rectal Cancer para a análise dos padrões de expressão entre MSI e MSS) e o gene *UPF1*. Os procedimentos seguintes são os mesmos que os referidos no parágrafo anterior, após a importação do ficheiro.

2.2. Cultura de células

As linhas celulares NCM460 (células epiteliais da mucosa do cólon humano normal) e HT29 (células do adenocarcinoma primário do cólon humano) foram cultivadas com o meio Roswell Park Memorial Institute–1640 (RPMI; Gibco, Thermo Fisher), as HCT116 (linha celular de adenocarcinoma colorretal em fase pré-metastática) foram cultivadas com o meio McCoy’s 5A (Gibco, Thermo Fisher) e as SW480 (células do adenocarcinoma primário isoladas do intestino grosso humano) foram cultivadas com o meio Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher), em incubadores de células a 37 °C com uma atmosfera húmida com 5 % de dióxido de carbono (CO₂). Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher). As células foram plaqueadas em placas de 6 poços, de modo que a confluência celular seja cerca de 100 % quando o tratamento com TG for realizado (Sigma-Aldrich), o que corresponde a 20×10⁶ células na linha celular NCM460, 45×10⁶ células nas HT29 e 30×10⁶ células nas HCT116 e nas SW480.

2.3. Tratamento com tapsigargina

As células foram tratadas com 1 μM de tapsigargina (Sigma-Aldrich) e recolhidas 16 h, 20 h, 22 h e/ou 24 h após o tratamento, consoante a experiência. Em paralelo, as células foram tratadas com o respetivo veículo, dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), e recolhidas em simultâneo com as células expostas à TG.

2.4. Quantificação de proteína total

Das amostras obtidas nos ensaios de 20 h, 22 h e 24 h de exposição à TG (Sigma-Aldrich), foi retirado 1 μl e diluído 1:10 em água bidestilada para ser submetido a ensaios de quantificação de proteína pelo método de PierceTM 660nm Protein Assay (Thermo Fisher) [90]. Adicionalmente, para obter a reta de calibração, foram preparadas soluções *standard* com albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*, Biolabs) a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, diluída 1:10 em água bidestilada. A preparação das soluções *standard* passa pela diluição em água bidestilada da solução de BSA previamente diluída, de modo que as soluções apresentem as seguintes concentrações de BSA: 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Os restantes procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Após os resultados da quantificação, as amostras das quais se retirou inicialmente 1 μl foram diluídas de modo que a quantidade de proteína total de cada amostra submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês, *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) seja aproximadamente a mesma.

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio e Western blot

Os lisados celulares, previamente suspensos em tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) e aos quais foi adicionado *SDS-PAGE Sample Loading Buffer* (NZYTech), foram desnaturados a 95 °C por 10–15 min. As proteínas desnaturadas foram separadas de acordo com o peso molecular, por SDS-PAGE, num gel com 10 % de poliacrilamida (Bio-Rad) durante ~ 2 h. Depois, as proteínas foram transferidas, durante ~ 90 min, para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*; Bio-Rad) previamente ativadas com metanol (Honeywell) e hidratadas com água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com corante azul de Coomassie (Tabela S1), posteriormente removido com uma solução de *destaining* (Tabela S1). Em paralelo, foi preparada uma solução de *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBS-T) composta por 1x (v/v) *Tris-buffered saline* (TBS, Tabela S1) e 0,05 % (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich). Após a remoção do Coomassie (Tabela S1), as membranas foram bloqueadas durante 1 h com 5 % (m/v) de BSA (NZYTech) diluído na solução de TBS-T e, de seguida, foram incubadas durante a noite, a 4 °C, com os anticorpos primários específicos para detetar a UPF1 endógena, a quantidade de eIF2 α -fosforilado e a α -tubulina para o controlo da quantidade total de proteína carregada no gel (Tabela 2.1). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram sujeitas a três lavagens de 5–10 min com a solução de TBS-T. De seguida, foram incubadas com os anticorpos secundários, consoante a espécie em que o anticorpo primário utilizado foi produzido (Tabela 2.1), à temperatura ambiente, por 1 h em agitação suave, e, posteriormente, foram realizadas três lavagens de 5–10 min com a solução de TBS-T. Por fim, para se proceder à deteção das proteínas, foram realizados ensaios de quimioluminescência (ECL, do inglês *Enhanced Chemiluminescence*; Tabela S1).

Tabela 2.1 Lista de anticorpos utilizados no Western blot.

Anticorpos primários e secundários utilizados no Western blot para detetar a UPF1, o eIF2 α , o eIF2 α -fosforilado e a α -tubulina, respetivas diluições e composição das soluções nas quais os anticorpos foram diluídos.

	Anticorpo	Espécie	Diluição	Marca	Solução de diluição
Primário	Anti-UPF1	coelho	1:500	Cell signaling	5 % (m/v) de BSA (NZYTech) diluído em 1x (v/v) TBS e 0,05 % (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich)
	Anti-eIF2 α	coelho	1:500		
	Anti-eIF2 α -fosforilado	coelho	1:250	Invitrogen	
	Anti- α -tubulina	rato	1:50000	Sigma-Aldrich	
Secundário	Anti-coelho IgG	cabra	1:3000	Bio-Rad	5 % (m/v) de leite em pó magro diluído em 1x (v/v) TBS e 0,05 % (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich)
	Anti-rato IgG	cabra	1:4000		

2.5.1. Remoção dos anticorpos das membranas e deteção do eIF2 α total

As membranas secas foram reativadas com metanol (Honeywell) e foram removidos os anticorpos utilizados para detetar o eIF2 α -fosforilado. De seguida, estas foram bloqueadas com a solução de BSA (cuja constituição está descrita na secção 2.5), à temperatura ambiente, durante 30 min. Em seguida, estas foram incubadas durante a noite com anticorpos primários específicos para detetar a quantidade de eIF2 α total (Tabela 2.1). Após a incubação, os procedimentos são os mesmos que os descritos na secção 2.5.

2.6. Quantificação da intensidade das bandas do eIF2 α e do eIF2 α fosforilado

Através do programa *ImageJ* [91], foi realizada a quantificação da intensidade das bandas do eIF2 α e do eIF2 α fosforilado. De seguida, foi calculada a razão entre o eIF2 α e o eIF2 α fosforilado de cada amostra e os valores da condição de stresse foram normalizados aos valores da condição de controlo.

2.7. Extração de RNA

Os lisados celulares foram incubados em 1 ml de Trizol (Thermo Fisher) e, posteriormente, foram sujeitos a separação de fases, por incubação com 200 μ l de clorofórmio, da qual se extraiu a fase aquosa, que contém o RNA total. De seguida, o RNA foi isolado por precipitação com 500 μ l de isopropanol (Honeywell), tendo sido descartada a fase aquosa. Após este processo, foram feitas duas lavagens nas quais o RNA foi ressuscitado em 1 ml de etanol a 75% (Tabela S1), novamente precipitado e sujeito a secagem. Após a secagem, este foi ressuscitado em água sem RNAses e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop One da Thermo Fisher), de acordo com os protocolos do instrumento.

2.8. Síntese de cDNA e transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

O cDNA foi sintetizado com uma transcritase reversa (NZYTech), usando 1 μ g de RNA total e *random hexamers* (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante. Paralelamente, e como controlo negativo, as amostras foram sujeitas à mesma reação, mas sem transcritase reversa. A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR, do inglês, *Reverse Transcription coupled to Real-Time Polymerase Chain Reaction*) foi feita em placas de 96 poços, com NZY Supreme qPCR Green Master Mix (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando *primers* para detetar os níveis de expressão de *UPF1* e de *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*),

o controlo endógeno. Como controlo negativo do RT-qPCR, foram preparadas reações em dois poços (um com os *primers* de *UPF1* e outro com os *primers* de *GAPDH*) aos quais se adicionaram todos os componentes utilizados, exceto cDNA. Adicionalmente, para cada amostra, foram feitos três replicados técnicos. Os *primers* utilizados para detetar os transcritos encontram-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Lista de *primers* utilizados no RT-qPCR.

Sequências dos *primers* utilizados no RT-qPCR para detetar os níveis de expressão do *UPF1* e do controlo endógeno *GAPDH*.

Transcrito	Sequência	
<i>UPF1</i>	<i>Forward</i>	5' – CCTCGGTGTCTGGCTACATC – 3'
	<i>Reverse</i>	5' – GCACAGTCTTCACGGCATAA – 3'
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	5' – CCATGAGAAGTATGACAACAGCC – 3'
	<i>Reverse</i>	5' – GGGTGCTAAGCAGTTGGTG – 3'

3. Resultados

3.1. Análises *in silico*

Visto que a *UPF1* apresenta funções oncogénicas no CRC e funções supressoras de tumor na maioria dos cancros (secção 1.3), põe-se em questão se existe correlação entre a sua expressão e o tipo de função que esta proteína desempenha. Assim, de modo a estudar a expressão da *UPF1*, foram realizadas análises *in silico* para comparar os níveis de expressão da proteína e do transcrito em diferentes tipos de cancro e, no caso de tecidos colorretais, comparar também tecidos de CRC relativamente ao respetivo tecido normal. Adicionalmente, foi analisada a expressão de mRNA consoante a presença de MSI ou MSS no CRC, no entanto, devido à indisponibilidade de dados, não foi possível realizar a mesma análise para a expressão da proteína.

3.1.1. Expressão da proteína *UPF1*

3.1.1.1. Os padrões de expressão da *UPF1* em CRC apresentam valores geralmente superiores e menor diversidade em relação a outros cancros

As análises dos resultados obtidos através da plataforma Xena [86] que constam na Figura 3.1 foram realizadas com o intuito de analisar como varia a expressão da *UPF1* em diferentes tipos de cancro. Estes resultados encontram-se agrupados consoante o sítio primário, e os valores de expressão da proteína são apresentados em unidades arbitrárias da variação de expressão no log2.

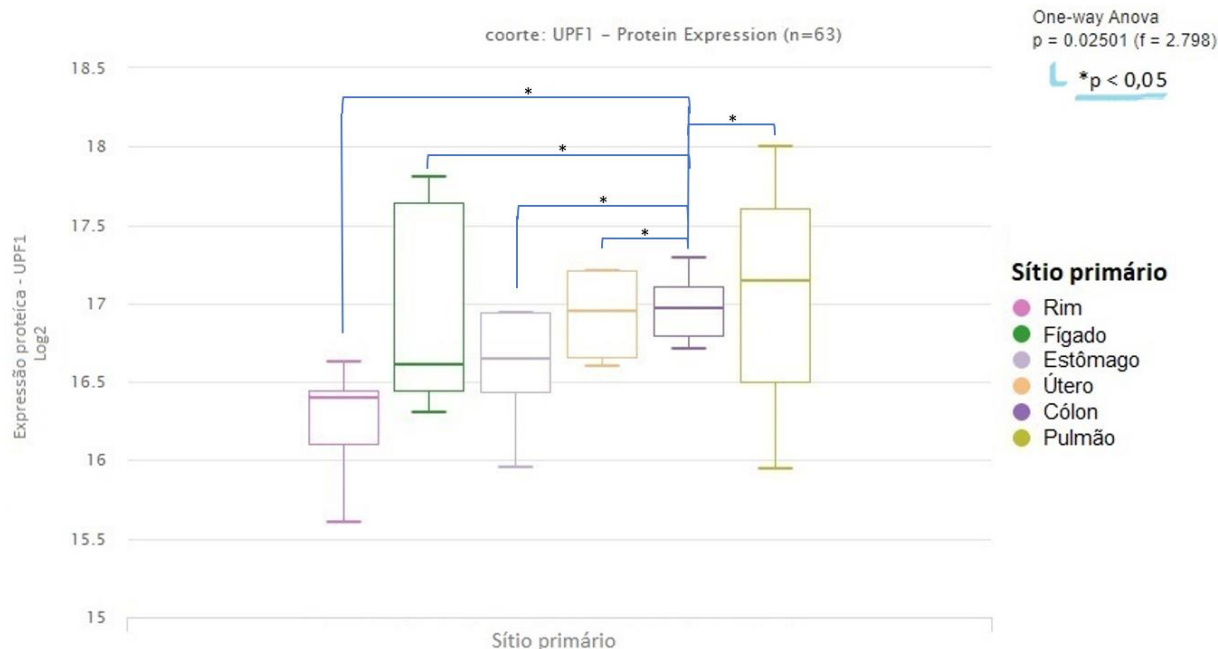


Figura 3.1. O cancro colorretal apresenta níveis de expressão da proteína UPF1 geralmente superiores e de menor variabilidade em comparação com outros tipos de cancro.

Boxplot comparativo dos níveis de expressão da UPF1 em cancros no rim, fígado, estômago, útero, cólon e pulmão, apresentados por esta ordem. Os níveis de proteína de 63 amostras, provenientes do estudo de Zhou *et al.* (2020), que realizou análises proteómicas de diversas proteínas em 16 tipos de cancro [87], foram obtidos de análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e são apresentados em unidades arbitrárias da variação de expressão no \log_2 . $p < 0,05$.

Nos resultados apresentados na Figura 3.1, é possível concluir que, de um modo geral, o CRC apresenta níveis de expressão de UPF1 superiores aos valores apresentados pela maioria dos cancros em estudo. Esta conclusão é sustentada não só pelo valor mínimo dos níveis de proteína neste cancro (16,7) ser superior aos valores mínimos apresentados pelos restantes cancros em análise (16,6 para o útero, 16,3 para o fígado, 15,9 para o pulmão e estômago e 15,6 para o rim), mas também por este apresentar o valor mais elevado do primeiro quartil (16,8), seguido do útero (16,6), pulmão (16,5), fígado e estômago, que apresentam ambos 16,4, e, por fim, o rim, que apresenta o nível de expressão do primeiro quartil mais baixo (16,1). Adicionalmente, o valor da mediana dos níveis de proteína no cólon é o segundo mais elevado (17) nos cancros em estudo, sendo esta apenas inferior à mediana do cancro do pulmão (17,1). O rim apresenta novamente o menor valor (16,4), pelo que o estômago e o fígado apresentam ambos o valor de mediana correspondente a 16,6 e, no útero, a mediana corresponde a 16,9. Porém, o valor do terceiro quartil apresentado no cólon (17,1) é inferior aos níveis de proteína do terceiro quartil no útero (17,2), no fígado e no pulmão (17,6 para ambos os cancros, correspondente ao valor mais elevado), mas superior ao do estômago (16,9) e do rim (16,4). O valor máximo da expressão no cólon (17,3) está entre os mais elevados, visto que é superior ao do útero (17,2), ao do estômago (16,9) e do rim (16,6), mas é inferior ao valor máximo do fígado (17,8) e do pulmão (18).

A amplitude dos níveis de expressão da proteína no CRC, dada pela diferença entre o valor máximo e o valor mínimo de expressão da UPF1 e cujo valor corresponde a 0,6, é inferior à amplitude de todos os restantes cancros em estudo (1 para o rim e estômago, 1,5 para o fígado e 2,1 para o pulmão) exceto o útero, que apresenta o mesmo valor (0,6). Adicionalmente, o valor da amplitude interquartil, resultante da subtração entre os valores do primeiro e do terceiro quartis, é também inferior no CRC (0,3) em comparação com os restantes cancros em estudo (0,5 para o estômago, 0,6 para o útero, 1 para o pulmão e 1,2 para o fígado), exceto o rim, que apresenta o mesmo valor (0,3). Assim, é possível concluir que o CRC apresenta menor variabilidade nos níveis de expressão da proteína, notando que esta variabilidade não é influenciada pelo número de amostras em estudo.

3.1.1.2. Os níveis de expressão da UPF1 são superiores em tecidos de CRC do que em tecidos normais do cólon

Recorrendo aos mesmos dados [87] e à mesma plataforma [86], foi feita uma comparação dos níveis de expressão da proteína UPF1 entre tecidos cancerígenos e tecidos normais do cólon. Os resultados obtidos na plataforma Xena [86] estão representados na Figura 3.2, sendo que os valores apresentados se encontram em unidades arbitrárias da variação de expressão no \log_2 .

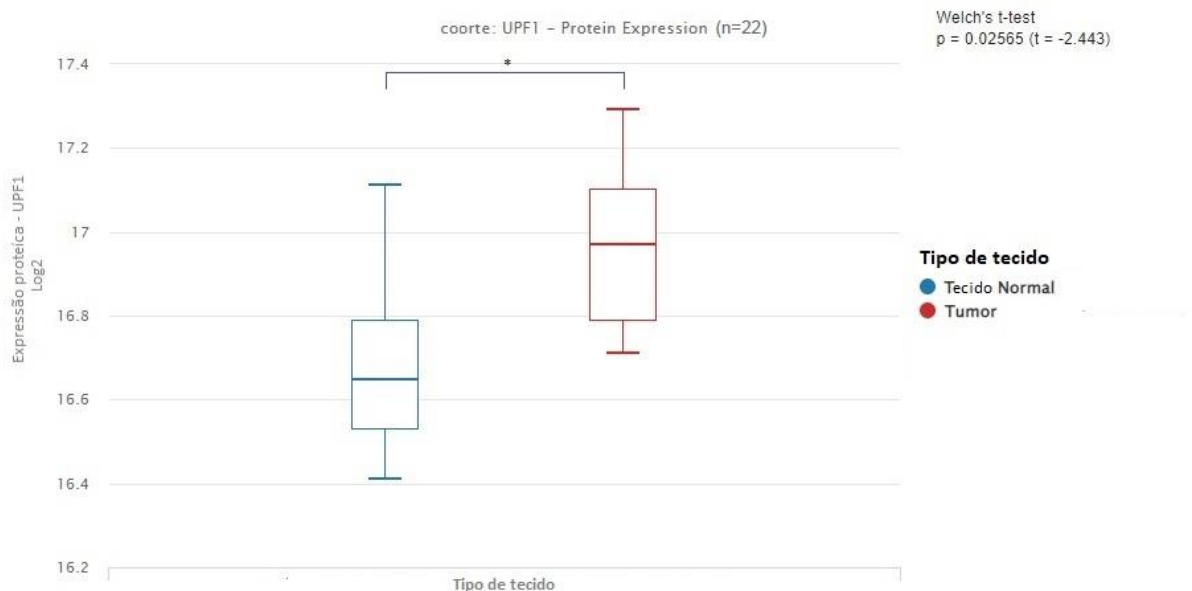


Figura 3.2. Os padrões de expressão da proteína UPF1 no cólon são inferiores em tecidos normais do que em tecidos cancerígenos. *Boxplot* comparativo da expressão da proteína UPF1 em tecidos normais e cancerígenos do cólon. Os dados da expressão da proteína, provenientes do estudo de Zhou *et al.* (2020), que realizou análises proteômicas de diversas proteínas em 16 tipos de cancro [87], correspondem a 22 amostras submetidas a análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e são apresentados em unidades arbitrárias da variação de expressão no \log_2 . $p < 0,05$.

Através dos resultados apresentados na Figura 3.2, é possível concluir que os níveis de expressão da UPF1 são significativamente superiores em tecidos cancerígenos do cólon, em comparação com os níveis dos respectivos tecidos normais, visto que 75% dos valores de expressão de proteína em tecidos de CRC são superiores aos valores obtidos nos tecidos normais. Adicionalmente, o valor mínimo, em tecidos cancerígenos, é também superior (16,7) ao valor apresentado em tecidos normais do cólon (16,4), tal como o valor do primeiro quartil (16,8 para tecidos CRC e 16,5 para tecidos normais), da mediana (17 para tecidos CRC e 16,6 para tecidos normais), do terceiro quartil (17,1 para tecidos CRC e 16,8 para tecidos normais) e do valor máximo (17,3 para tecidos CRC e 17,1 para tecidos normais).

A variabilidade dos valores é bastante semelhante, sendo que a amplitude interquartil é igual para ambos os tipos de tecido (0,3) e a amplitude dada pela diferença entre os valores máximo e mínimo do tecido normal é de 0,7 sendo superior à amplitude dos tecidos de CRC (0,6).

Dada a indisponibilidade de dados relativos aos padrões de expressão da UPF1 entre MSI e MSS, não foi possível realizar a análise dos mesmos.

3.1.2. Expressão do transcrito *UPF1*

Após a identificação dos elevados níveis de expressão da UPF1 no CRC, foram feitas análises dos padrões de expressão do transcrito de modo a verificar se estes acompanham os padrões de expressão da proteína.

3.1.2.1. Os padrões de expressão do transcrito *UPF1* apresentam valores geralmente superiores e menor variabilidade no CRC em relação a outros câncros

Com o intuito de analisar como varia a expressão de mRNA de *UPF1* em diferentes tipos de cancro, foram feitos testes não paramétricos com os dados da coorte TCGA TARGET GTEx [92] disponibilizados pela plataforma Xena [86]. Os resultados da análise da expressão do *UPF1* em diferentes tipos de cancro, agrupados consoante o sítio primário, estão representados na Figura 3.3, sendo que os valores analisados se encontram nas unidades $\log_2(\text{norm_count}+1)$.

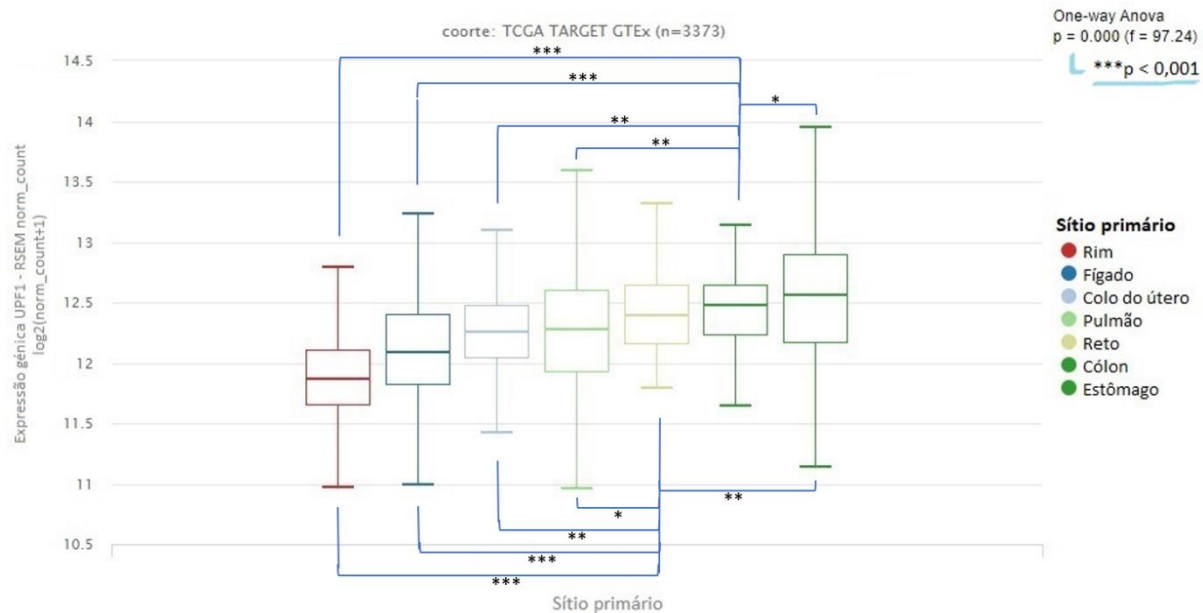


Figura 3.3. Os níveis de expressão do mRNA de *UPF1* são geralmente superiores e de menor variabilidade no cancro colorretal, em comparação com outros tipos de cancro.

Boxplot comparativo dos níveis de mRNA de *UPF1* em tecidos cancerígenos do rim, fígado, colo do útero, pulmão, reto, cólon e estômago, apresentados por esta ordem. Os níveis de mRNA, provenientes do estudo TCGA TARGET GTEx num total de 3373 amostras, foram obtidos de análises de RNA *deep sequencing* (RNA-seq) [92] e são apresentados em $\log_2(\text{norm_count}+1)$. $p < 0,001$.

De um modo geral, no CRC (correspondendo aos *boxplots* do cólon e do reto da Figura 3.3), os níveis de mRNA de *UPF1* são superiores, na medida em que os valores mínimos do cólon (11,6) e do reto (11,8) são superiores aos valores mínimos do colo do útero (11,4), estômago (11,1), rim (11), fígado (11) e pulmão (11). Adicionalmente, as medianas dos níveis de mRNA de *UPF1* em tecidos cancerígenos do cólon (12,5) e do reto (12,4) são superiores aos dos restantes tecidos cancerígenos em estudo (11,9 para o rim, 12,1 para o fígado, 12,3 para o colo do útero e para o pulmão), excetuando os tecidos do estômago, que apresentam a mediana mais elevada (12,6). No entanto, é possível observar que os valores máximos do pulmão (13,6) e do estômago (13,9) são superiores ao valor máximo da expressão do *UPF1* nos tecidos cancerígenos do reto (13,3) e do cólon (13,1) e os valores máximos dos restantes câncros em estudo, exceto o rim (12,8), são superiores ou iguais ao valor apresentado para o cólon (13,2 para o fígado e 13,1 para o colo do útero). Porém, os valores do terceiro quartil acompanham a mesma tendência crescente apresentada na mediana, sendo que o estômago apresenta o valor mais elevado (12,9) seguido do cólon, reto e pulmão, que apresentam o mesmo valor (12,6), colo do útero (12,5), fígado (12,4) e, por fim, o rim apresenta o valor mais baixo (12,1).

O CRC apresenta uma menor amplitude de níveis de mRNA de *UPF1* em comparação com os restantes câncros analisados, visto que a subtração entre o valor máximo e o valor mínimo dos valores de expressão dos tecidos do cólon e do reto é inferior (1,5 tanto para o cólon como para o reto), enquanto o cancro do estômago apresenta a maior amplitude de níveis de mRNA de *UPF1* (2,8). A amplitude

interquartil de cada *boxplot* está de acordo com os resultados obtidos na amplitude entre o máximo e o mínimo, exceto o fígado, que apresenta o mesmo valor que o cólon e o reto e, portanto, o menor valor (0,4), e o pulmão, que apresenta o mesmo valor do estômago e, portanto, o maior valor (0,7). Assim, é possível observar que, em geral, o CRC apresenta menor diversidade de níveis de mRNA de *UPFI* e o cancro do estômago apresenta maior diversidade, sendo que esta variabilidade não é influenciada pelo número de amostras em estudo.

Com base nesta análise, é possível concluir que os valores de expressão do mRNA de *UPFI* no CRC são, na sua maioria, superiores aos valores dos cancros que não apresentam elevada diversidade de níveis de mRNA de *UPFI* (todos exceto o estômago e pulmão), considerando que, apesar do valor máximo no cólon (13,1) ser inferior ao do fígado (13,2) e igual ao do colo do útero (13,1), o valor máximo do reto é superior a estes três (13,3).

Comparando os resultados da Figura 3.3 com os resultados da Figura 3.1, é possível verificar que os níveis de expressão de mRNA estão de acordo com os níveis de expressão da proteína para a maioria dos cancros em estudo. No entanto, excepcionalmente ao referido, o estômago apresenta valores de variabilidade e de expressão de mRNA mais elevados que a maioria dos cancros, mas os valores de expressão de proteína e de variabilidade deste cancro são inferiores a metade dos cancros em estudo. Os níveis de expressão do pulmão correspondem a uma outra exceção, mas de forma inversa ao que se verificou nos valores apresentados pelo estômago, visto que, apesar de os valores do cancro do pulmão apresentarem uma elevada variabilidade, tanto nos níveis de expressão de mRNA como de proteína, a expressão do mRNA neste cancro é inferior à verificada no CRC e no estômago, enquanto a expressão da proteína é a mais elevada em relação aos cancros em estudo.

Da comparação entre os resultados dos níveis de expressão apresentados na Figura 3.1 e na Figura 3.3 é possível concluir que o CRC apresenta elevados níveis de expressão tanto de mRNA como de proteína.

3.1.2.2. Os padrões de expressão de mRNA de *UPFI* são superiores em tecidos CRC do que em tecidos normais do cólon

Com recorrência aos mesmos dados [92] e à mesma plataforma [86], foi feita uma comparação entre tecidos cancerígenos e tecidos normais do cólon de modo a compreender como varia a expressão de *UPFI* nestes dois tipos de tecido. Os resultados estão apresentados na Figura 3.4, sendo que os níveis de mRNA de *UPFI* se encontram nas unidades $\log_2(\text{norm_count}+1)$.

Das 598 amostras analisadas na Figura 3.4, 308 correspondem a tecido normal, 288 são provenientes de tumores primários, 1 tem origem em tumor recorrente e 1 é originário de tecido metastático.



Figura 3.4. Os níveis de expressão do mRNA de *UPF1* em tecidos normais do cólon são inferiores aos dos tecidos cancerígenos.

Boxplot comparativo da expressão de RNA do *UPF1* em tecidos normais e cancerígenos do cólon. Os dados da expressão gênica, provenientes do estudo TCGA TARGET GTEx e com um total de 598 amostras, foram obtidos de análises de RNA *deep sequencing* (RNA-seq) e são apresentados em $\log_2(\text{norm_count}+1)$. $p < 0,001$.

Os resultados demonstram que os níveis de mRNA do *UPF1* são significativamente superiores em tecidos de cancro do cólon do que em tecidos normais do mesmo, visto que 75 % dos dados de expressão em tecido cancerígeno possui valores superiores aos valores da mediana dos tecidos normais (12,2, o mesmo valor do primeiro quartil dos tecidos cancerígenos). Adicionalmente, é possível verificar que a mediana é significativamente superior em tecidos cancerígenos (12,5, em comparação com 12,2 dos tecidos normais), tal como o valor máximo, que corresponde a 13,1 nos tecidos cancerígenos e 12,7 nos tecidos normais.

É ainda de notar que existe maior diversidade no nível de mRNA de *UPF1* no CRC, por apresentar tanto uma maior amplitude, visto que a diferença entre o máximo e o mínimo é de 1,5 comparativamente a 0,9 dos tecidos normais, como também uma maior amplitude interquartil, dada pela diferença entre o primeiro e o terceiro quartil (0,4 em comparação com 0,2 dos tecidos normais). Os valores correspondentes às amostras com origem de tumor recorrente e tecido metastático correspondem, respetivamente, a 12,5 e 12,7, pelo que não acrescentam variabilidade aos valores obtidos nas amostras de tumores primários.

Assim, comparando a análise dos resultados apresentados na Figura 3.2 e na Figura 3.4, é possível concluir que os níveis de expressão de mRNA e de proteína são superiores em tecidos cancerígenos do cólon em comparação com os respetivos tecidos normais.

3.1.2.3. A diferença entre os padrões de expressão de *UPF1* em MSI e MSS não é significativa

Recorrendo à coorte TCGA Colon and Rectal Cancer (COADREAD) [93] através da plataforma Xena [86], foi feita uma análise dos níveis de mRNA de *UPF1* em MSI comparativamente com MSS. Os resultados encontram-se representados na Figura 3.5, onde os níveis de mRNA são apresentados nas unidades $\log_2(\text{norm_count}+1)$.

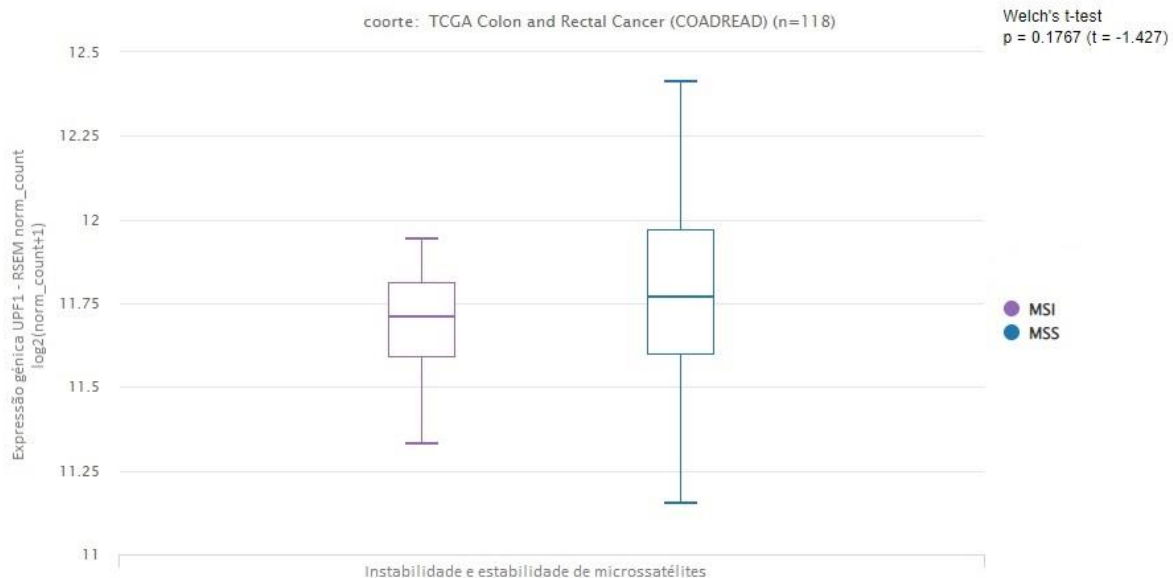


Figura 3.5. A diferença entre os padrões de expressão do transcrito de *UPF1* em tecidos cancerígenos do cólon com instabilidade de microssatélites (MSI) e com estabilidade de microssatélites (MSS) não é significativa.

Boxplot comparativo do nível de mRNA de *UPF1* em tecidos cancerígenos do cólon com instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*) e tecidos cancerígenos do cólon com estabilidade de microssatélites (MSS, do inglês *microsatellite stability*). Os dados da expressão, provenientes do estudo TCGA Colon and Rectal Cancer (COADREAD) e com um total de 118 amostras, foram obtidos de análises de RNA *deep sequencing* (RNA-seq) [92] e são apresentados em $\log_2(\text{norm_count}+1)$.

Os resultados presentes na Figura 3.5 não são estatisticamente significativos ($p = 0,1767$, $n_{\text{MSI}}=11$ e $n_{\text{MSS}}=107$). Em conformidade com a discrepância entre a quantidade de amostras analisadas de MSI e MSS, é possível observar na Figura 3.5 que os tecidos com MSS apresentam uma diversidade nos níveis de mRNA de *UPF1* superior à dos tecidos com MSI (1,2 de amplitude, em comparação com 0,6, e 0,4 de amplitude interquartil, em comparação com 0,2). A mediana dos tecidos com MSS (11,8) é superior à mediana dos tecidos com MSI (11,7), tal como o terceiro quartil (12,0 em comparação com 11,8) e o valor máximo (12,4 em comparação com 11,9). O valor mínimo é inferior em MSS (11,2) do que em MSI (11,3) mas o valor do primeiro quartil é igual para ambos (11,6).

Dada a disparidade no número de amostras entre MSI e MSS, não é possível tirar conclusões dos resultados obtidos.

3.2. Validação experimental da expressão da *UPF1* em linhas celulares de CRC

Com o objetivo de analisar a expressão endógena da *UPF1* em condições de stresse do RE em células de vários estádios do CRC e em células normais do cólon humano, foram feitos ensaios com TG durante diversos tempos de exposição, de modo a identificar o tempo de exposição que proporciona uma maior eficácia da indução do stresse. As amostras provenientes destes ensaios foram submetidas a SDS-PAGE e Western blot, cujos resultados permitem não só analisar a eficácia da indução do stresse como também os níveis de expressão da *UPF1* nestas condições. Adicionalmente, algumas amostras foram também submetidas a RT-qPCR para analisar a expressão do mRNA de *UPF1*.

3.2.1. Após 16 h, 20 h e 24 h de exposição à TG, a expressão da UPF1 mantém-se em condições de stresse do RE e a indução deste é mais eficaz às 20 h e 24 h de tratamento

Para identificar o tempo de exposição que proporciona uma maior eficácia da indução do stresse do RE, foram feitos ensaios com 16 h, 20 h e 24 h de exposição à TG em células NCM460, HT29, SW480 e HCT116, visto que, em resultados previamente obtidos no laboratório, foram realizados ensaios de 16 h e 24 h para induzir este stresse. Os lisados das correspondentes células foram sujeitos a análise por Western blot. Na Figura 3.6 estão representados os resultados obtidos para todas as linhas celulares em estudo. De modo a permitir uma análise mais detalhada da eficiência da indução do stresse, procedeu-se à quantificação das bandas do eIF2 α fosforilado e do eIF2 α por recorrência ao programa *ImageJ* [91]. Dos valores obtidos, foi calculada a razão entre o eIF2 α fosforilado, como marcador de stresse do RE, e o eIF2 α total (Figura 3.6) e, de seguida, os valores da condição de stresse foram normalizados aos valores da condição de controlo (Figura 3.6). Todos os valores apresentados na Figura 3.6 encontram-se em unidades arbitrárias.

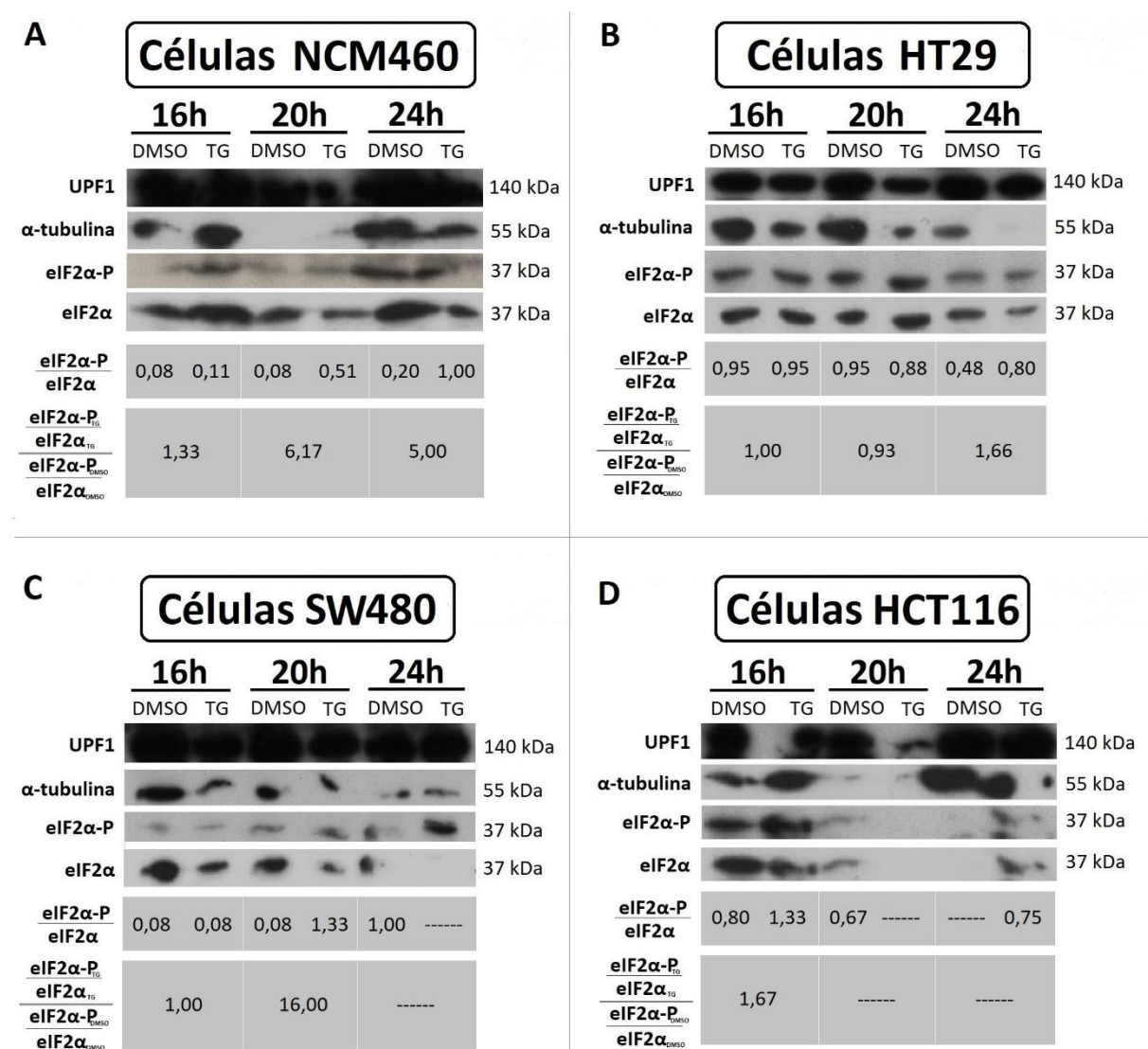


Figura 3.6. A expressão da proteína UPF1 mantém-se em condições de stresse do retículo endoplasmático (RE) e a indução deste stresse é mais eficaz após 20 h e 24 h de exposição à tapsigargina (TG).

As células NCM460 (A), HT29 (B), SW480 (C) e HCT116 (D) foram sujeitas a tratamentos com 1 μ M de tapsigargina (TG) ou com o respetivo veículo – dimetilsulfóxido (DMSO) – como condição de controlo, sendo recolhidas 16 h, 20 h e 24 h após a exposição e submetidas a SDS-PAGE e Western blot. Os valores numéricos apresentados, que correspondem à razão entre o eIF2 α fosforilado e o eIF2 α e a normalização dos valores da condição de stresse em relação aos valores da condição de controlo, encontram-se em unidades arbitrárias e foram calculados com os resultados obtidos na quantificação das respetivas proteínas realizada através do programa *ImageJ* [91].

Os resultados mostram que existe um aumento de eIF2 α fosforilado relativamente ao eIF2 α total, em células sujeitas a tratamento com TG por oposição às células tratadas com DMSO, em todas as linhas celulares testadas, nos tempos de exposição em que a razão é superior a 1 (Figura 3.6), o que indica que a indução de stresse do RE foi efetuada com sucesso. Adicionalmente, a normalização permite verificar em que tempos de exposição a indução do stresse é mais eficaz, na medida em que quanto maior o valor obtido, maior a eficácia.

Assim sendo, a indução do stresse nas células NCM460 (Figura 3.6A) é mais eficaz nas 20 h (6,17) e nas 24 h (5,00) do que nas 16 h (1,33).

Nas células HT29 (Figura 3.6B), a indução do stresse só foi bem-sucedida às 24 h (1,66).

Nas células SW480 (Figura 3.6C) não foi possível obter resultados para as 24 h devido à ausência de resultados relativos ao eIF2 α em células tratadas com TG; no entanto é possível observar um aumento acentuado do eIF2 α fosforilado em células tratadas com TG em comparação com as células tratadas com DMSO neste tempo de exposição, o que sugere que houve indução do stresse do RE. Nos restantes dois tempos de exposição, só ocorreu indução do stresse nas 20 h (16,00, sendo que o valor da normalização das 16 h corresponde a 1,00); contudo, é de notar que esta indução foi bastante eficaz visto que o valor da normalização é o mais elevado em comparação com os restantes.

Por fim, nas células HCT116 (Figura 3.6D), devido ao eIF2 α fosforilado e eIF2 α no tratamento de 20 h com TG e no tratamento de 24 h com DMSO não terem sido detetados, provenientes de problemas técnicos na transferência das proteínas do gel para a membrana, só foi possível obter resultados para o tempo de exposição de 16 h, em que é possível observar que a indução do stresse foi bem sucedida (1,67).

Para analisar a variação da quantidade de UPF1 em diferentes tempos de exposição ao stresse do RE, foi utilizada a α -tubulina como controlo da quantidade total de proteína carregada no gel nas linhas celulares em estudo (Figura 3.6).

Nas células normais do cólon (Figura 3.6A), é possível verificar que a expressão da UPF1 se mantém em condições de stresse do RE nas 16 h e nas 24 h por comparação com as condições de controlo. Não é possível tirar conclusões sobre a diferença verificada nos resultados da UPF1 relativos às 20 h, nestas células, devido à ausência de resultados para a α -tubulina provenientes de problemas técnicos na transferência das proteínas do gel para a membrana.

Já nas células HT29 (Figura 3.6B), é possível verificar que a quantidade relativa de UPF1 expressa se mantém em condições de stresse às 16 h e 20 h de exposição à TG e, apesar da ausência parcial de dados para a α -tubulina em condições de exposição a 24 h de TG, a presença da tênue banda de α -tubulina admite sugerir que a quantidade relativa de UPF1 expressa não diminui em condições de stresse nas 24 h.

Nas células SW480 (Figura 3.6C), é também possível verificar que a quantidade relativa de UPF1 se mantém em condições de stresse às 16 h e 20 h de exposição à TG e sugere que esta também se mantenha às 24 h de exposição.

Por outro lado, nas células HCT116 (Figura 3.6D), é possível verificar que a expressão da UPF1 se mantém em condições de stresse do RE apenas nas 24 h por comparação com as condições de controlo, não sendo possível tirar conclusões sobre a diferença verificada nos resultados da UPF1 relativos às 16 h e às 20 h devido à ausência parcial de resultados provenientes de problemas técnicos na transferência das proteínas do gel para a membrana.

Concluindo, em geral, a indução do stresse é mais eficaz após 20 h e 24 h de tratamento com TG e a expressão da UPF1 mantém-se em condições de stresse do RE nas linhas celulares de CRC em estudo e nas células não tumorigénicas do cólon.

3.2.1.1. A expressão do transcrito *UPF1* é superior nos tecidos de CRC em que o stresse do RE foi induzido com sucesso

Após a análise dos resultados obtidos sobre os níveis de expressão da *UPF1* em condições de stresse do RE, considerou-se pertinente analisar os níveis de expressão dos transcritos de *UPF1* sintetizados nas mesmas condições de stresse. Para tal, as amostras de mRNA analisadas por ensaios de RT-qPCR foram obtidas dos mesmos ensaios realizados para a aquisição das amostras de proteína. Contudo, foram apenas obtidos resultados para as células NCM460 (Figura 3.7A), HT29 (Figura 3.7B) e HCT116 (Figura 3.7C).

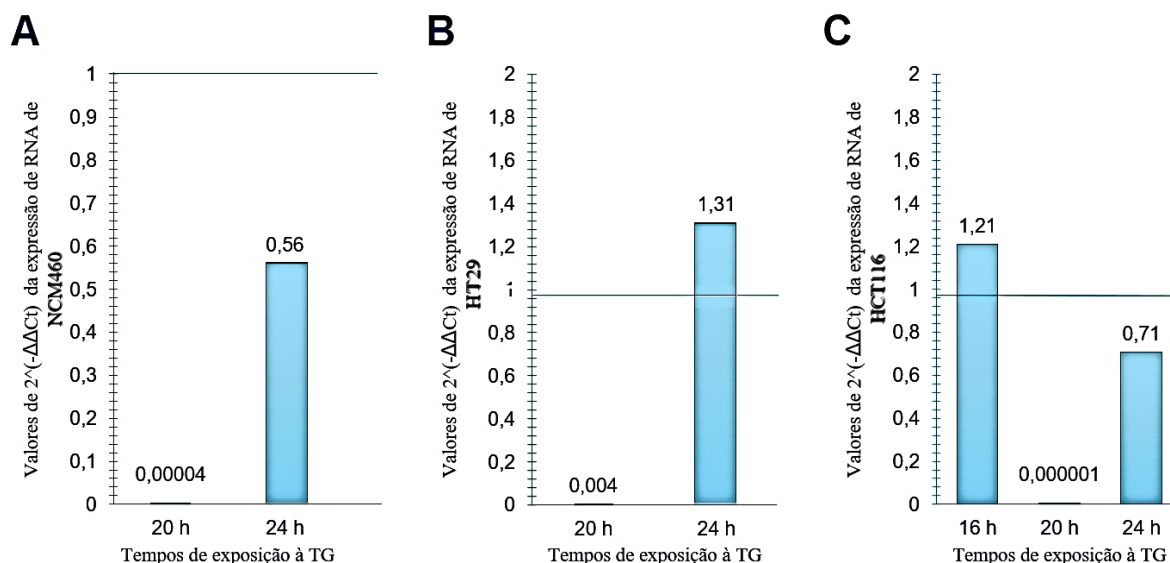


Figura 3.7. Os níveis de expressão do transcrito de *UPF1* são superiores após 24 h de exposição à taspigargina (TG).

As células HCT116 (A), HT29 (B) e NCM460 (C) foram sujeitas a tratamentos com 1 μ M de TG ou com o respetivo veículo – dimetilsulfóxido (DMSO) – como condição de controlo, sendo recolhidas 16 h, 20 h e 24 h após o tratamento. O RNA presente nas amostras obtidas foi extraído e, a partir deste, procedeu-se à síntese de cDNA e qPCR. Da análise dos resultados, recorrendo ao método comparativo do $\Delta\Delta Ct$, foram obtidos os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, apresentados nos gráficos em unidades arbitrárias. A reta horizontal marca o valor de referência para a expressão génica (correspondente a 1), sendo que as barras que ultrapassam a reta indicam a ocorrência de sobreexpressão e as barras que não atingem a reta correspondem à existência de subexpressão. Os gráficos A e B não apresentam resultados para as 16 h devido a não ter sido possível obter dados experimentais.

Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o método comparativo do $\Delta\Delta Ct$ e são apresentados em unidades arbitrárias. É de salientar que, nas amostras das células HT29 expostas à TG durante 20 h, o stresse do RE não foi induzido com sucesso e, nas amostras de HCT116 expostas à TG durante 20 h e 24 h, o sucesso da indução do stresse não foi verificado (secção 3.2.1). A análise efetuada demonstra a existência de subexpressão em todos os tempos de exposição apresentados nas três linhas celulares exceto às 24 h de exposição com TG nas células HT29 e às 16 h nas células HCT116 (que correspondem aos tempos de exposição em que o stresse do RE foi induzido com sucesso nestas células). É ainda de notar que o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das células NCM460 às 20 h (Figura 3.7A) é inferior ao valor obtido nas HT29 (Figura 3.7B) e superior ao valor apresentado nas HCT116 (Figura 3.7C). Já nas 24 h, o valor de expressão do *UPF1* nas células NCM460 (Figura 3.7A) é inferior aos valores obtidos para as HT29 (Figura 3.7B) e HCT116 (Figura 3.7C). Não são apresentados valores de expressão em SW480 nem às 16 h de exposição à TG nas NCM460 e nas HT29 devido a ocorrência de problemas técnicos.

Dado que se realizou apenas uma experiência para obter os resultados apresentados na Figura 3.7, não é possível tirar conclusões estatisticamente significativas relativamente aos níveis de expressão do mRNA nas diferentes linhas celulares.

3.2.2. Após 20 h, 22 h e 24 h de exposição à TG, verificou-se que o tempo de exposição mais eficaz para induzir o stresse do RE varia consoante a linha celular e que os níveis de expressão da UPF1 se mantêm nestas condições

Após os resultados apresentados na Figura 3.6 sugerirem que existe maior eficácia de indução do stresse do RE nas 20 h e nas 24 h, foram feitos ensaios de exposição à TG durante 20 h, 22 h e 24 h com o objetivo de melhor definir o ponto temporal ao qual o stresse do RE é mais eficaz. Os resultados são apresentados na Figura 3.8. Nesta experiência, analisou-se, através de SDS-PAGE e Western blot, a mesma quantidade de proteína total de cada amostra. Para tal, a proteína foi quantificada pelo método de quantificação de Pierce 660 nm Protein Assay [90]. À semelhança dos resultados apresentados na Figura 3.6, a quantidade de eIF2 α fosforilado e de eIF2 α foi quantificada por recorrência ao programa *ImageJ* [91] e, desses valores, foi calculada a razão entre o eIF2 α fosforilado e o eIF2 α e essa razão normalizada entre os valores da condição de stresse e os valores da condição de controlo, de modo a permitir uma análise mais detalhada da eficiência da indução do stresse. Os valores presentes na Figura 3.8 são apresentados em unidades arbitrárias.

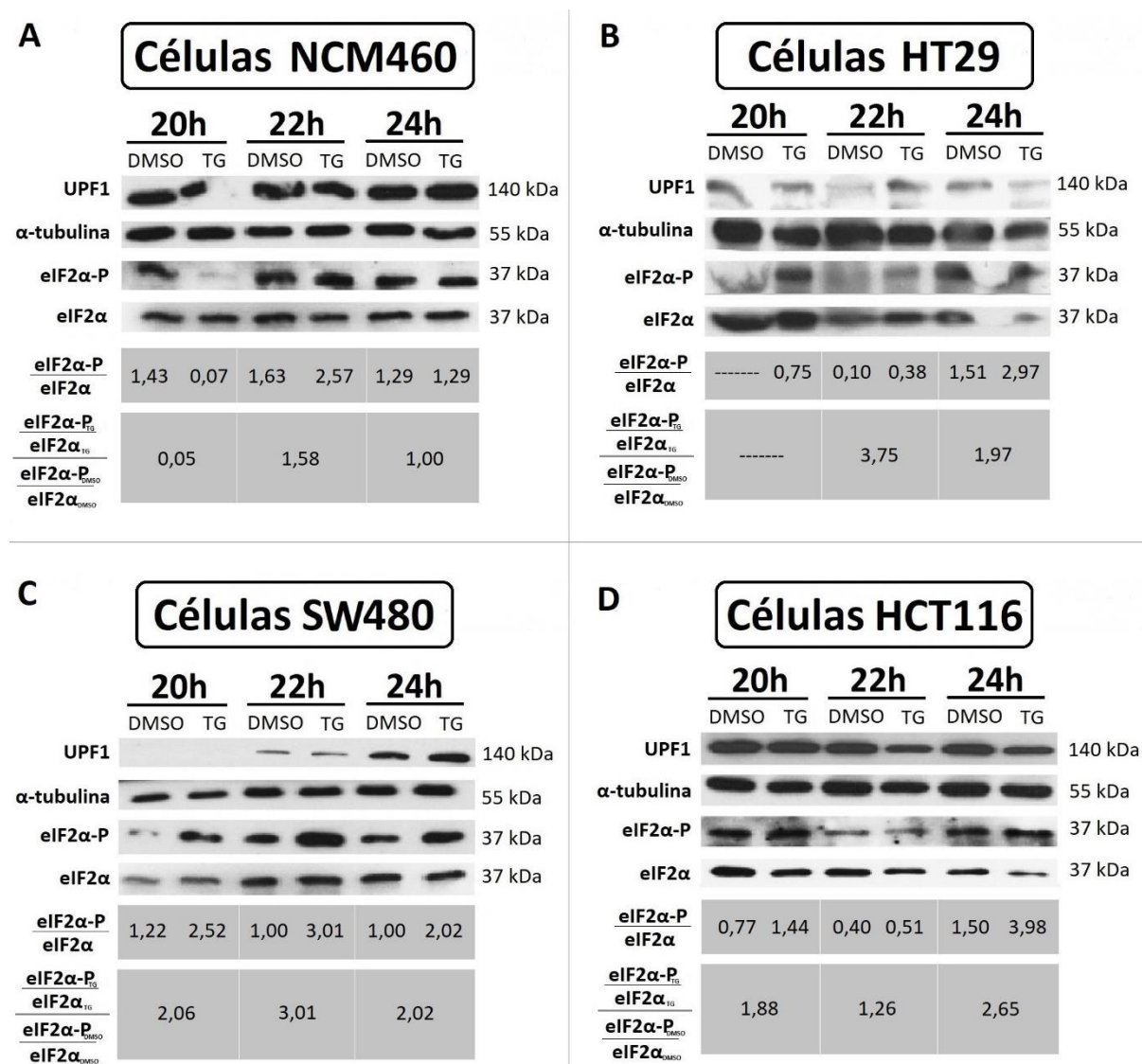


Figura 3.8. O tempo de exposição à tapsigargina (TG) mais eficaz para a indução do stresse do RE difere consoante a linha celular, mas os níveis de expressão da UPF1 mantêm-se nestas condições.

As células NCM460 (A), HT29 (B), SW480 (C) e HCT116 (D) foram sujeitas a tratamentos com 1 μ M de TG ou com o respetivo veículo – dimetilsulfóxido (DMSO) – como condição de controlo, sendo recolhidas 20 h, 22 h e 24 h após o tratamento

com TG. De seguida foi feita a quantificação da proteína total pelo método de Pierce (Pierce 660 nm Protein Assay) [90] e os lisados das diferentes amostras foram submetidos a SDS-PAGE e Western blot. Os valores numéricos apresentados, que correspondem à razão entre o eIF2 α fosforilado e o eIF2 α e a normalização dos valores da condição de stresse em relação aos valores da condição de controlo, encontram-se em unidades arbitrárias e foram calculados com os resultados obtidos na quantificação das respetivas proteínas realizada através do programa *ImageJ* [91].

Do mesmo modo que se procedeu nos ensaios da secção 3.2.1.1, foi feita a análise dos níveis de eIF2 α fosforilado, utilizando o eIF2 α como controlo de quantidade, e dos níveis de UPF1, utilizando como controlo de quantidade a α -tubulina. Adicionalmente foi analisada também a eficácia da indução do stresse do RE, sendo que esta é tanto mais eficaz quanto maior for o valor da normalização.

A Figura 3.8A apresenta os resultados obtidos para as células normais do cólon, onde é possível observar que só ocorreu indução do stresse do RE às 22 h (1,58). Por outro lado, às 20 h, a razão é próxima de 0 devido à grande diferença de intensidade das bandas de eIF2 α fosforilado nas células expostas a TG e nas células expostas a DMSO, possivelmente por ocorrência de problemas técnicos. Adicionalmente, é ainda possível observar que, nas NCM460, ocorre uma diminuição nos níveis de expressão da UPF1 às 22 h de exposição à TG, ao contrário do que se verificou em condições de stresse nos ensaios de 16 h, 20 h e 24 h.

Nas células HT29 (Figura 3.8B), apesar de não terem sido obtidos resultados do eIF2 α fosforilado para as 20 h devido a problemas na transferência, os resultados obtidos após 22 h e 24 h de exposição à TG demonstram que a indução do stresse foi realizada com êxito, sendo mais eficaz nas 22 h (3,75) do que às 24 h (1,97). Por outro lado, os níveis de expressão da UPF1 mantêm-se às 20 h e às 24 h de exposição ao stresse e possivelmente aumentam às 22 h; no entanto seria necessário repetir a experiência para confirmar este aumento.

As células SW480 (Figura 3.8C) apresentam indução do stresse do RE nos três tempos de exposição em estudo, sendo mais eficaz às 22 h (3,01), do que às 20 h (2,06) e às 24 h (2,02). A ocorrência de problemas técnicos durante o Western blot não permite tirar conclusões sobre os padrões de expressão da UPF1 às 20 h, mas é possível verificar que a sua expressão se manteve em condições de stresse do RE quer às 22 h quer às 24 h.

Nas células HCT116 (Figura 3.8D) também ocorreu indução do stresse do RE nos três tempos de exposição à TG, no entanto esta foi mais eficaz nas 24 h (2,65), seguida das 20 h (1,88) e foi menos eficaz nas 22 h (1,26). Por sua vez, os níveis de expressão da UPF1 mantêm-se nas 20 h e parecem também manter-se nas 22 h e nas 24 h.

Em suma, os resultados indicam que o tempo de exposição mais eficaz para a indução do stresse do RE varia consoante a linha celular, sendo que nas células SW480 corresponde a 22 h, tal como nas células NCM460 e nas células HT29. No entanto, nas células HCT116 corresponde a 24 h. Adicionalmente, e à semelhança do que se observou no ensaio das 16 h, 20 h e 24 h (Figura 3.6), os níveis de expressão da UPF1 mantêm-se em condições de stresse do RE nas células cancerígenas mas, ao contrário do que se verificou nos resultados da Figura 3.6A, nas 22 h de exposição à TG nas células NCM460 (Figura 3.8A) ocorreu uma diminuição da expressão da proteína. No entanto, é de salientar que não ocorreu indução do stresse do RE em todos os tempos de exposição, pelo que seria necessário repetir as experiências para verificar a veracidade destes resultados.

4. Discussão

Segundo os dados disponibilizados pelo Global Cancer Observatory, em 2020, o cancro colorretal foi o cancro mais diagnosticado em Portugal e o terceiro cancro com maior incidência no mundo, sendo a segunda causa de morte por cancro, não só em Portugal, mas também a nível mundial [94]. Para diminuir a incidência e a mortalidade deste cancro, é fundamental aumentar os conhecimentos sobre os inúmeros mecanismos que ocorrem nas células cancerígenas, os seus intervenientes e a sua contribuição para o desenvolvimento do CRC. Os mecanismos de iniciação da tradução não-canónica de proteínas potencialmente relevantes no CRC têm vindo a ser estudados no laboratório em que este projeto de dissertação foi realizado. Nestes estudos, e conforme referido na secção 1.2, verificou-se que a 5'UTR da UPF1 tem atividade de IRES que se mantém em condições de stresse, o que indicou que a tradução da proteína em estudo pode ser mediada por esta estrutura secundária de mRNA em condições em que a tradução canónica é comprometida. No entanto, era ainda necessário verificar o seu significado biológico nas células de CRC e compreender a sua relevância na tumorigénese deste cancro. Neste projeto, de um modo geral, os resultados obtidos demonstram que os níveis de expressão da UPF1 são superiores em tecidos de CRC (em comparação com tecidos normais do cólon e com tecidos de diferentes tipos de cancro) e que estes se mantêm em condições em que a tradução canónica está inibida.

As análises *in silico* mostraram que existe uma correlação entre a expressão de mRNA e de proteína e o tipo de função que a UPF1 desempenha num determinado tecido, sendo que os padrões de expressão são superiores quando esta exerce funções oncogénicas. Em células cancerígenas, os oncogenes aumentam a vantagem seletiva das mesmas e os genes supressores de tumor sofrem mutações que comprometem a função das proteínas resultantes, o que induz um aumento dos níveis de expressão de oncogenes e uma diminuição dos níveis de expressão de genes supressores de tumor [60, 61]. Assim, de um modo geral, estes resultados corroboram os estudos que definem que a UPF1 desempenha funções oncogénicas no cancro colorretal [43–45, 69], sobretudo em comparação com a maioria dos cancros em estudo, nos quais a literatura descreve que a UPF1 desempenha funções supressoras de tumor [47–52, 54–58].

A reforçar a concordância entre os resultados das análises *in silico* e a literatura, nos estudos em que expressão da UPF1 foi modelada por sobreexpressão [44], subexpressão ou *knockdown* [45, 69], em tecidos de CRC, verificou-se que o aumento dos níveis de expressão de mRNA e proteína de UPF1 contribui para um aumento da progressão deste cancro, enquanto a sua diminuição ou supressão contribui para uma diminuição ou supressão dos comportamentos biológicos malignos das células de CRC, o que se encontra em conformidade com os resultados que comparam os níveis de expressão em tecidos normais e cancerígenos do cólon, visto que os valores dos padrões de expressão de mRNA e proteína foram superiores nos tecidos cancerígenos. Contudo, a semelhança entre a variação dos níveis de expressão do mRNA e dos níveis de expressão da proteína não nos permite sugerir que a tradução mediada por IRES desempenhe um papel fulcral na síntese da UPF1 em células de CRC.

Apesar de, na maioria dos casos, os níveis de expressão proteica ser superior nos tecidos de cancro colorretal, quando comparado com outros cancros em estudo, é de notar que no útero, fígado e pulmão, mais de 25% dos valores de expressão proteica são superiores aos apresentados pelo CRC. Dado o atraso no desenvolvimento da proteómica quantitativa, nos casos mencionados, a disparidade do número de amostras analisadas (no caso do útero e do pulmão em comparação com os restantes cancros em estudo) e o número total de amostras da coorte ser bastante inferior ao apresentado para os níveis de expressão de mRNA podem contribuir para as discrepâncias mencionadas.

Nos resultados relativos ao útero, embora estes sejam semelhantes aos apresentados pelo CRC, o número de amostras de tecidos do útero analisadas corresponde a cerca de metade do número de amostras de tecidos de CRC. Adicionalmente existem estudos que defendem que a UPF1 contribui para a carcinogénese no cancro do endométrio [95, 96]. Visto que, no caso da coorte utilizada para a análise dos níveis da expressão proteica, não existe informação sobre a região do útero de que foram recolhidas as amostras, põe-se a hipótese de que, nos dados apresentados neste *boxplot*, uma parte destes pode referir-se a tecidos onde a UPF1 desempenhe funções oncogénicas. No entanto, seria necessário analisar uma coorte com um número de amostras menos díspar de tecidos cancerígenos do útero e de CRC para verificar a semelhança de resultados entre estes e, crucialmente, poder identificar qual a região do útero da qual as amostras foram retiradas.

Diversos estudos relatam que a UPF1 desempenha funções supressoras de tumor, que contribuem para a diminuição da progressão do cancro do fígado, e que o *knockdown* da UPF1 em tecidos cancerígenos contribui para um aumento dessa progressão [47–50, 97]. Adicionalmente, Zhou et al. (2019) refere que os níveis de expressão da UPF1 são inferiores em tecidos cancerígenos em comparação com os tecidos normais do fígado [50]. Assim sendo, seria de esperar que os níveis de expressão da UPF1 no cancro do fígado sejam inferiores aos observados no CRC. No entanto, nas análises *in silico* mais de 25% dos resultados é superior ao valor máximo dos resultados referentes ao CRC, sendo possível visualizar uma diferença entre o terceiro quartil e a mediana significativamente superior à verificada entre o primeiro quartil e a mediana. Esta diferença indica que 25% das amostras que apresentam valores superiores à mediana possuem variabilidade significativamente superior às restantes, o que, por sua vez, e uma vez que foi analisada apenas uma dezena de amostras, pode pôr em causa a exatidão dos resultados. Deste modo, para avaliar a significância dos níveis de expressão desta porção de amostras na expressão proteica de tecidos deste cancro e averiguar a possível existência de *outliers*, seria necessário realizar um estudo com novas amostras e, preferencialmente, aumentar a quantidade de amostras analisadas.

No que diz respeito aos resultados obtidos nos tecidos de cancro do pulmão, estes conferem uma exceção, não só devido aos padrões de expressão proteica serem mais elevados do que os apresentados pelo CRC e, conseqüentemente, os mais elevados de todos os cancros em estudo, mas também porque os seus níveis de expressão de mRNA são superiores à maioria dos cancros em estudo exceto os tecidos de CRC e do estômago. Relativamente à expressão proteica, o número de amostras de tecidos de cancro do pulmão analisadas corresponde ao dobro do número de amostras do cancro colorretal, o que pode justificar a elevada variabilidade dos resultados neste cancro e indica que, para confirmar se os padrões de expressão proteica da UPF1 são superiores no cancro do pulmão em comparação com os restantes cancros em estudo, seria necessário realizar uma análise com um número de amostras semelhante. No entanto, mesmo realizando uma nova análise, é de esperar que os níveis de expressão proteica da UPF1 se mantenham elevados em tecidos de cancro do pulmão, visto que foram publicados estudos que indicam que a UPF1 apresenta funções oncogénicas neste cancro [53, 98]. Assim sendo, os elevados níveis de expressão, do transcrito e da proteína, verificados em tecidos pulmonares podem estar associados à UPF1 desempenhar funções oncogénicas neste cancro, à semelhança do que ocorre no CRC, o que, por sua vez, revigora a correlação entre a expressão da UPF1, quer ao nível do mRNA quer da proteína, e o tipo de função que esta desempenha.

Os resultados dos níveis de expressão de mRNA dos tecidos cancerígenos do estômago são superiores aos apresentados pelos tecidos de CRC (ao contrário do que se verifica na expressão proteica) sendo que o número de amostras analisadas não influencia estes resultados, visto que, nesta coorte, a quantidade de amostras analisadas em cada tipo de cancro é semelhante. Assim sendo, seria de esperar que os níveis de expressão do mRNA de *UPF1* de tecidos do estômago fossem inferiores aos obtidos nos tecidos dos cancros em que esta proteína desempenha funções oncogénicas. Diversos estudos relatam que a UPF1

desempenha funções supressoras de tumor neste cancro e que a sua expressão é suprimida pelo *MALAT1* (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) — um RNA não codificante que contribui para a progressão do cancro gástrico —, apresentando resultados de níveis de expressão de mRNA inferiores aos resultados apresentados na Figura 3.3, pelo que os resultados obtidos não estão de acordo com a literatura [51, 99–101]. Assim sendo, e visto que, da coorte utilizada para o estudo dos níveis de expressão de mRNA, foram analisadas 3 373 amostras, uma possível explicação seria que a amostragem pode incluir pacientes com outras comorbilidades que influenciem os níveis de expressão do transcrito.

Os resultados dos padrões de expressão de *UPF1* em MSI comparativamente com MSS não apresentaram significância estatística devido ao número de amostras de MSS ser cem vezes superior ao número de amostras de MSI e, no que diz respeito aos padrões de expressão da proteína, não foi possível obter resultados dada a indisponibilidade de dados. Deste modo, não foi possível obter conclusões quanto a estes parâmetros. Seria de esperar que os níveis de expressão de mRNA e de proteína fossem superiores nos tecidos de CRC com MSI em comparação aos tecidos de CRC com MSS visto que estudos relatam que, em tecidos de CRC com MSI, ocorre um aumento de expressão da *UPF1*, quer ao nível do mRNA quer da proteína [45, 102]. Este aumento conduz, segundo a literatura, a um aumento da atividade de NMD verificada nestes tecidos, o que contribui para a tumorigénese, neste cancro, na medida em que afeta a imunidade do indivíduo por degradar, por exemplo, transcritos mutados que codificam péptidos imunogénicos funcionais [45, 102].

A correlação entre os níveis de expressão da *UPF1* e o tipo de função que esta proteína desempenha, nomeadamente a relação entre o aumento dos níveis de expressão e as funções oncogénicas que a *UPF1* desempenha no cancro colorretal, sugerem que a manipulação da sua expressão poderá conferir um alvo terapêutico neste cancro, sendo, por isso, essencial conhecer os mecanismos envolvidos na síntese desta proteína. Tendo em consideração que a tradução mediada por IRES permite que ocorra síntese proteica em situações patogénicas, como no cancro [103], e que a 5'UTR da *UPF1* tem atividade de IRES que se mantém em condições de stresse (como referido nas secções 1.1.1.2 e 1.2), foram realizadas, em laboratório, análises dos níveis de expressão endógena da *UPF1* em condições em que a tradução canónica está inibida, que permitem averiguar se a tradução mediada por IRES permite a manutenção dos níveis de expressão da proteína em estudo nestas condições, o que sugere que este mecanismo pode contribuir para o aumento dos níveis de expressão da *UPF1* em tecidos de CRC verificado nas análises *in silico*. Para isso, sujeitámos as células a condições de stresse do RE (secção 2.3). Nos ensaios desta avaliação, foram feitas análises da eficácia da indução do stresse do RE com o objetivo de subsequentemente aplicar o tempo de exposição à TG mais eficaz para induzir este stresse nas várias linhas celulares em estudo. No entanto, o atraso na obtenção dos resultados resultante de problemas técnicos diversos não permitiu alcançar essa fase do projeto. Ainda assim, é possível tirar conclusões através da análise dos resultados obtidos nos ensaios realizados.

Relativamente à eficácia da indução do stresse do RE por tratamento das células com TG, é inicialmente de notar que esta não foi realizada com sucesso em todos os tempos de exposição de cada uma das linhas celulares estudadas, mais precisamente nas SW480 expostas à TG durante 16 h, nas HT29 expostas à TG durante 16 h e 20 h nos ensaios da secção 3.2.1 e nas NCM460 expostas a 20 h e 24 h de TG nos ensaios da secção 3.2.2. Visto que, tanto nas HT29 como nas NCM460, existem tempos de exposição em que o stresse foi induzido num dos ensaios, e que vários estudos que utilizaram tratamentos com TG em células colorretais induzem o stresse do RE com concentrações de TG iguais e até mesmo inferiores às utilizadas [104–106], a justificação mais plausível para não ter ocorrido indução do stresse do RE nos casos acima referidos é a ocorrência de problemas técnicos.

Nos resultados em que o stresse do RE foi induzido com sucesso, verificou-se que o tempo de exposição mais eficaz varia consoante a linha celular. Este acontecimento pode dever-se ao modo como ocorre a indução do mesmo, visto que a taspigargina inibe o transporte de Ca^{2+} e a atividade de ATPases intracelulares no RE, o que diminui a velocidade do *folding* das proteínas (que é uma característica que define o stresse do RE), sendo plausível que a velocidade destes processos possa variar consoante a linha celular [83, 107]. O tempo de exposição mais eficaz nas SW480 corresponde a 22 h, tal como sugere corresponder nas HT29, mas nas HCT116 corresponde a 24 h. Relativamente às NCM460, sugere-se que o tempo de exposição mais eficaz corresponda a 22 h não só por não ter ocorrido indução do stresse nas 20 h e nas 24 h dos ensaios da secção 3.2.2 mas também porque se verificou uma diminuição dos níveis de expressão da UPF1, o que seria de esperar em células não tumorais devido à proteína em estudo apresentar funções oncogénicas [43–45, 69]. O facto de a eficácia da indução do stresse do RE ser superior nas 22 h ou nas 24 h de exposição a 1 μM de TG pode estar associado à atividade da *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), uma proteína do retículo endoplasmático que regula o *folding* das proteínas e, em condições de stresse do RE, atua como cinase, fosforilando o eIF2 α (fator utilizado para avaliar a eficácia da indução do stresse) [108, 109]. Assim sendo, é possível sugerir que a atividade da PERK varie consoante o tempo de exposição à TG, embora ainda não seja conhecida a correlação entre a eficácia da atividade desta proteína e o tempo de exposição à TG.

A avaliação da expressão endógena do mRNA de *UPF1* não foi concluída, tendo sido realizada com sucesso apenas uma experiência (secção 3.2.1.1), nos primeiros ensaios (secção 3.2.1). Os resultados obtidos (Figura 3.7) não são estatisticamente significativos visto que, para tal, seria necessário realizar pelo menos três experiências independentes e não foi possível obter resultados nas células SW480 nem às 16 h de exposição à TG das células NCM460 e HT29 devido à ocorrência de problemas técnicos na realização do RT-qPCR. É ainda de salientar que os resultados relativos às HT29 expostas a TG durante 20 h são provenientes de células nas quais o stresse do RE não foi induzido com sucesso e que, nos resultados relativos às HCT116 expostas à TG durante 20 h e 24 h, não foi possível averiguar o sucesso da indução do stresse.

A inibição da tradução canónica por si só não afeta a expressão do mRNA, no entanto, o stresse do RE desencadeia um mecanismo de resposta ao stresse, denominado resposta a acumulação de proteínas com conformação tridimensional deficiente ou por formar (UPR, do inglês, *Unfolded Protein Response*), que estimula a sobreexpressão de genes e proteínas que contribuem para a regulação da quantidade de proteínas que apresentam conformações incorretas, de modo a recuperar a homeostasia [110]. A ocorrência deste mecanismo é inversamente proporcional à do mecanismo de NMD (no qual a UPF1 desempenha um papel fulcral) na medida em que, quando o stresse do RE é inócuo, o NMD degrada mRNA de componentes da UPR, inibindo-a, mas, quando o stresse atinge maiores proporções, este proporciona uma repressão do NMD através, por exemplo, da subexpressão de genes que contribuem para o correto funcionamento deste mecanismo, como o *UPF1* e o *SMG6* [110, 111]. A repressão do NMD é proporcional à intensidade e à duração do stresse, sendo suprimida em situações de stresse crónico, o que conduz à apoptose das células [110].

Os resultados apresentados na Figura 3.7 mostram que ocorre subexpressão do *UPF1* nas células normais do cólon, o que seria de esperar não só porque, em células colorretais, a proteína resultante contribui para o desenvolvimento e progressão do cancro, pelo que a sua expressão é diminuída em células não tumorais [43–45, 69], mas também porque a indução do stresse do RE foi realizada com sucesso, o que sugere que ocorre repressão do NMD em consequência da subexpressão do *UPF1*, como referido anteriormente [110, 111]. Estes resultados apoiam os resultados obtidos nas análises *in silico* (Figura 3.4) uma vez que, nestas, se observa que os níveis de expressão do *UPF1* são inferiores nos

tecidos normais do cólon em comparação com os tecidos de CRC e os padrões de expressão apresentados na Figura 3.7 são maioritariamente inferiores nas células normais do cólon em comparação com as células de CRC com o mesmo tempo de exposição à TG.

Já nas duas linhas de CRC, nos tempos de exposição em que foi possível comprovar que ocorre indução do stresse do RE, os resultados mostram que ocorreu sobreexpressão do mRNA de *UPF1*, quer às 16 h de exposição das HCT116 ao stresse, quer às 24 h de exposição das HT29 ao stresse, o que era de esperar dado o papel que a *UPF1* desempenha no CRC. Bokhari et al. (2018) observaram que ocorria sobreexpressão do *UPF1* em HCT116 e SW480, o que sugere que ocorre sobreexpressão do *UPF1* em células de CRC e, por sua vez, que os resultados mencionados estão de acordo com a literatura [45].

Contudo, tendo em consideração que estes resultados não têm significância estatística e são provenientes de um ensaio no qual ocorreram problemas técnicos, a veracidade dos mesmos deve ser comprovada com novos ensaios experimentais para aumentar a precisão e exatidão dos valores obtidos e, consequentemente, permitir uma análise mais aperfeiçoada e correta da expressão endógena do *UPF1* em células colorretais normais e cancerígenas.

A avaliação dos padrões de expressão endógena da proteína *UPF1*, cujos resultados foram apresentados em conjunto com os resultados da eficácia da indução do stresse (Figura 3.6 e Figura 3.8), mostrou que os níveis de expressão se mantêm em condições em que a tradução canónica é inibida em todas as linhas celulares estudadas, exceto nas NCM460 expostas à TG durante 22 h. Visto que a 5'UTR do transcrito da *UPF1* apresenta atividade de IRES que se mantém em condições de stresse (como referido na secção 1.2), os resultados laboratoriais obtidos neste projeto sugerem que este mecanismo de tradução permite a manutenção dos níveis de expressão endógena da *UPF1* em células de CRC nestas condições. De facto, a relação entre a tradução mediada por IRES e o cancro não é uma novidade, pois a literatura demonstra que diversas proteínas com funções oncogénicas, supressoras de tumor ou que estejam envolvidas na morte celular programada apresentam tradução mediada por IRES [112]. Este mecanismo alternativo da tradução é bastante oportuno para a síntese proteica em células cancerígenas na medida em que resiste à maioria das condições fisiológicas que condicionam a tradução canónica, pelo que a tradução mediada por IRES de proteínas com funções oncogénicas, como é o caso da *UPF1* no CRC, permite a expressão, em condições adversas, de proteínas que contribuem para a progressão do cancro [112]. Deste modo, e com base nos resultados das análises *in silico* que mostraram que ocorre um aumento da expressão da *UPF1* em tecidos de CRC em comparação com os tecidos normais do cólon, é ainda possível sugerir que a tradução mediada por IRES da *UPF1* contribui para o aumento dos níveis de expressão proteica em tecidos de CRC. Na verdade, não é a primeira vez que se verifica que a tradução mediada por IRES contribui para a progressão do cancro dado que estudos relatam a existência de diversas proteínas com funções oncogénicas, como por exemplo a VEGF e o c- Myc, cuja tradução mediada por IRES contribui para o aumento dos níveis de expressão das mesmas em tecidos cancerígenos [27, 113].

Apesar da análise dos resultados da expressão endógena da *UPF1* demonstrar a manutenção unânime dos seus níveis em condições de stresse nas células de CRC, é aconselhável realizar uma repetição das experiências para a validar, uma vez que ocorreram problemas técnicos ao longo dos ensaios, já mencionados.

5. Conclusão e perspectivas futuras

O objetivo principal deste projeto era aferir se ocorre tradução mediada por IRES da proteína UPF1 em células de cancro colorretal e compreender em que medida é que este mecanismo associado à proteína em estudo contribui para o aparecimento e progressão deste cancro. Os resultados obtidos sugerem que a tradução mediada por IRES da UPF1 em células de CRC contribui para o aumento dos níveis de expressão da proteína em estudo nestas células, o que, por sua vez, contribui para a progressão deste cancro.

Com base nesta conclusão, conjectura-se que a inibição da tradução mediada por IRES da UPF1 pode contribuir para a diminuição da progressão do CRC. As duas últimas tarefas definidas para este projeto permitiriam não só confirmar esta hipótese, como também avaliar o impacto desta inibição nas células de CRC, contribuindo assim para aprofundar os conhecimentos relativos ao contributo da tradução da UPF1 mediada por IRES no aparecimento e progressão deste cancro. No entanto, não foi possível alcançar esta fase do projeto em tempo útil. Assim, o potencial terapêutico da tradução mediada por IRES da UPF1 no CRC continua por avaliar, sendo essencial conhecer o impacto da inibição deste mecanismo no CRC, e mais precisamente na proliferação celular, na apoptose de células cancerígenas, no NMD e no ciclo celular para, no futuro, se ponderar o desenvolvimento de novas terapêuticas para o CRC com base nos conhecimentos adquiridos.

Além da importância da avaliação da contribuição da inibição da tradução mediada por IRES da UPF1 para a progressão do CRC, será também relevante investigar o impacto desta inibição nas células colorretais não cancerígenas, de modo a obter uma perspectiva geral do potencial terapêutico da inibição deste mecanismo numa proteína que apresenta funções tão divergentes.

Do mesmo modo, será importante estudar a função biológica deste mecanismo alternativo da síntese proteica, nomeadamente no cancro do pulmão, dada a discrepância observada nas análises *in silico* entre os níveis de mRNA e de proteína, o que sugere que o aumento da expressão proteica poderá ocorrer mediante a tradução de UPF1 mediada por IRES.

6. Referências bibliográficas

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al (2015) *Molecular biology of cell*, Sixth edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, pp. 1-7.
2. Cobb M (2017) 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol* 15:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003243>
3. Encode Consortium, Pennisi E (2012) For Junk DNA. *Science* (1979) 337:1159–1161. <https://doi.org/10.1126/science.337.6099.1159> 10.1126/science.337.6099.1159
4. Read A, Strachan T (2019) *Human Molecular Genetics*, Fifth edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, p. 4.
5. Watson J, Baker T, Bell S, et al (2004) *Molecular biology of the gene*, Seventh edition, Pearson, New York, pp. 510-548
6. Hinnebusch AG (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem* 83:779–812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
7. Dever TE, Green R (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>
8. Entian K-D (2022) *Ribosome Biogenesis Methods and Protocols*, Humana, New York, p. 225
9. Erickson F Les, Hannig EM (1996) Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: Role of the γ -subunit. *EMBO Journal* 15:6311–6320. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01021.x>
10. Aitken CE, Lorsch JR (2012) A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 19:568–57. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2303>
11. Kapp LD, Lorsch JR (2004) GTP-dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator tRNA by Translation Factor eIF2. *J Mol Biol* 335:923–936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.025>
12. Kapp LD, Lorsch JR (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73:657–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419>
13. Pestova T V., Borukhov SI, Hellen CUT (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394:854–859. <https://doi.org/10.1038/29703>
14. Valášek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG (2002) Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *EMBO Journal* 21:5886–5898. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf563>
15. Olsen DAS, Savner EM, Mathew A, et al (2003) Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO Journal* 22:193–204. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg030>

16. Majumdar R, Bandyopadhyay A, Maitra U (2002) Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *Journal of Biological Chemistry* 278:6580–6587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210357200>
17. Kolupaeva VG, Unbehaun A, Lomakin IB, et al (2005) Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *Rna* 11:470–486. <https://doi.org/10.1261/rna.7215305>
18. Lomakin IB, Steitz TA (2013) The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. *Nature* 500:307–311. <https://doi.org/10.1038/nature12355>
19. Hinnebusch AG (2011) Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:434–467. <https://doi.org/10.1128/membr.00008-11>
20. Kuhle B, Ficner R (2014) eIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining. *EMBO Journal* 33:1177–1191. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387344>
21. Gomez E, Mohammad SS, Pavitt GD (2002) Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: The guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO Journal* 21:5292–5301. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf515>
22. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T v. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
23. Leprivier G, Rotblat B, Khan D, et al (2015) Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1849:845–860. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.002>
24. Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:318–327. <https://doi.org/10.1038/nrm1618>
25. Lacerda R, Menezes J, Romão L (2016) More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74:1659–1680. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2428-2>
26. Martínez-Salas E, Ramos R, Lafuente E, De Quinto SL (2001) Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *Journal of General Virology* 82:973–984. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-973>
27. Komar AA, Hatzoglou M (2011) Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10. <https://doi.org/10.4161/cc.10.2.14472>
28. Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE (2008) Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100:27–38. <https://doi.org/10.1042/bc20070098>
29. Weingarten-Gabbay S, Elias-Kirma S, Nir R, et al (2016) Comparative genetics: Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* (1979) 351:. <https://doi.org/10.1126/science.aad4939>

30. Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, et al (2000) Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5:597–605. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80239-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80239-7)
31. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ (2010) Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:254–266. <https://doi.org/10.1038/nrc2824>
32. Topisirovic I, Sonenberg N (2011) mRNA translation and energy metabolism in cancer: The role of the MAPK and mtorc1 Pathways. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76:355–367. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010785>
33. Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW (1996) Genetic and Biochemical Characterization of Mutations in the ATPase and Helicase Regions of the Upf1 Protein. *Mol Cell Biol*. 1996 Oct;16(10):5477-90. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5477>
34. (US) B (MD): NL of M (1988) National Center for Biotechnology Information (NCBI). In: National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 11 Feb 2022
35. Kim YKI, Maquat LE (2019) UPF1 and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA* 25:407–422. <https://doi.org/10.1261/rna.070136.118>
36. Schoenberg DR, Maquat LE (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13:246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
37. Ivanov P V., Gehring NH, Kunz JB, et al (2008) Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO Journal* 27:736–747. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.17>
38. Azzalin CM, Lingner J (2006) The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Current Biology* 16:433–439. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.018>
39. Chawla R, Redon S, Raftopoulou C, et al (2011) Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. *EMBO Journal* 30:4047–4058. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.280>
40. Wittkopp N, Huntzinger E, Weiler C, et al (2009) Nonsense-Mediated mRNA Decay Effectors Are Essential for Zebrafish Embryonic Development and Survival. *Mol Cell Biol* 29:3517–3528. <https://doi.org/10.1128/mcb.00177-09>
41. Medghalchi SM, Frischmeyer PA, Mendell JT, et al (2001) Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* 10:99–105. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.2.99>
42. Lou CH, Shao A, Shum EY, et al (2014) Posttranscriptional Control of the Stem Cell and Neurogenic Programs by the Nonsense-Mediated RNA Decay Pathway. *Cell Rep* 6:748–764. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.028>
43. Wang X, Lai Q, He J, et al (2019) LncRNA SNHG6 promotes proliferation, invasion and migration in colorectal cancer cells by activating TGF- β /smad signaling pathway via targeting

- upf1 and inducing EMT via regulation of ZEB1. *Int J Med Sci* 16:51–59.
<https://doi.org/10.7150/ijms.27359>
44. Bordonaro M, Lazarova D (2019) Amlexanox and UPF1 modulate Wnt signaling and apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *J Cancer* 10:287–292. <https://doi.org/10.7150/jca.28331>
 45. Bokhari A, Jonchere V, Lagrange A, et al (2018) Targeting nonsense-mediated mRNA decay in colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncogenesis* 7:.
<https://doi.org/10.1038/s41389-018-0079-x>
 46. Liu Z, Wang Y, Dou C, et al (2018) MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR- γ -mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 37:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0717-3>
 47. Chang L, Yuan Y, Li C, et al (2016) Upregulation of SNHG6 regulates ZEB1 expression by competitively binding miR-101-3p and interacting with UPF1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 383:183–194. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.034>
 48. Chang L, Li C, Guo T, et al (2016) The human RNA surveillance factor UPF1 regulates tumorigenesis by targeting Smad7 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 35:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0286-2>
 49. Zhang H, You Y, Zhu Z (2017) The human RNA surveillance factor Up-frameshift 1 inhibits hepatic cancer progression by targeting MRP2/ABCC2. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 92:365–372. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.090>
 50. Zhou Y, Li Y, Wang N, et al (2019) UPF1 inhibits the hepatocellular carcinoma progression by targeting long non-coding RNA UCA1. *Sci Rep* 9:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43148-z>
 51. Li L, Geng Y, Feng R, et al (2017) The Human RNA Surveillance Factor UPF1 Modulates Gastric Cancer Progression by Targeting Long Non-Coding RNA MALAT1. *Cellular Physiology and Biochemistry* 42:2194–2206. <https://doi.org/10.1159/000479994>
 52. Cao L, Qi L, Zhang L, et al (2017) Human nonsense-mediated RNA decay regulates EMT by targeting the TGF- β signaling pathway in lung adenocarcinoma. *Cancer Lett* 403:246–259. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.021>
 53. Han S, Cao D, Sha J, et al (2020) LncRNA ZFPM2-AS1 promotes lung adenocarcinoma progression by interacting with UPF1 to destabilize ZFPM2. *Mol Oncol* 14:1074–1088. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12631>
 54. Liu C, Karam R, Zhou Y, et al (2014) The UPF1 RNA surveillance gene is commonly mutated in pancreatic adenosquamous carcinoma. *Nat Med* 20:596–598.
<https://doi.org/10.1038/nm.3548>
 55. Lu JW, Plank TD, Su F, et al (2016) The nonsense-mediated RNA decay pathway is disrupted in inflammatory myofibroblastic tumors. *Journal of Clinical Investigation* 126:3058–3062.
<https://doi.org/10.1172/JCI86508>

56. Pei CL, Fei KL, Yuan XY, Gong XJ (2019) LncRNA DANCR aggravates the progression of ovarian cancer by downregulating UPF1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:10657–10663. https://doi.org/10.26355/eurrev_201912_19763
57. Lv ZH, Wang ZY, Li ZY (2019) LncRNA PVT1 aggravates the progression of glioma via downregulating UPF1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:8956–8963. https://doi.org/10.26355/eurrev_201910_19294
58. Yang C, Ströbel P, Marx A, Hofmann I (2013) Plakophilin-associated RNA-binding proteins in prostate cancer and their implications in tumor progression and metastasis. *Virchows Archiv* 463:379–390. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1452-y>
59. Santos RL (2017) Non-canonical translation initiation of proteins with potential relevance in colorectal cancer
60. Fior R, Zilhão R (2019) *Molecular and cell biology of cancer*, First edition, Springer Cham, Switzerland, p. 6
61. Hinton-Sheley, Phoebe. (2020, January 30). What is Tumorigenesis?. News-Medical. Retrieved on May 19, 2023 from <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Tumorigenesis.aspx>.
62. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, et al (1999) Loss-of-function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. *Mol Cell* 3:799–804. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)80012-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)80012-5)
63. Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, et al (1998) Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: Reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO Journal* 17:4657–4667. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4657>
64. Kemp CJ, Donehower LA, Bradley A, Balmain A (1993) Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* 74:813–822. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90461-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90461-X)
65. Brogna S, McLeod T, Petric M (2016) The Meaning of NMD: Translate or Perish. *Trends in Genetics* 32:395–407. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.04.007>
66. Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: Safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21:1833–3856. <https://doi.org/10.1101/gad.1566807>
67. Davis FM, Azimi I, Faville RA, et al (2014) Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33:2307–2316. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.187>
68. Luo T, Cui S, Bian C, Yu X (2014) Crosstalk between TGF- β /Smad3 and BMP/BMP2 signaling pathways via miR-17-92 cluster in carotid artery restenosis. *Mol Cell Biochem* 389:169–176. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1938-6>
69. Chen B, Wang H, Li D, et al (2021) Up-frameshift Protein 1 Promotes Tumor Progression by Regulating Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer. *Technol Cancer Res Treat* 20:1–9. <https://doi.org/10.1177/15330338211064438>

70. Liu J, Guo B (2019) RNA-based therapeutics for colorectal cancer: Updates and future directions. *Pharmacol Res* 152:. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104550>
71. Mols F, Beijers T, Vreugdenhil G, Van De Poll-Franse L (2014) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: A systematic review. *Supportive Care in Cancer* 22:2261–2269. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2255-7>
72. Van Der Jeught K, Xu HC, Li YJ, et al (2018) Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 24:3834–3848. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3834>
73. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DWY (2006) RNAi therapeutics: A potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2:711–719. <https://doi.org/10.1038/nchembio839>
74. Dean NM, Frank Bennett C (2003) Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 22:9087–9096. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207231>
75. Leonetti JP, Mechti N, Degols G, et al (1991) Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2702–2706. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2702>
76. Dias N, Stein CA (2002) Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1:347–355
77. Paterson BM, Roberts BE, Kuff EL (1977) Structural gene identification and mapping by DNA.mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4370–4374. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4370>
78. Mansoor M, Melendez AJ (2008) Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul Syst Bio* 275–295. <https://doi.org/10.4137/grsb.s418>
79. Vidal L, Blagden S, Attard G, De Bono J (2005) Making sense of antisense. *Eur J Cancer* 41:2812–2818. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.06.029>
80. Xiong H, Veedu RN, Diermeier SD (2021) Recent advances in oligonucleotide therapeutics in oncology. *Int J Mol Sci* 22:. <https://doi.org/10.3390/ijms22073295>
81. Shen P, Pichler M, Chen M, et al (2017) To Wnt or Lose: The Missing Non-Coding Linc in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/ijms18092003>
82. Schwarzmuller L, Bril O, Vermeulen L, Léveillé N (2020) Emerging role and therapeutic potential of lncRNAs in colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 12:1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers12123843>
83. Vieyra A, Mintz E, Lowe J, Guillain F (2004) Ca²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylated by Pi reveals four thapsigargin-sensitive Ca²⁺ sites in the presence of ADP. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1667:103–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.003>

84. Shi Y, Yang Y, Hoang B, et al (2016) Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene* 35:1015–1024. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.156>
85. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C (2016) Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS Journal* 283:2640–2652. <https://doi.org/10.1111/febs.13598>
86. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, et al (2020) Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* 38:675–678. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>
87. Zhou Y, Lih TM, Pan J, et al (2020) Proteomic signatures of 16 major types of human cancer reveal universal and cancer-type-specific proteins for the identification of potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol* 13:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01013-x>
88. The Cancer Genome Atlas. <https://www.cancer.gov/tcga>
89. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, et al (2013) The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 45:580–585. <https://doi.org/10.1038/ng.2653>
90. Antharavally BS, Mallia KA, Rangaraj P, et al (2009) Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Anal Biochem* 385:342–345. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.11.024>
91. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
92. Combined cohort of TCGA, TARGET and GTEx samples. [https://xenabrowser.net/datapages/?cohort=TCGA TARGET GTEx](https://xenabrowser.net/datapages/?cohort=TCGA+TARGET+GTEx)
93. Cohort: TCGA Colon and Rectal Cancer (COADREAD). [https://xenabrowser.net/datapages/?cohort=TCGA Colon and Rectal Cancer \(COADREAD\)&removeHub=https%3A%2F%2Fxcna.treehouse.gi.ucsc.edu%3A443](https://xenabrowser.net/datapages/?cohort=TCGA+Colon+and+Rectal+Cancer+(COADREAD)&removeHub=https%3A%2F%2Fxcna.treehouse.gi.ucsc.edu%3A443)
94. Global Cancer Observatory. In: <https://gco.iarc.fr/>
95. Chen H, Ma J, Kong F, et al (2022) UPF1 contributes to the maintenance of endometrial cancer stem cell phenotype by stabilizing LINC00963. *Cell Death Dis* 13:. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04707-x>
96. Xing TR, Chen P, Wu JM, et al (2020) UPF1 participates in the progression of endometrial cancer by inhibiting the expression of lncRNA PVT1. *Onco Targets Ther* 13:2103–2114. <https://doi.org/10.2147/OTT.S233149>
97. Lee S, Hwang Y, Kim TH, et al (2022) UPF1 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth through DUSP1/p53 Signal Pathway. *Biomedicines* 10:. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040793>
98. Wang X, Yu X, Wei W, Liu Y (2020) Long noncoding RNA MACC1-AS1 promotes the stemness of nonsmall cell lung cancer cells through promoting UPF1-mediated destabilization of LATS1/2. *Environ Toxicol* 35:998–1006. <https://doi.org/10.1002/tox.22936>

99. Xu W, Ding M, Wang B, et al (2021) Molecular Mechanism of the Canonical Oncogenic lncRNA MALAT1 in Gastric Cancer. *Curr Med Chem* 28:8800-8809(10). doi: 10.2174/0929867328666210521213352
100. Lee NK, Lee JH, Ivan C, et al (2017) MALAT1 promoted invasiveness of gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer* 17:. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2988-4>
101. Hurt JA, Robertson AD, Burge CB (2013) Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay. *Genome Res* 23:1636–1650. <https://doi.org/10.1101/gr.157354.113>
102. El-Bchiri J, Guilloux A, Dartigues P, et al (2008) Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. *PLoS One* 3:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002583>
103. Leprivier G, Rotblat B, Khan D, et al (2015) Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1849:845–860. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.002>
104. Lee HM, Lee SC, He L, et al (2021) Legacy effect of high glucose on promoting survival of HCT116 colorectal cancer cells by reducing endoplasmic reticulum stress response. *Am J Cancer Res* 11:6004–60023
105. Chandrika BB, Maney SK, Lekshmi SU, et al (2010) Bax deficiency mediated drug resistance can be reversed by endoplasmic reticulum stress induced death signaling. *Biochem Pharmacol* 79:1589–1599. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.032>
106. Zheng L, Zhang YL, Chen X, et al (2019) Astragalus polysaccharides protects thapsigargin-induced endoplasmic reticulum stress in HT29 cells. *Open Life Sci* 14:494–501. <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0055>
107. Sagara Y, Fernandez-Belda F, de Meis L, Inesi G (1992) Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *Journal of Biological Chemistry* 267:12606–12613. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42320-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42320-4)
108. Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):271-4. doi: 10.1038/16729.
109. Harding HP, Calton M, Urano F, et al (2002) Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:575–599. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.011402.160624.
110. Goetz AE, Wilkinson M (2017) Stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74:3509–3531. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2537-6>
111. Usuki F, Fujimura M, Yamashita A (2017) Endoplasmic reticulum stress preconditioning modifies intracellular mercury content by upregulating membrane transporters. *Sci Rep* 7:. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09435-3>

112. Holcík M (2004) Targeting Translation for Treatment of Cancer-A Novel Role for IRES? *Curr Cancer Drug Targets*. 2004 May;4(3):299-311. doi: 10.2174/1568009043333005.
113. Didiot MC, Hewett J, Varin T, et al (2013) Identification of cardiac glycoside molecules as inhibitors of c-Myc IRES-mediated translation. *J Biomol Screen* 18:407–419.
<https://doi.org/10.1177/1087057112466698>

7. Informação suplementar

A maioria deste projeto foi apresentada em forma de comunicação oral no âmbito da “3ª edição do Dia do Jovem Investigador do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge”, no dia 8 de novembro de 2023, em Lisboa.

Adicionalmente, grande parte deste projeto foi apresentada em forma de poster no congresso da “26ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética Humana”, que se realizou nos dias 17, 18 e 19 de novembro de 2022, em Coimbra.

Do mesmo modo, uma parte significativa deste projeto foi também apresentada em forma de poster no congresso “IX ptRNA Meeting do Instituto de Medicina Molecular”, que decorreu nos dias 26 e 27 de janeiro de 2023, em Lisboa.

Tabela S1. Composição dos reagentes produzidos em laboratório.

Reagente	Composição
Comassie	1,25 g de Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich) 225 ml de metanol (Honeywell) 50 ml de ácido acético (EMSURE) 225 ml de água bidestilada
Destaining	450 ml de metanol (Honeywell) 100 ml de ácido acético (EMSURE) 450 ml de água bidestilada
TBS 10X pH = 7,6	151,25 g de <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> (Tris, VWR Chemicals) 219 g de NaCl (NZYTech) Acertar o pH com HCl 37% (Merck KGaA) Prefazer o volume com água bidestilada até obter um total de 2,5 L
Etanol a 75 %	75 ml de etanol absoluto (Honeywell) 25 mL de água bidestilada
Reagente de Quimioluminescência	1980 µl de ECL <i>buffer</i> (100 mM Tris, pH=8,8) 5 µl de ácido cumárico (90 mM em DMSO) 15 µl de luminol (250 mM em DMSO) 3 µl de H ₂ O ₂
ECL <i>buffer</i> (100 mM Tris, pH=8,8)	3,35 ml de <i>lower buffer</i> 46,65 ml de água bidestilada
<i>Lower buffer</i> (1,5 M Tris/HCl, pH=8,8)	72,7 g de Tris (VWR Chemicals) Acertar o pH com HCl 37% (Merck KGaA) Perfazer o volume com água bidestilada até obter um total de 400 ml
Ácido cumárico (90 mM em DMSO)	0,148 g de ácido cumárico (Sigma-Aldrich) 10 ml de DMSO (Sigma-Aldrich)
Luminol (250 mM em DMSO)	0,0443 g de luminol (Honeywell) 10 ml de DMSO (Sigma-Aldrich)