UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas
(Bioquímica)

LUIZA COIMBRA SCALABRINI

**O papel da quinase Aurora A na biologia das
células iniciadoras de tumor pulmonares com
mutação em *KRAS*.**

Versão corrigida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
03/11/2016

LUIZA COIMBRA SCALABRINI

**O papel da quinase Aurora A na biologia das
células iniciadoras de tumor pulmonares com
mutação em *KRAS*.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dra. Daniela Sanchez Bassères

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Scalabrini, Luiza Coimbra

S281p O papel da quinase Aurora A na biologia das células iniciadoras
de tumor pulmonares com mutação em *KRAS* / Luiza Coimbra
Scalabrini. -- São Paulo, 2016.
110p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Bassères, Daniela Sanchez

1. Biologia molecular 2. Câncer I. T. II. Bassères, Daniela
Sanchez, orientador.

574.88

CDD

*Aos meus pais, sempre presentes,
Maria Lúcia e Rogério.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por me conduzir por todo o meu caminho e me dar forças para continuar nos momentos difíceis.

À professora Dra. *Daniela Bassères*, que me recebeu tão bem em seu laboratório, assim como pelo incentivo na elaboração e desenvolvimento desse projeto, pelos ensinamentos e confiança diversas vezes depositada em mim.

À *Tatiana*, pela colaboração na elaboração e desenvolvimento desse projeto, ademais aos diversos momentos de paciência e amizade dentro e fora do laboratório, como finais de semana divertidos e semanas de muito aprendizado.

Aos amigos do LBMC, *Sandro, Vanessa, Lutero, Felipe, Thalita, Edmilson, Vitor e Viviane*, pela colaboração em inúmeros experimentos, companheirismo dentro e fora do laboratório, risadas, que fizeram toda a diferença.

Ao professor Dr. *Fábio Forti*, e aos integrantes do LSSB, *Lílian, Yuli, Jéssica, Lucas e Ju*, pela amizade, auxílio, almoços descontraídos e horas de fluxo, em especial a *Gi*, que se tornou uma grande amiga.

Aos professores Drs. *Eduardo Reis* e *Deborah Schechtman*, pelos conselhos e discussões durante nossas reuniões do LAPIC, que tanto contribuíram para que eu finalizasse o meu Mestrado.

Aos amigos do *LAPIC*, pelas reuniões que ajudaram tanto em meu projeto e horas de descontração, que deram leveza a essa caminhada.

Aos professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica, em

especial aos professores Drs. *Regina Baldini*, *Flávia Meotti* e *Chuck Farah*, que me supervisionaram durante meu período como monitora.

À CAPES, FAPESP e FAMRI, pelo financiamento.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, que contribuíram imensamente para a minha formação pessoal e acadêmica.

À minha família de São Paulo, *Gabi*, *Marcela* e *Pedro*, por serem meus amigos e irmãos, que tantas vezes foram minha banca de seminários, assim como por cuidarem de mim e pelos momentos de companheirismo durante essa etapa.

Aos amigos que Viçosa me presenteou, em especial a *Isadora*, *Jamille* e *Larissa*, que, mesmo de longe, fizeram parte dessa caminhada.

À minha *família* e *amigos* de Belo Horizonte, que me recebem sempre com tanto carinho e sempre me apoiaram nas minhas jornadas longe de casa.

Aos meus irmãos, *Leo* e *Luana*, pelo amor, carinho e amizade.

Às minhas sobrinhas *Mel* e *Alice*, pela alegria que trouxe às nossas vidas.

Por fim, mas não menos especiais, aos meus pais, *Maria Lúcia* e *Rogério*, pelo apoio incondicional para que eu siga em busca dos meus objetivos, por acreditarem em mim e serem meu exemplo de luta, família e amor.

*O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras
respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.*

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

Scalabrini, L. C. **O papel da quinase Aurora A na biologia das células iniciadoras de tumor pulmonares com mutação em KRAS.** 2016. 110p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mutações ativadoras no gene KRAS são prevalentes em câncer de pulmão e as vias de sinalização de RAS estão aumentadas em células iniciadoras de tumor (CITs), que são definidas como células autorrenováveis capazes de iniciar a formação tumoral, sustentar o crescimento tumoral e promover a disseminação tumoral. Entretanto, terapias direcionadas a RAS não foram efetivas até hoje e a identificação de alvos de KRAS que contribuam para o fenótipo oncogênico é necessária. Como a quinase Aurora A (AURKA) já foi implicada, tanto na oncogênese induzida por KRAS, quanto em promover a função das CITs, nós hipotetizamos que a inibição das vias de AURKA seria detrimental para a função de CITs pulmonares portadoras de KRAS oncogênica, desta forma diminuindo o comportamento maligno do câncer de pulmão. Para avaliar a função das CITs, nós usamos ensaios de crescimento de tumoresferas que permitem o crescimento seletivo de CITs *in vitro*. As linhagens pulmonares positivas para KRAS H358 e A549 formaram tumoresferas em cultura de baixa aderência e, quando comparadas às linhagens parentais, às células oriundas de tumoresferas apresentaram maior capacidade clonogênica *in vitro* e maior tumorigenicidade *in vivo*. Além disso, uma análise por qPCR revelou que as células oriundas de tumoresferas possuem expressão aumentada de fatores de células tronco, uma característica de CITs. Em seguida, nós inibimos a AURKA nas linhagens pulmonares positivas para KRAS H358 e A549 por interferência de RNA (RNAi) ou com um inibidor das quinases Aurora (AI II). A inibição de AURKA diminuiu a formação de tumoresferas e o crescimento destas em culturas seriadas, além de reduzir a capacidade clonogênica das células oriundas de tumoresferas. Estes resultados indicam que a AURKA é importante para a autorrenovação e a oncogenicidade de CITs, e que a AURKA induz o fenótipo tronco-tumoral, o que é corroborado pelo achado de que a inibição de AURKA nas tumoresferas reduz a expressão de fatores de célula tronco. Um destes fatores regulados por AURKA é o marcador de superfície de célula tronco CD24. De fato, quando comparadas às células cultivadas de forma aderente, as células oriundas de tumoresferas apresentam maior número de células positivas para CD24 (CD24⁺) e estes números são reduzidos pelo tratamento com AI II. Finalmente, nós purificamos células H358 CD24⁺ por citometria de fluxo e mostramos que, quando comparadas às células negativas para CD24, as células CD24⁺ apresentam maior capacidade de formar tumoresferas em culturas seriadas, e o tratamento com AI II inibe preferencialmente a capacidade de células CD24⁺ de formarem tumoresferas. Nossos resultados sugerem que uma terapia baseada na inibição de AURKA pode reduzir o número e função de CITs pulmonares portadoras de KRAS oncogênica e, portanto, pode representar uma estratégia terapêutica atraente para reduzir a recidiva e metástase no câncer de pulmão induzido por KRAS.

Palavras-chave: câncer de pulmão; KRAS; células iniciadoras de tumor (CITs); quinase Aurora A (AURKA)

ABSTRACT

Scalabrini, L. C. **The role of Aurora A kinase in the biology of lung tumor initiating cells with KRAS mutations.** 2016. 110p. Master's Degree Dissertation – Post-graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Activating mutations in KRAS are prevalent in lung cancer and RAS signaling is enhanced in cancer initiating cells (CICs), which are defined as self-renewing tumor cells able to initiate tumor formation, sustain tumor growth and drive tumor dissemination. However, therapies targeted to oncogenic RAS have been ineffective to date and identification of KRAS targets that impinge on the oncogenic phenotype is warranted. Because Aurora kinase A (AURKA) has been implicated both in RAS oncogenesis and in promoting CIC function, we hypothesized that targeting AURKA pathways would impair KRAS-positive lung CIC function, thereby decreasing lung cancer malignant behavior. To evaluate CIC function, we used tumorsphere assays that allow selective growth of CICs *in vitro*. KRAS positive lung cancer H358 and A549 cells formed tumorspheres under low attachment conditions, and, when compared to the parental cell lines, sphere-forming cells had increased clonogenic ability *in vitro* and increased tumorigenicity *in vivo*. In addition, qPCR analysis revealed that tumorsphere cells displayed increased expression of stem cell factors, a hallmark of CICs. Next, we targeted AURKA in KRAS positive lung cancer H358 and A549 cells by RNA interference (RNAi) or with an Aurora inhibitor (AI II). AURKA targeting decreased tumorsphere formation and growth in serial cultures and reduced clonogenic growth of tumorsphere-forming cells. These results indicate that AURKA is important for CIC self-renewal and oncogenicity and that AURKA induces a CIC phenotype, which is further underscored by the finding that AURKA targeting in tumorspheres decreases expression of stem cell factors. One such factor shown to be regulated by AURKA is the stem cell surface marker CD24. In fact, when compared to adherent cultures, A549 and H358 tumorspheres display increased numbers of CD24-positive (CD24⁺) cells and these numbers are reduced by AI II treatment. Finally we purified H358 CD24⁺ cells by flow cytometry and showed that, when compared to CD24-negative cells, CD24⁺ cells have increased ability to form tumorspheres in serial cultures, and AI II treatment preferentially reduced the ability of CD24⁺ cells to form tumorspheres. Our results suggest that AURKA inhibition therapy can reduce the number and function of KRAS-positive lung CICs, and, therefore might be an attractive therapeutic strategy to reduce recurrence and metastasis in KRAS-induced lung cancer.

Keywords: lung cancer; KRAS; tumor initiating cells (CICs); Aurora A kinase (AURKA)

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1.</i> Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas no mundo no ano de 2012. _____	19
<i>Figura 1.2.</i> Sobrevida relativa em cinco anos para o câncer de pulmão em função do estágio. _____	21
<i>Figura 1.3.</i> Estrutura das isoformas de RAS. _____	24
<i>Figura 1.4.</i> Modificações pós-traducionais para ancoragem de RAS à membrana. ____	25
<i>Figura 1.5.</i> Regulação de RAS. _____	27
<i>Figura 1.6.</i> Frequência das isoformas de RAS nos cânceres humanos. _____	29
<i>Figura 1.7.</i> Inibição indireta de KRAS via efetores downstream. _____	33
<i>Figura 1.8.</i> Estrutura das AURKA, AURKB e AURKC. _____	36
<i>Figura 1.9.</i> Terapia convencional combinada com terapia contra CITs. _____	44
<i>Figura 4.1.</i> Formação de tumoresfera a partir de uma célula única. _____	57
<i>Figura 4.2.</i> A cultura de tumoresferas leva a um aumento da expressão de fatores de célula tronco _____	58
<i>Figura 4.3.</i> Células oriundas de tumoresferas apresentam maior clonogenicidade. ____	59
<i>Figura 4.4.</i> Células oriundas de tumoresferas apresentam maior tumorigenicidade. _	60
<i>Figura 4.5.</i> A inibição da atividade das quinases Aurora reduz a formação de tumoresferas. _____	62
<i>Figura 4.6.</i> A inibição da expressão da quinase Aurora A reduz a formação de tumoresferas. _____	63
<i>Figura 4.7.</i> A inibição da expressão da quinase Aurora A reduz a formação de tumoresferas. _____	64
<i>Figura 4.8.</i> A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz formação de tumoresferas secundárias e terciárias. _____	66
<i>Figura 4.9.</i> Tumoresferas tratadas com inibidor das quinases Aurora apresentam uma redução na expressão de fatores de célula tronco. _____	69
<i>Figura 4.10.</i> Análise da eficiência de inibição da expressão por interferência de RNA de AURKA e KRAS em tumoresferas formadas. _____	70

<i>Figura 4.11.</i> A inibição da expressão da quinase Aurora A ou KRAS reduz a expressão de fatores de célula tronco em tumoresferas.	71
<i>Figura 4.12.</i> A inibição da expressão da quinase Aurora A ou KRAS reduz a expressão de fatores de célula tronco em tumoresferas.	72
<i>Figura 4.13.</i> A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz a clonogenicidade de células A549 oriundas de tumoresferas.	73
<i>Figura 4.14.</i> A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz a clonogenicidade de células H358 oriundas de tumoresferas.	74
<i>Figura 4.15.</i> A inibição da expressão de AURKA reduz a clonogenicidade de células oriundas de tumoresferas.	75
<i>Figura 4.16.</i> Tumoresferas oriundas da linhagem A549 apresentam enriquecimento de células positivas para o marcador de células tronco CD24.	77
<i>Figura 4.17.</i> A cultura de tumoresferas leva a um aumento da expressão de CD24.	78
<i>Figura 4.18.</i> A inibição farmacológica das quinases Aurora nas células pulmonares A549 e H358 reduz o número de células positivas para o marcador de superfície de células tronco CD24.	79
<i>Figura 4.19.</i> Células positivas para o marcador de superfície CD24 possuem maior capacidade de formar tumoresferas.	80
<i>Figura 4.20.</i> A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz preferencialmente a capacidade de células CD24+ formarem tumoresferas.	81

LISTA DE TABELA

Tabela 3.1. Sequencias de primers foward (Fw.) e reverse (Rv.) utilizadas nas reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)._____ 52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG2	Bomba de efluxo dependente de ATP (do inglês <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>)
ATP	Adenosil trifosfato (do inglês <i>adenosine thriphosphate</i>)
ATP	Adenosil trifosfato (do inglês <i>adenosine thriphosphate</i>)
AURKA	Quinase Aurora A (do inglês <i>Aurora kinase A</i>)
AURKB	Quinase Aurora B (do inglês <i>Aurora kinase B</i>)
AURKC	Quinase Aurora C (do inglês <i>Aurora kinase C</i>)
AXIN	Regulador negativo da via de Wnt (do inglês <i>Axis inhibitor</i>)
BMI1	Fator de transcrição essencial para manutenção da pluripotência em células tronco adultas
BRAF	Oncogene viral do sarcoma murinho (do inglês, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene</i>)
BTAK	Quinase de tumor de mama amplificado (do inglês <i>Breast Tumor Amplified Kinase</i>)
CD133	Molécula de superfície que regula crescimento celular
CD24	Molécula de adesão celular
CD44	Molécula de adesão célula-célula
cDNA	DNA complementar (do inglês <i>complementar DNA</i>)
CITs	Células iniciadoras de tumor
CPC	Complexo passageiro do cromossomo

CXCR4	Receptor tipo 4 da quimicina C-X-C (do inglês <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>)
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (do inglês <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Transição epitelial-mesenquimal (do inglês <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FGF	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês <i>fibroblastic growth factor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GAP	Proteína ativadora de GTPase (do inglês <i>GTPase activating protein</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GDP	Guanosil difosfato (do inglês <i>guanosine diphosphate</i>)
GEF	Fator de troca do nucleotídeo de guanina (do inglês <i>guanine exchange factor</i>)
Grb2	Ligante do receptor do fator de crescimento (do inglês <i>growth factor Receptor–Bound protein 2</i>)
GSK-3	Quinase glicogênio sintase 3 (do inglês <i>glycogen synthase kinase-3</i>)
GTP	Guanosil trifosfato (do inglês <i>guanosine triphosphate</i>)
HRAS	Oncogene homólogo do sarcoma viral de camundongo Harvey (do inglês <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
ICMT	Isoprenilcisteína carboxi-metiltransferase (do inglês <i>isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase</i>)

INCA	Instituto Nacional de Câncer
iPSC	Célula tronco pluripotente induzida (do inglês <i>induced pluripotent stem cell</i>)
KLF4	Fator de transcrição essencial para manutenção da pluripotência (do inglês <i>Kruppel-like factor 4</i>)
KRAS	Oncogene homólogo do sarcoma viral de camundongo Kirsten (do inglês <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
MEK	Quinase MAPK/ERK (do inglês <i>MAPK/ERK Kinase</i>)
Nanog	Fator de transcrição essencial para manutenção da pluripotência
NFκB	Fator nuclear κB (do inglês <i>nuclear factor κB</i>)
NRAS	Oncogene homólogo do neuroblastoma viral (do inglês <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)
NSCLC	Câncer de pulmão de células não-pequenas (do inglês <i>Non-Small Cells Lung Cancer</i>)
Oct4	Fator de transcrição essencial para manutenção da pluripotência (do inglês <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>)
PBSA	Tampão fosfato salino, solução A, livre de cátions divalentes (do inglês <i>phosphate-buffered saline, solution A, without divalent cations</i>)
PCR	Reação da cadeia em polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>phycoerythrin</i>)
PI3K	Fosfatidinositol-3-quinase (do inglês <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PTK	Proteínas tirosina quinases (do inglês <i>protein tyrosine kinase</i>)
Raf	Fibrosarcoma rapidamente acelerado (do inglês <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
Rap1	Ras-related protein 1

RCE1	Enzima conversora de Ras 1 (do inglês <i>Ras converting enzyme 1</i>)
RelA	Homólogo A do oncogene viral <i>v-ral</i> da leucemia símia (do inglês <i>v-ral simiam leukemia viral oncogene homolog A</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	Meio de cultura (do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute's médium</i>)
SCLC	Câncer de pulmão de células pequenas (do inglês <i>Small Cells Lung Cancer</i>)
SOS1	Proteína homóloga 1 a <i>son of sevenless</i> (do inglês <i>son of sevenles homolog 1</i>)
SOS2	Proteína homóloga 2 a <i>son of sevenless</i> (do inglês <i>son of sevenles homolog 2</i>)
SOX2	Fator de transcrição essencial para manutenção da pluripotência (do inglês <i>SRY-box 2 - sex determining region Y-box 2</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
Wnt	Via de sinalização essencial para embriogenese (do inglês <i>Wingless-type MMTV integration site family member</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Câncer de Pulmão	19
1.2. GTPase KRAS	22
1.2.1. Estrutura e localização de RAS	22
1.2.2. Regulação da atividade de RAS	25
1.2.3. KRAS e câncer	28
1.2.4. KRAS como alvo terapêutico direto	30
1.2.5. KRAS como alvo terapêutico indireto	33
1.3. Quinase Aurora A	34
1.3.1. Quinases Aurora	34
1.3.2. Estrutura e Localização Celular	35
1.3.3. Quinase Aurora A e Câncer	37
1.3.4. Quinase Aurora A e KRAS	38
1.4. Células Iniciadoras de Tumor	39
1.4.1. CITs e KRAS	42
1.4.2. CITS e AURKA	43
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo geral	45
2.2. Objetivos específicos	45
3. MATERIAIS E PROCEDIMENTOS	46
3.1. Linhagens celulares	46
3.2. Condições de cultura, subcultura e preservação das linhagens celulares	46
3.3. Ensaio de formação de tumoresferas	47
3.4. Ensaio de formação de tumoresfera single cell	48
3.5. Ensaio de colônia	48
3.6. Crescimento tumoral xenográfico	48
3.7. Extração e quantificação de RNA	49
3.8. Síntese de cDNA	50
3.9. PCR em Tempo Real	51
3.10. Transfecção com siRNAs	53
3.11. Identificação de marcadores de superfície por citometria de fluxo	54
3.12. Purificação de células por citometria de fluxo	54
3.13. Análise estatística	55
4. RESULTADOS	56

4.1. A células oriundas de tumoresferas possuem maior capacidade clonogênica e tumorigênica _____	56
4.2. A inibição da atividade ou expressão de AURKA nas linhagens A549 e H358 reduz a quantidade de CITs e sua capacidade de autorrenovação. _____	61
4.3. A inibição da quinase Aurora A em CITs das linhagens A549 e H358 reduz o fenótipo tronco-tumoral _____	67
4.4. Seleção de marcador de célula tronco para as linhagens A549 e H358 _____	76
5. <i>DISCUSSÃO</i> _____	82
6. <i>CONCLUSÕES</i> _____	89
7. <i>BIBLIOGRAFIA</i> _____	90
<i>SÚMULA CURRICULAR</i> _____	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é o câncer que mais mata atualmente. Dados da World Health Organization (WHO) mostraram que o câncer pulmonar foi o mais incidente mundialmente para o ano de 2012, com cerca de 1,82 milhões de novos casos e 1,24 milhões de mortes (Figura 1.1; WHO, 2014a). No Brasil, esse é o segundo tipo de câncer mais incidente para ambos os sexos, sendo responsável por 14% das mortes por câncer entre os homens e 10% entre as mulheres. A estimativa para o país no ano de 2016 é de 28,3 novos casos de câncer de pulmão para cada 100.000 habitantes, sendo que 24% desses novos casos no estado de São Paulo (WHO, 2014b).

Figura 1.1. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas no mundo no ano de 2012. O câncer de pulmão apresentou a maior incidência e foi a principal causa de morte dentre as neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos e todas as faixas etárias no mundo todo. Adaptado de: Organização Mundial da Saúde, 2014 (WHO, 2014a).

O uso de tabaco é a principal causa do câncer de pulmão. No Brasil, este hábito vem diminuindo ao longo das décadas. Nos últimos 20 anos houve uma diminuição de aproximadamente 20% de uso do tabaco, devido a diversas campanhas contra o fumo e aumento nos impostos de cigarros (INCA, 2014). No mundo também observamos uma queda recente e menos acentuada no uso do tabaco, de 1% em 6 anos (WHO, 2015). Não só o uso do tabaco, mas fumantes passivos e a exposição a outros fatores estão associados ao câncer de pulmão, como agentes cancerígenos (radônio residencial, sílica, níquel arsênico, berílio, entre outros) (Torres-Durán et al, 2015).

A taxa de sobrevivência de pacientes com câncer pulmonar em 5 anos é de apenas 15%, essa taxa podendo variar de 50% quando diagnosticado no estágio menos avançado IA, até 2% no estágio IV (Figura 1.2). Essa baixa taxa de sobrevivência se deve tanto ao diagnóstico tardio (Walter et al, 2015a), quanto a ausência de terapias eficazes para a maioria dos pacientes.

O câncer de pulmão pode ser dividido em 2 grupos, o câncer de células pequenas (*Small Cells Lung Cancer* – SCLC) e o câncer de células não pequenas (*Non-Small Cells Lung Cancer* – NSCLC). Este segundo grupo ainda pode ser subdividido em 3 tipos: adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes. O SCLC é menos frequente, representa aproximadamente 15% dos casos de câncer de pulmão (WHO, 2014a).

Dentre os subtipos de NSCLC, que representam 85% dos casos, o adenocarcinoma pulmonar é o mais frequente, representando cerca de 40% dos casos e afetando principalmente nos brônquios periféricos. O câncer de células escamosas se inicia geralmente nos brônquios principais podendo se estender até a junção das traqueias, sendo responsável

por aproximadamente 30% das ocorrências. Já o carcinoma de células grandes é pouco frequente, ocorrendo em aproximadamente 10% os casos (Lemjabbar-Alaoui et al. 2015).

Figura 1.2. Sobrevida relativa em cinco anos para o câncer de pulmão em função do estágio. O câncer de pulmão apresenta uma das menores sobrevidas entre todos os tipos de câncer. Modificado de Tan et al, 2003.

O tecido normal controla cuidadosamente eventos que levam à proliferação celular, como produção e liberação de fatores de crescimento, eventos do ciclo celular e números de células presentes no tecido. Funções biológicas relacionadas a esse controle são comprometidas devido a alterações genéticas, levando ao surgimento de células tumorais, que apresentam proliferação descontrolada e sobrevida celular (Hanahan e Weinberg, 2011).

Das alterações genéticas associadas ao câncer de pulmão, as mais comuns são mutações nos genes *KRAS*, *EGFR* e *BRAF*. Esses genes codificam proteínas, que estão envolvidos em vias que promovem a proliferação celular. Destes genes, *KRAS* é o mais

frequentemente mutado em NSCLC, representando de 15-40% dos casos (Cooper et al, 2013; Boland et al, 2015). Mutações em *KRAS* tem uma forte relação com a incidência de câncer de pulmão em fumantes ou ex-fumantes, sendo responsável pela ocorrência de quase metade dos casos desse grupo. Já em pacientes não-fumantes, a ocorrência é menor, porém significativa, de aproximadamente 20% (Jorge et al, 2014).

1.2. GTPase KRAS

As GTPases RAS são proteínas de aproximadamente 21 kDa ancoradas à face interna da membrana celular e participam de vias que sinalizam proliferação e sobrevivência celular. Existem três isoformas de RAS codificadas por genes diferentes, que são encontradas alteradas em neoplasias humanas: *KRAS*, *HRAS* e *NRAS*. *HRAS* e *KRAS* foram descobertas em estudos de sarcoma viral de ratos (*Ras* - Rat Sarcoma) por Harvey (Harvey, 1964) e Kirsten (Kirsten et al, 1967), respectivamente, recebendo esses nomes em homenagem aos seus descobridores (Coffin et al, 1981). Mais tarde, o grupo de Weiss descobriu o gene o *NRAS*, que encontrava-se alterado em neuroblastomas (Hall et al, 1983).

1.2.1. Estrutura e localização de RAS

Os 3 genes RAS envolvidos em neoplasias humanas (*HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) codificam 4 isoformas diferentes uma vez que o mRNA primário de *KRAS* pode sofrer *splicing* alternativo, originando as isoformas *KRAS4A* e *KRAS4B*. Todas as isoformas codificam pequenas GTPases de 21 kDa ancoradas à face interna da membrana plasmática, que participam da sinalização celular, recebendo sinais oriundos de receptores celulares e ativando várias vias de sinalização que promovem a proliferação celular, como, por exemplo, as vias MAPK e PI3K/AKT (Mitin e col., 2005; Wennerberg e col., 2005).

Existe cerca de 85% de homologia entre as 4 isorformas de *RAS*, sendo que as diferenças entre as isoformas estão principalmente concentradas na região hipervariável constituída pelos 25 aminoácidos carboxi-terminais (Figura 1.3) (Gorfe et al, 2008). A isoforma KRAS4B possui alguns resíduos de aminoácidos a mais que as outras 3 isoformas, que possuem cerca de 188 aminoácidos. Além da região hipervariável, as isoformas apresentam regiões altamente conservadas. Uma destas regiões é o domínio de interação com proteínas intracelulares efetoras que irão efetuar a transdução de sinal induzida pela *RAS* ativa. Além disso, outras regiões conservadas estão envolvidas na interação com o nucleotídeo de guanina e na interação com proteínas que regulam a atividade de *RAS*. A região denominada *Switch I* é responsável pela interação com proteínas ativadoras de GTPase (“*GTPase activating proteins*”, GAPs), responsáveis por promover a inativação de *RAS* e a região *Switch II* interage com proteínas trocadoras de nucleotídeos GDP (“*GDP Exchange factors*”, GEFs), que promovem a ativação de *RAS*.

A ancoragem à membrana plasmática é mediada pela região carboxi-terminal das proteínas *RAS*, que sofre modificações pós-traducionais. A principal enzima responsável pela ancoragem à membrana é a farnesiltransferase (FTase), capaz de prenilar o motivo carboxi-terminal específico CAAX presente em todas as isoformas, onde C se refere a uma cisteína, A se refere a qualquer aminoácido alifático e X a qualquer aminoácido. Essa prenilação consiste na adição de um grupo farnesil na cisteína do motivo CAAX. Após a prenilação, todas as isoformas continuam a ter sua extremidade carboxi-terminal processada pela enzima Rce1, que cliva a região terminal AAX e, em seguida, a cisteína farnesilada terminal é metilada pela enzima metiltransferase (Figura 1.4).

Figura 1.3. Estrutura das isoformas de RAS. Em verde, os sítios de ligação ao GTP, em roxo o sítio de ligação aos efetores, em amarelo o Switch I, em azul o Switch II e em vermelho a região hipervariável, que determina a correta associação a membrana plasmática. Adaptado de Friday e Adjei, 2005 e Gorfe et al, 2008.

Além da farnesilação, todas as proteínas RAS, exceto a KRAS4B, sofrem palmitoilação nos grupos SH de cisteínas da região carboxi-terminal, o que também contribui para a correta ancoragem das proteínas RAS na membrana plasmática. A KRAS4B, apesar de não sofrer palmitoilação, possui uma região rica em lisinas próxima a região carboxi-terminal, que auxilia na ancoragem da proteína à membrana (Jackson et al, 1994) (Figura 1.3).

Finalmente, as isoformas KRAS4A, KRAS4B e NRAS podem sofrer prenilação alternativa da cisteína terminal na ausência de farnesilação, pois estas isoformas também são alvos de geranilgeraniltransferases do tipo I (GGT-1). As GGT-1 reconhecem o mesmo motivo que a FTase, sendo que o aminoácido X do domínio CAAX terminal determina o reconhecimento por essa enzima (Moore et al, 1991) (Figura 1.4).

Figura 1.4. Modificações pós-traducionais para ancoragem de RAS à membrana. As proteínas RAS tem o grupo farnesil adicionado à cisteína da região terminal CAAX pela farnesiltransferase (FTase). Após a prenilação, todas as isoformas continuam a ter sua extremidade c-terminal processada pela protease Rce1, que cliva a região terminal AAX, e em seguida sofrem metilação da cisteína terminal pela enzima metiltransferase (Imct). Um grupo palmitoil é adicionado em outros resíduos de cisteína próximos à cisteína terminal para a ancoragem de HRAS, NRAS ou KRAS4A à membrana plasmática. Já a isoforma KRAS4B não possui estas cisteínas adicionais e utiliza sua extremidade terminal rica em lisina para a ancoragem à membrana plasmática. Adaptado de: Friday e Adjei, 2005.

1.2.2. Regulação da atividade de RAS

As proteínas RAS são proteínas de membrana, ou seja, se encontram ancoradas à membrana plasmática, onde recebem sinais *upstream*, e após ativação, desencadeiam sinais *downstream*. Essas proteínas são ativadas por receptores tirosina quinase (RTK), sendo o mais bem estudado, o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR).

Os receptores RTK são proteínas transmembrana, possuindo um domínio de extracelular N-terminal rico em cisteína que interage com ligantes, um braço de dimerização, uma região hidrofóbica transmembrana, e um domínio citoplasmático C-terminal com atividade de tirosina quinase altamente conservado com vários sítios de fosforilação. A ligação de um ligante ao receptor induz a dimerização entre receptores, ocorrendo a autofosforilação cruzada dos sítios de fosforilação do receptor, ativando-o (Seshacharyulu et al, 2012).

O receptor ativado recruta proteínas adaptadoras, como Grb2 (*Growth factor Receptor–Bound protein 2*), que por sua vez, recrutam proteínas GEFs para a membrana. As GEFs interagem com RAS-GDP no domínio *Switch II* e promovem a liberação de GDP. Devido à alta afinidade de RAS por nucleotídeos de guanina, essas enzimas rapidamente se associarão a um novo nucleotídeo de guanina. Como a concentração celular de GTP é maior que de GDP, preferencialmente, RAS se liga à GTP quando o sítio de hidrólise se encontra vazio, tornando-se ativa (Lowenstein et al, 1992; Bos et al, 2007).

As GEFs mais bem estudadas são as proteínas SOS1 e SOS2 (*Son of Sevenless*). SOS são proteínas de aproximadamente 150kD que possuem uma cauda C-terminal rica em prolina, que interage com o domínio SH3 da Grb2 (Jorge et al, 2002). Outros domínios importantes para ativação de RAS são REM e CDC25. As alfa-hélices do motivo REM se inserem no sítio ativo de RAS induzindo o deslocamento do *Switch I* e ao mesmo tempo, próximo do sítio de ligação do nucleotídeo, as interações entre SOS e as cadeias laterais do *Switch II* resultam em uma reestruturação da cadeia principal do esqueleto de RAS. A reestruturação dessa cadeia principal é fundamental para exclusão do nucleotídeo, uma vez que evita a ligação de magnésio e fosfato, resultando na abertura do sítio ativo de RAS e liberação do GDP (Boriack-Sjodin et al, 1998; Pierre et al, 2011). Uma vez que o sítio

hidrolítico de RAS se encontra disponível, RAS irá se ligar preferencialmente a GTP, levando à sua ativação (Figura 1.5) (Barbacid, 1987).

Figura 1.5. Regulação de RAS. Quando complexada a GDP, RAS se encontra inativa. As GEFs promovem a ativação de RAS dissociando o GDP de RAS, que logo se associa a GTP, tornando-se ativa, ativando efetores de sua via. Ao término dos sinais regulatórios, GAPs são recrutadas, promovendo a hidrólise do GTP, levando à inativação de RAS. Adaptado de Bernards et al, 2004.

Quando o sinal de ativação de RAS é cessado, RAS hidrolisa a molécula de GTP a GDP, liberando um P_i no meio e voltando a sua forma inativa. Entretanto, a atividade GTPásica intrínseca de RAS é muito lenta, sendo que é necessária a interação com GAPs para que a catálise ocorra de forma eficiente, levando à inativação de RAS e ao controle do crescimento celular (Boquett e col., 2010). As GAPs, que interagem com RAS-GTP na região *Switch I*, aumentam a velocidade da reação em cerca de 1.000 vezes (Prior e Hancock, 2012).

RAS possui dois resíduos de aminoácidos essenciais para que ocorra a hidrólise do GTP: uma glutamina no códon 61 e uma tirosina no códon 35. As proteínas GAPs fornecem uma arginina que é fundamental para acelerar a catálise. O dedo de arginina leva ao melhor

posicionamento do GTP e dos aminoácidos glutamina e tirosina, aumentando a atividade de GTPásica de RAS (Kötting et al, 2008). Um exemplo de uma proteína da família GAP1 é a proteína CAPRI. CAPRI é uma proteína citossólica inativa que é recrutada para a membrana quando há elevação na concentração de Ca^{2+} intracelular. A associação com a membrana leva à ativação da atividade GAP de CAPRI (Lockyer et al, 2001).

1.2.3. KRAS e câncer

Mutações em *RAS* tem sido apontada como causa da malignidade de diversos tumores, ocorrendo em aproximadamente 30% dos cânceres humanos. As mutações em *RAS* ocorrem principalmente nos códons 12, 13 e 61. Os códons 12 e 13, ambos codificam glicinas, são essenciais para o reconhecimento de RAS-GTP pelas GAPs. Mutações nesses códons impedem que esse reconhecimento ocorra e RAS permanece constitutivamente ativa. Já o códon 61 codifica uma glutamina diretamente envolvida na hidrólise do GTP. A substituição desse resíduo de glutamina leva à completa perda da capacidade catalítica de RAS, mesmo quando há reconhecimento de RAS pelas GAPs, levando a ativação permanente de RAS. Todas as mutações resultam na contínua transdução de sinais aos efetores de RAS, levando a proliferação descontrolada e maior sobrevivência celular, que pode resultar na transformação maligna (Quinlan e Settleman, 2009).

Dentre as isoformas de *RAS*, a mais frequentemente mutada nas neoplasias humanas é a *KRAS* (Figura 1.6). As mutações em *KRAS* estão presentes em mais de 90% dos cânceres de pâncreas, aproximadamente 40% dos cânceres colorretal e 30% dos cânceres de pulmão (Alves et al, 2015; Brady et al, 2015; Junttila et al, 2015; Unni et al, 2015; Witkiewicz et al, 2015; Inamura et al, 2016). Mutações em *NRAS* levam à transformação maligna principalmente de câncer de pele. Já mutações em *HRAS* são encontradas principalmente em câncer de bexiga (Prior et al, 2012).

Tipo de Tumor	<i>KRAS</i> %	<i>HRAS</i> %	<i>NRAS</i> %	Total %
Pâncreas	61	0	2	63
Cólo	43	1	9	42
Útero	21	<1	3	22
Pulmão	26	<1	1	27
Melanoma	<1	<1	17	19
Pele	3	6	18	27
AML	4	9	7	19

Figura 1.6. Frequência das isoformas de RAS nos cânceres humanos. (Adaptado de McCormick 2016).

Diversos trabalhos mostram que mutações em *KRAS* tem um importante papel no desenvolvimento de um fenótipo maligno. Primeiramente, a K-Ras foi inicialmente descrita como a forma celular do agente transformador do vírus de sarcoma Kirsten (Chang et al, 1982; Der et al, 1982). Além disso, muitos estudos mostraram que a expressão da forma ativa da K-Ras em camundongos é suficiente para causar a transformação neoplásica e o aparecimento de tumores (Fisher et al, 2001; Jackson et al, 2001; Brembeck et al, 2003; Braun et al, 2004; Caulin et al, 2004; Chan et al, 2004; Tuveson et al, 2004; Vitale-Cross et al, 2004; Raimondi et al, 2006; Carrière et al, 2009). A eliminação da atividade da K-Ras, através da expressão de formas dominante-negativas ou através do bloqueio da expressão da K-Ras, é capaz de reverter células malignas para um fenótipo não maligno (Shirasawa et al, 1993; Bossu et al, 2000; Fleming et al, 2005). Finalmente, a alta prevalência das mutações em K-Ras dentro de um amplo espectro de neoplasias sugere que a K-Ras desempenha um papel central no desenvolvimento do fenótipo maligno (Puig et al, 2000; Arvanitakis et al, 2004).

1.2.4. KRAS como alvo terapêutico direto

Pelas razões descritas acima, usar a proteína K-Ras como um alvo terapêutico é uma estratégia racional que deveria trazer benefícios clínicos. De fato, existe uma intensa busca pela inibição da atividade biológica de RAS.

A estratégia mais bem estudada para inibir RAS envolve a inibição da sua ancoragem à membrana, que é fundamental para a sua ativação, o que levou diversos grupos a buscarem a inibição da prenilação pós-traducional, através de inibidores da enzima farnesil transferase. Dois compostos, Lonafarnib e Tipifarnib, mostraram eficácia em testes pré-clínicos em modelos xenográficos com mutação em HRAS. Porém, não obtiveram sucesso em testes clínicos com pacientes portadores de mutação em KRAS (Liu et al, 1998; End et al, 2001). Outro composto que mostrou eficácia em reduzir o crescimento tumoral em modelos xenográficos com mutação em HRAS, BMS-214662, falhou em inibir a prenilação de KRAS (Rose et al, 2001). Depois verificou-se que a razão do insucesso desta estratégia se deve ao fato de que KRAS pode sofrer prenilação alternativa, catalisada pela geranilgeranil transferase (Whyte et al, 1997), continuando, desta forma, a se ancorar corretamente na membrana.

Devido a essa prenilação alternativa, outra abordagem seria a inibição dual da FTase e GGT1ase. Lobell et al (2001) utilizaram dois inibidores, HDJ2, específico para FTase, e Rap1A, específico para GGT1. A inibição dual dessas transferases levou a morte dos camundongos após 72h de administração das drogas, indicando que a inibição destas duas vias de prenilação provocou toxicidade e seria incompatível com um uso clínico. Esse mesmo grupo em 2002 mostrou que o inibidor para as duas transferases, L-778,123, foi eficaz em inibir a ação da FTase e parcialmente de GGT1, porém, não foi eficaz em inibir KRAS (Lobell et al, 2002).

Uma outra abordagem possível para interferir com a ancoragem, seria inibir Rce1 e Icmt, enzimas que atuam após a ação da FTase e GGT1. Camundongos nude *knockdown* para Rce1 não apresentaram uma redução da transformação maligna tão significativa quanto camundongos *knockdown* para Icmt (Bergo et al, 2001; Lin et al, 2002). Portanto, a inibição da prenilação de KRAS se mostrou tóxica. Esses mecanismos de prenilação (farnesilação e geranilgeranilação) são amplamente utilizados por outras proteínas e em diversos tecidos e a dose necessária para que ocorra a inibição da ancoragem de KRAS é alta, podendo afetar esses outros alvos das transferases.

Recentemente outras estratégias para inibir a atividade de KRAS foram propostas e estão sendo estudadas.

Diferentes grupos de pesquisa foram em busca de pequenas moléculas que pudessem inibir a forma ativa de KRAS. Porém, KRAS não possui um potencial sítio de ligação para essas moléculas moduladoras, que não o sítio GTPásico (Maurer et al, 2012). Devido à alta afinidade deste sítio por guaninas fosfatadas, não foi possível identificar pequenas moléculas capazes de competir com GTP ou GDP em concentrações normais intracelulares (Zhang et al, 2016).

Outra estratégia utilizada para inibição direta de KRAS seria bloquear a interação com as proteínas GEFs, responsáveis pela ativação de KRAS. Alguns grupos de pesquisa conseguiram identificar moléculas que poderiam se ligar próximo ao bolso da interação RAS:GEF, interferindo na ativação de RAS *in vitro* (Maurer et al, 2012; Sun et al, 2012). Ainda não há muitas moléculas promissoras que tenham afinidade suficiente por RAS.

Recentemente, linhagens com mutação da glicina 12 para cisteína se mostraram susceptíveis à inibição da atividade de RAS *in vitro*. Moléculas pequenas derivadas de acrilamida ou de sulfonamidas vinílicas conseguem se encaixar em uma cavidade próxima à

cisteína 12 e reagem com o grupo tiol, modificando este resíduo covalentemente de forma irreversível. Esta modificação aumenta a preferência de KRAS por GDP e bloqueia sua interação com efetores (Ostrem, 2013; Spiegel et al, 2014). Porém, além de serem específicas para um tipo específico de mutação oncogênica em KRAS, estas moléculas ainda não tiveram sua atividade anti-tumoral testada *in vitro* ou *in vivo*.

A inibição de RAS por RNA de interferência é uma área bastante estudada atualmente. Esta inibição foi efetiva para redução da oncogenicidade tanto *in vitro* (Valentino et al, 2013; Wang et al, 2013a) quanto *in vivo* (Wang et al, 2014; Zeng et al, 2015). Podemos observar também que a cooperação entre siKRAS e quimioterápicos elevou substancialmente o efeito do quimioterápico *in vitro* em células tumorais do esôfago e do colorretal (Wang et al, 2013b; Yousef et al, 2016). O grande desafio da terapia com siRNA é o sistema de entrega desses oligonucleotídeos. Muito grupos obtiveram sucesso na redução de tumores xenográficos (Khvalevsky et al, 2013; Lin et al, 2013; Yuan et al, 2014; Yin et al 2015), porém, os estudos de fase clínica ainda não mostraram avanços nessa etapa. Em 2010 foi iniciado um teste clínico em pacientes com câncer de pâncreas com mutação G12D em KRAS. Esses pacientes foram tratados com siKRASG12D através de injeção intratumoral, porém, ainda não se obteve sucesso na fase II quando combinado com quimioterápicos (Burnett et al, 2011).

Até hoje, as estratégias para inibição direta de KRAS não se mostraram efetivas. Embora estudos recentes venham mostrando resultados promissores com novas estratégias para a inibição direta de KRAS, estas estratégias são, em alguns casos, específicas para um tipo único de mutação oncogênica (Ostream et al, 2013), ou então de difícil implementação clínica (Yuan et al 2014), e em outros casos são promissoras, mas estão ainda longe de ter sua eficácia comprovada na clínica (Maurer et al, 2012; Burns et al, 2014). Devido a esses

obstáculos para inibição direta de KRAS, alvos efetores das vias KRAS vem sendo investigada como uma forma de inibição indireta.

1.2.5. KRAS como alvo terapêutico indireto

A inibição indireta da KRAS através dos seus efetores a jusante também é difícil, tendo em vista que KRAS regula vários efetores que contribuem para o fenótipo maligno. Os alvos das vias de KRAS mais bem estudados são as vias Raf-MEK-ERK e PI3K. Inibidores de Raf já mostraram ser eficientes na redução do fenótipo tumoral (Heim et al, 2003; Koya et al, 2012), como também a inibição de MEK (Holt et al, 2012). Já a inibição de PI3K parece não ter efeito em tumores com mutação em KRAS (Gysin et al, 2011). Porém, quando esses efetores têm sua inibição combinada, podemos observar um efeito antitumoral mais pronunciado (Engelman et al, 2008; Daouti et al, 2009).

Figura 1.7. Inibição indireta de KRAS via efetores downstream. Devido a obstáculos para inibição direta de KRAS, alvos efetores das vias de regulação de KRAS vêm sendo investigados como inibição indireta de KRAS. Reproduzido de dos Santos, 2013.

Considerando que a inibição de efetores tradicionais de KRAS apresentou sucesso limitado (Cox et al, 2014), a identificação de novas vias e alvos regulados por KRAS que contribuam para o fenótipo maligno é necessária para aumentar as possibilidades de desenvolvimento de terapias combinatórias que possam levar a um sucesso terapêutico (figura 1.7). Nosso grupo mostrou recentemente que as quinases Aurora A e Aurora B são alvos da sinalização de KRAS no pulmão e que a sua inibição se mostrou eficiente em reduzir o fenótipo tumoral de células pulmonares com mutação em KRAS (dos Santos et al, 2016), indicando estas quinases como potenciais novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer de pulmão.

1.3. Quinase Aurora A

1.3.1. Quinases Aurora

As quinases Aurora são enzimas da família das serina-treonina quinases cruciais para o controle do ciclo e divisão celular. São conhecidas 3 quinases Aurora, quinase Aurora A (AURKA), Aurora B (AURKB) e Aurora C (AURKC), que possuem uma semelhança em suas sequencias, porem desempenham funções biológicas diferentes entre si (Bolanos-Garcia 2005).

As quinases Aurora foram descritas pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* em uma busca por mutações genéticas que estariam envolvidas na incorreta segregação cromossomal, onde foi identificado um gene essencial para a ocorrência da poliploidia, nomeado como gene Aurora (Chan and Botstein, 1993). Em seguida, a quinase AURKA foi identificada em *Drosophila melanogaster* mutante, que apresentavam irregularidade na formação dos pólos mitóticos (Glover et al, 1995).

A quinase AURKA está diretamente envolvida na regulação da divisão celular. Essa quinase tem seus níveis reduzidos durante as fases G1/S, onde se localiza no material pericentriolar, enquanto na fase G2/M, seus níveis aumentam substancialmente, estando envolvida na maturação, duplicação e separação dos centrossomos e, em seguida, migrando para os polos da célula (REF).

A quinase AURKB garante a associação dos cromossomos aos fusos mitóticos para a correta segregação das cromátides-irmãs. A AURKB, associada a outras proteínas, faz parte do complexo passageiro do cromossomo (CPC) mitótico, responsável pela estabilidade do fuso mitótico bipolar (Adams et al, 2001). A superexpressão de AURKB leva à transformação maligna de diversos tecidos, como próstata, coloretal, mama, pulmão, entre outros (Bischoff et al, 1998; Katayama et al, 1999; Hamada et al, 2003; Smith et al, 2005; Lee et al, 2006).

A quinase AURKC é encontrada apenas em espermátócitos, onde participa da espermatogênese. Essa quinase se encontra associada ao CPC meiótico nesse tecido, onde sua superexpressão também leva à transformação maligna em testículos (Khan et al, 2011).

1.3.2. Estrutura e Localização Celular

Essas três quinases compartilham vasta semelhança no sítio catalítico, apesar de possuírem funções diferentes, e sequências bem diferentes na região regulatória N-terminal. Essas proteínas possuem um resíduo de treonina fundamental para a sua ativação catalítica, localizado no loop de ativação (A-loop), e outros sítios específicos, A-box e D-box, que são reconhecidos por proteínas que degradam as quinases Aurora (Figura 1.8) (Gavriilidis et al, 2015).

A AURKA, como outras serina-treonina quinases, possui dois lobos em seu domínio catalítico unidos por uma espécie de dobradiça. O lobo N, localizado mais próximo à região N-terminal, responsável por posicionar o ATP através de uma α -hélice, e o lobo C, mais próximo à região C-terminal, onde se localiza o loop de ativação, sítio onde os substratos se ligam (Bai et al, 2014). Esses dois lobos se posicionam de tal maneira que o ATP, ligado no lobo N, doa grupamentos fosfatos para os substratos de AURKA, como também para o resíduo Thr288, promovendo a autofosforilação e ativação da AURKA (Hirota et al, 2003).

Figura 1.8. Estrutura das AURKA, AURKB e AURKC. As quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C compartilham da sequência do sítio catalítico (em amarelo). A região regulatória (N-terminal) possui pouca homologia e contém o sítio A-box, que juntamente com o sítio D-box, se ligam a proteínas que degradam essas quinases ao final do ciclo celular. O domínio A-loop é capaz de se ligar a substratos dessas enzimas e é também onde está localizada a treonina fosforilada que regula a atividade destas quinases. Adaptado de Gavrilidis et al, 2015.

A AURKA se localiza na região pericentriolar durante G1/S, em baixos níveis de expressão. Em G2/M, sua expressão aumenta, quando ocorre a maturação, divisão e migração dos centrossomos para os polos opostos da célula. Durante a prófase, é responsável pela elongação dos microtubulos até a placa metafásica, onde os cromossomos se encontram alinhados para posterior separação (Nikonova et al, 2013). AURKA, quando ativada, recruta

proteínas para o material pericentriolar, como γ -tubulina e centrossomina, responsáveis pela nucleação dos microtubulos (Terada et al, 2003).

Uma das formas de ativação da AURKA é através de sua associação com a proteína Bora, que se localiza no núcleo e é exportada para o citoplasma durante a prófase. A associação dessas proteínas leva a ativação de Plk1, uma importante quinase que regula processos da mitose. Essa quinase recruta AURKA para o centrossomo em G2, que por sua vez ativa a proteína CDC25B, promovendo o início da mitose (Nikonova et al, 2013).

Foi observado que a AURKA também regula o alinhamento dos cromossomos e a citocinese. Marumoto et al. (2003) observaram que a inibição por siRNA da AURKA leva à interrupção desses eventos. Lioutas e Vernos (2013) observaram que a inibição da AURKA leva à instabilidade dos microtubulos, afetando a formação da zona central metafásica durante a anáfase e também o processo de nucleação na mitose tardia. O mecanismo responsável por essa regulação ainda não foi elucidado.

Vários estudos mostram que a superexpressão de AURKA leva a má formação dos microtubulos, resultando em células aneuploides. Essa característica é muito encontrada em células tumorais, indicando que essa quinase pode ser um bom alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de canceres (Meraldi et al, 2002; Romain et al, 2014).

1.3.3. Quinase Aurora A e Câncer

A quinase Aurora A é um importante regulador do ciclo celular, onde a sua superexpressão pode levar a erros em diversos momentos da mitose, como na separação dos cromossomos e orientação cromossômica bipolar, resultando em instabilidade genética e uma possível transformação maligna (Marumoto et al, 2002). A superexpressão de AURKA já foi

observada em diversos tipos de tumores (Mendiola et al, 2009; Dedic et al 2013; Goktas et al, 2014), incluindo pulmômar (Xu et al, 2014; Zeng et al, 2014).

A AURKA foi descrita pela primeira vez em humanos em células tumorais da mama como gene *BTAK* (*Breast Tumor Amplified Kinase*) em uma região do cromossomo, cromossomo 20q13, comumente amplificada em diversos tumores (Bischoff et al, 1998; Zhou et al, 1998). A AURKA também foi caracterizada como um oncogene uma vez que a sua superexpressão na glândula mamária de camundongos leva a formação de tumores mamários (Zhang et al, 2004; Wang et al, 2006). Além disso, a superexpressão desta quinase leva à instabilidade genética, podendo resultar células aneuploides e poliploides (Kollareddy, 2008; Gautschi et al, 2008, Carvajal et al, 2006).

Além disso a AURKA encontra-se superexpressa em diversos tipos de tumores (Jiang et al, 2014; Mannino et al, 2014; Lu et al, 2014 B), incluindo tumores pulmonares (Lu et al, 2014 A; Chinn et al, 2014). Por exemplo, Sen et al (2002) identificaram que tumores de bexiga com superexpressão de AURKA, apresentavam também maior taxa de invasão, metástase, agressividade e menor sobrevida dos pacientes. A superexpressão de AURKA também foi associada a um pior prognóstico em câncer colorretal (Aust et al, 2004), sendo que neste tipo de tumor a superexpressão de AURKA estava associada com uma má formação dos fusos mitóticos resultando em células aneuploides (Sakakura et al, 2001). Esses estudos e outros mostram que erros durante a mitose pela superexpressão de AURKA estão correlacionados a uma maior agressividade tumoral e pior prognóstico.

1.3.4. Quinase Aurora A e KRAS

A AURKA contribui para a transformação maligna induzida pela Ras oncogênica. Nesse contexto, já foi visto que a AURKA regula componentes importantes das vias

desencadeadas por Ras. Por exemplo, a AURKA interage com Ras GAP *in vitro* (Gigoux et al, 2002) e fosforila e ativa a GTPase RalA, um componente da via Ral GEF, uma das vias efetoras da Ras oncogênica (Wu et al, 2005; Lim et al, 2010). Além disso a AURKA ativa o fator de transcrição NF- κ B (Briassouli et al, 2007), um fator de transcrição envolvido na transformação maligna induzida por KRAS no pulmão (Meylan et al, 2009; Bassères et al, 2010).

Além destes estudos que implicam um papel importante da AURKA nas vias reguladas por KRAS, já foi visto que há uma correlação positiva entre a presença de mutações no oncogene *KRAS* e uma expressão aumentada da AURKA (Tseng et al, 2009; Patel *et al*, 2012). Além disso, a AURKA aumenta a capacidade da Ras oncogênica de transformar fibroblastos murinos (Tatsuka, M. *et al*, 2005). Finalmente, nós demonstramos recentemente, não só que a KRAS oncogênica promove a expressão de AURKA no pulmão, mas também que a inibição da expressão ou atividade desta quinase em células pulmonares transformadas por KRAS reduz a clonogenicidade celular *in vitro* e tumorigenicidade *in vivo* (Santos et al, 2016).

1.4. Células Iniciadoras de Tumor

Uma das características importantes na oncogênese é a aquisição e manutenção de um fenótipo tronco tumoral pelas células iniciadoras de tumor. O modelo das células iniciadoras de tumor propõe uma organização celular hierárquica para os tumores, na qual células iniciadoras de tumor (CITs) tumorigênicas dão origem a células tumorais não tumorigênicas (Li et al, 2007a; Visvader e Lindeman, 2012). Desta forma, CITs são definidas como células tumorais autorrenováveis capazes de iniciar a formação de tumores e sustentar o crescimento tumoral. CITs são resistentes à quimio- e radioterapia convencionais e acredita-se que elas

sejam responsáveis pela disseminação tumoral e pelo crescimento de metástases (Li et al, 2007a; Visvader e Lindeman, 2012).

Células tronco normais estão no topo da organização celular hierárquica, tendo habilidade, tanto de se dividir em células progenitoras comprometidas com a expansão e diferenciação em células maduras, como também de se autorrenovar, mantendo seu fenótipo tronco (Li e Neaves, 2006). As células tronco têm um potencial grande, porém limitado, de se propagar. Desta forma, essas células não proliferam muito, sendo esse um mecanismo de defesa da célula contra mutações que ocorrem durante a divisão celular (Walter et al, 2015b). Essas células dão origem a células progenitoras comprometidas, que possuem pouca capacidade de se autorrenovar, mas que são altamente proliferativas. Essas células dão origem a células maduras terminalmente diferenciadas, que normalmente não se dividem mais (Tang 2012). Em alguns órgãos, com altas taxas de renovação celular, essas células diferenciadas ainda se dividem. Outra situação em que essas células ainda se proliferam é no caso de injúria ou homeostase do tecido (Medema e Vermeulen, 2011).

Células tumorais são células que surgem a partir do acúmulo de mutações genéticas e/ou epigenéticas (Hanahan e Weinberg, 2000). Essas alterações levam à proliferação ilimitada e descontrolada e frequentemente à aquisição por algumas células de um fenótipo tronco menos diferenciado. O modelo das CITs prevê uma organização celular tumoral hierárquica, onde células com fenótipo menos diferenciado (fenótipo tronco) dão origem a células maduras tumorais altamente proliferativas (Visvader 2011).

As CITs compartilham propriedades de células tronco, por isso, também são chamadas de células tronco tumorais. Elas são capazes de se autorrenovar indefinidamente e possuem a habilidade de regenerar tumores (Reya et al, 2001). As CITs possuem um padrão de expressão gênica semelhante ao de células tronco, como também mecanismos de defesa (Zhou et al, 2001; Ginestier et al, 2007) e de reparo do DNA mais eficiente (Kim et al, 2013; Meng et al,

2014). Essas características tornam essas células mais difíceis de serem combatidas com terapias anticâncer convencionais (Hashida et al, 2015; Sukowati et al, 2015).

Não se sabe ao certo a origem das CITs. Muitos pesquisadores acreditam que essas células são resultado de mutações em células tronco adultas ou de suas progenitoras (Bouras et al, 2008; Barker et al, 2009; Lim et al, 2009; Goldstein et al, 2010). Holland et al (2000) mostraram, em camundongos, que glioblastomas surgem preferencialmente a partir de células progenitoras neurais do que a partir de astrocitos diferenciados. Através de mapeamento celular também em camundongos, foi demonstrado que células tronco do intestino foram capazes de iniciar tumores em todo intestino e, apesar dessas células darem início ao tumor, apenas 7% das células tumorais ainda expressavam marcadores de célula tronco (Zhu et al, 2009). Também foi observado que tumores pulmonares são preferencialmente originados de células tronco pulmonares (Kim et al, 2005).

Por outro lado, existem também evidências de que as CITs podem se originar a partir de células tumorais maduras e que o fenótipo tronco pode ser então adquirido pelas células tumorais durante o processo de transformação maligna. Isto é corroborado pela existência de tumores que não são originados a partir de células tronco. Um dos principais processos associados à aquisição de um fenótipo tronco tumoral é a via da transição epitelial-mesenquimal (EMT do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Liu e Brown, 2010). Essa transição levou ao aumento de células com habilidade de autorrenovação capazes de iniciar tumores de mama, que também apresentam maior expressão de marcadores de célula tronco, como $CD44^{+}/CD24^{-}$, utilizado para diferenciar populações enriquecidas para o fenótipo tronco tumoral (Mani et al, 2008). Essa correlação entre marcadores de CITs e EMT foi observada em diversos tipos de cânceres, como de tireoide, pescoço e cabeça, esôfago, prostata (Jung et al, 2015; Kong et al, 2015; Ota et al, 2015; Sato et al, 2015) e também e pulmão (Sung et al, 2015).

Outros mecanismos contribuem para aquisição do fenótipo tronco tumoral, como a hipóxia. CITs são dependentes do fator de indução de hipóxia-1 (HIF-1) para sobrevivência, autorrenovação, crescimento tumoral e manutenção do fenótipo menos diferenciado (Heddleston et al, 2010). O microambiente em processo de inflamação também contribui para a aquisição desse fenótipo. Macrófagos recrutados pelas células tumorais aumentam sua capacidade de iniciar tumor e de resistência a drogas, através da secreção de IL-6 e outros fatores que cooperativamente induzem vias de sinalização envolvidas com o desenvolvimento tumoral, como a via de Hedgehog (Jinushi et al, 2011).

Além de dar origem as células tumorais “maduras”, as CITs também são responsáveis pela manutenção e propagação do tumor, pois apenas estas células tem a capacidade de iniciar tumores (tumorigênicas). Por esta razão, acredita-se também que elas sejam responsáveis pela disseminação tumoral e pelo crescimento de metástases (Li et al, 2007a; Visvader e Lindeman, 2012). Portanto, as diferenças funcionais entre células com e sem potencial tumorigênico têm implicações importantes para terapia, levando a intensa busca por terapias que atinjam não somente as células tumorais diferenciadas, mas principalmente as CITs.

1.4.1. CITs e KRAS

KRAS possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção do fenótipo tronco tumoral. A KRAS oncogênica está associada à transição epitelial-mesenchimal (Liu et al, 2009), uma característica relacionada ao fenótipo tronco tumoral. Além disso, RAS contribui para a manutenção e expansão de CITs em um modelo murino de câncer de mama, em células tumorais mamárias humanas e em queratinócitos (Liu et al, 2009; Kim et al, 2010; Jiang et al, 2014). Em queratinócitos, a via utilizada para promoção de características tronco tumorais envolve o fator de transcrição NF- κ B (Jiang et al, 2014).

Entretanto, o mecanismo envolvido na promoção deste fenótipo, que está associado a características agressivas tumorais, não está muito bem esclarecido em outros tipos de tumores. Além disso, os alvos terapêuticos que afetam esta via induzida por KRAS no câncer de pulmão permanecem inexplorados.

1.4.2. CITS e AURKA

Existem indícios de que a AURKA desempenha um papel importante no desenvolvimento do fenótipo tronco tumoral. A AURKA, não só tem expressão aumentada em células tronco embrionárias normais (Pashai et al, 2012), mas também é capaz de promover a transição epitelial-mesenquimal (McCubrey et al, 2012). Além disso, a inibição de AURKA induz a parada do ciclo celular de CITs de ovário (Chefetz et al, 2011), diminui a viabilidade de CITs de glioma (Mannino et al, 2014) e é essencial para a capacidade tumorigênica e quimioresistência de CITs colorretais (Camareri et al, 2010). A inibição de AURKA impede o acúmulo de CITs mamários induzido pelo tratamento com epirrubicina (Zheng et al, 2014) e reduz a capacidade de autorrenovação e de formar novos tumores em CITs de glioblastoma (Xia et al, 2013). Finalmente, em células tumorais mamárias, a Aurora A, independentemente de sua atividade de quinase, desloca-se para o núcleo desencadeando propriedades oncogênicas através do aumento do fenótipo tronco tumoral (Zheng et al, 2016).

Apesar destes estudos indicando um papel importante da AURKA para o fenótipo tronco tumoral, o papel da AURKA para o fenótipo tronco tumoral induzido por KRAS em câncer de pulmão permanece inexplorado. Determinar se a AURKA participa do mecanismo de indução do fenótipo tronco tumoral por KRAS em células pulmonares é importante, não só para validação da AURKA como um alvo terapêutico para o câncer de pulmão induzido por este oncogene, que atualmente carece de terapias efetivas, mas também para validação da

inibição da AURKA como uma estratégia terapêutica que pode diminuir a resistência a outros quimioterápicos (visto que as CITs são quimioresistentes), ao mesmo tempo que pode diminuir a chance de recidivas futuras (Figura 1.9).

Figura 1.9. Terapia convencional combinada com terapia contra CITs. Terapias tradicionais têm como alvo células tumorais diferenciadas, permitindo que CITs continuem proliferando e, possivelmente, resultando em uma recidiva. Terapias contra CITs levam a eliminação dessa população mais agressiva levando a uma possível remissão tumoral. A terapia combinada, onde toda a população tumoral é combatida, levaria a erradicação do tumor. Adaptado de Leon et al 2016.

Para identificar alvos terapêuticos relacionados à biologia das CITs induzidas por KRAS no pulmão, este trabalho envolveu testar objetivamente a hipótese central de que a quinase Aurora A é um alvo da KRAS no câncer de pulmão envolvido na manutenção do fenótipo tronco tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O nosso objetivo geral foi determinar como a AURKA afeta o fenótipo tronco-tumoral de células pulmonares transformadas por KRAS visando o desenvolvimento desta quinase como alvo terapêutico.

2.2. Objetivos específicos

A hipótese foi testada e o objetivo geral alcançado através do desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar como a inibição da atividade ou expressão de AURKA afeta a quantidade de CITs presentes nas linhagens de adenocarcinoma pulmonar portadoras de mutações em KRAS A549 e H358;
- 2) Avaliar como a inibição da atividade ou expressão de AURKA nas linhagens de adenocarcinoma pulmonar A549 e H358 afeta a expressão de marcadores específicos de CITs;
- 3) Determinar o papel da quinase Aurora A para o fenótipo tronco-tumoral das CITs isoladas das linhagens de adenocarcinoma pulmonar A549 e H358.

3. MATERIAIS E PROCEDIMENTOS

3.1. Linhagens celulares

Para os ensaios de expressão gênica e ensaios biológicos de crescimento, viabilidade e tumorigenicidade *in vitro* foram utilizadas as linhagens de adenocarcinoma pulmonar humano portadora de mutação oncogênica em *KRAS*, designada A549 (G12S) (ATCC CCL-185), e de carcinoma bronquioalveolar pulmonar humano também portadora de mutação oncogênica em *KRAS*, designada H358 (G12C) (ATCC CRL-5807).

3.2. Condições de cultura, subcultura e preservação das linhagens celulares

As linhagens celulares A549 e H358 parentais foram cultivadas em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino, sem antibióticos, em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ 37°C. A subcultura foi feita sempre que as células atingiram 80 a 90% de confluência, utilizando-se solução de tripsina 0.1% (w/v) diluída em PBSA, adicionada de EDTA 0.53mM, e as passagens celulares foram devidamente registradas. Os estoques celulares foram criopreservados no meio de cultivo contendo dimetilsulfóxido 10% à temperatura de -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.3. Ensaio de formação de tumoresferas

As células de adenocarcinoma pulmonar (1.000 células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de baixa aderência de 6 poços com 2 mL de meio de cultura DMEM/F12 suplementado com N2 (Invitrogen), 20 ng/ml de FGF (fator de crescimento de fibroblasto, PeproTech) e 20 ng/ml de EGF (fator de crescimento epitelial, PeproTech) por 14 dias em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ 37°C. A cada três dias as esferas foram suplementadas com 500 µL de meio de cultura descrito acima. As tumoresferas foram fotografadas e o número e tamanho das tumoresferas foi determinado com o auxílio do programa CellF.

Para a geração de esferas secundárias, as tumoresferas primárias foram dissociadas na presença de accutase (Life Technologies), as células individuais foram contadas e 1.000 células foram plaqueadas por poço em placas de cultura de 6 poços de baixa aderência (Corning) em meio DMEM-F12 acrescido de 20 ng/mL de bFGF (PeproTech), 20 ng/mL de EGF (PeproTech) e suplementado com N2 (Invitrogen). O processo foi repetido para as esferas terciárias.

Para avaliar o efeito da inibição de AURKA e AURKB, o inibidor das quinases Aurora “*Aurora Kinase Inhibitor II*” (AI II, Cat# 189404 Calbiochen®) foi adicionado no momento do plaqueamento das esferas primárias, não sendo reutilizado em nenhum momento posteriormente, incluindo as culturas secundárias e terciárias. Alternativamente, as culturas de tumoresferas foram realizadas com células A549 e H358 com inibição de AURKA ou KRAS por interferência de RNA, conforme descrito no item 3.10.

3.4. Ensaio de formação de tumoresfera *single cell*

As tumoresferas oriundas das linhagens parentais A549 e H358 foram dissociadas após 7 dias em cultura e plaqueadas na densidade de 1 célula/poço em uma placa de cultura de baixa aderência de 96 poços com 100 µL de meio de cultura DMEM/F12 suplementado com N2 (Invitrogen), 20 ng/ml de FGF (PeproTech) e 20 ng/ml de EGF (PeproTech) por 14 dias em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ 37°C. A cada três dias as esferas foram suplementadas com 25 µL de meio de cultura descrito acima. Os poços com uma célula somente foram fotografados com 0, 7, 11 e 15 dias para avaliar a formação de tumoresfera a partir de uma única célula.

3.5. Ensaio de colônia

As tumoresferas oriundas das células parentais A549 e H358 foram dissociadas e 500 células oriundas das tumoresferas plaqueadas em placas p60 e incubadas em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino, sem antibióticos, em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ 37°C por 12 dias. A cada 3 dias o meio foi trocado. Ao final de 12 dias as células foram fixadas com metanol e coradas com solução de cristal violeta. As placas coradas foram então fotografadas e a quantificação foi feita a partir da contagem de colônias.

3.6. Crescimento tumoral xenográfico

Foram utilizados camundongos nude (Balb/c), de 4 a 8 semanas, os quais foram gerados e mantidos no Biotério de Produção e Experimentação da FCF/IQ-USP e

manipulados de acordo com protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Química da USP (#06/2014).

A linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549 (portadora da forma oncogênica da K-Ras) foram previamente cultivadas para formação de tumoresferas e após 15 dias, foram dissociadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura sem soro e mantidas em gelo até o momento da inoculação no animal. Como controle utilizamos as células cultivadas de forma aderente. Cada animal foi inoculado subcutaneamente no dorso com 0.1 ml da suspensão de células (contendo 1.10^5 células), após assepsia do local com etanol 70%. Os animais foram monitorados por 8 semanas e os tumores medidos duas vezes por semana. No dia do término do experimento de tumorigênese, os animais foram sacrificados por administração de CO₂ e os tumores formados extraídos cirurgicamente do dorso dos animais e pesados.

3.7. Extração e quantificação de RNA

Para extração de RNA, células em cultura aderente foram tripsinizadas e tumoresferas foram dissociadas e, em seguida, as células foram centrifugadas a 900 rpm por 7 minutos em tubos falcon de 50 mL. O meio de cultura foi, então, descartado e os pellets de células ressuspensos em 250 µL do reagente TRIZOL (Invitrogen®). Após homogenização, a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL e adicionou-se 100 µL de clorofórmio em cada tubo, agitando-os vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 14 minutos a 4°C. A fase transparente, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo e adicionou-se 250 µL de isopropanol a cada tubo, agitando-os vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram mantidos a 4°C overnight e em seguida centrifugados novamente a 14.000 rpm por 14

minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 100 μ L de etanol 100%. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 14 minutos e o sobrenadante descartado. O tubo contendo somente o precipitado de RNA foi mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. O RNA foi diluído em água autoclavada (Millipore, *MilliQ System*) e mantido em banho seco a 65°C por 5 minutos. Em seguida, mantendo os tubos com o RNA diluído em gelo, a concentração dos RNAs foi determinada por meio de sua absorbância a 260 nm no espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).

3.8. Síntese de cDNA

Após a extração de RNA total, todas as amostras foram tratadas com DNaseI, livre de RNase (*Thermo Scientific*), de modo a eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Para tanto, em um tubo livre de RNase foram adicionados o volume correspondente a 1 μ g de amostra de RNA, 1 μ L de tampão de amostra 10X já acrescido de MgCl₂, 1U de DNase I livre de RNase, e quantidade suficiente de água ultrapura (Millipore, *MilliQ System*) para volume final de 10 μ L de reação. Cada tubo foi incubado à temperatura de 37°C por 30 minutos. A seguir, foi adicionado 1 μ L de uma solução de EDTA 50mM e cada tudo foi novamente incubado, à temperatura de 65°C por 10 minutos.

Para síntese do cDNA, 1 μ g de RNA total tratado com DNase 1 (Invitrogen®) foi submetido à transcrição reversa com SuperScriptIII (Invitrogen®). Para 1 μ g de RNA tratado com DNase 1, foram adicionados 1 μ L de iniciadores randômicos (*random hexamers* 50 ng/ μ L) e 1 μ L de *Anneling Buffer* (Invitrogen®), completando com água para um volume final de 8 μ L. Os tubos foram incubados no termociclador Mastercycler gradient AG22331 (Eppendorf®) a 65°C por 5 minutos e depois colocados em gelo imediatamente. Em seguida, foram adicionados aos tubos, ainda no gelo, 10 μ L de 2x *First-Strand Reaction Mix*

(Invitrogen®) e 2 µL de SuperScript®III (Invitrogen®). As amostras foram agitadas delicadamente e em seguida incubadas no termociclador Mastercycler gradient AG2231 (Eppendorf®) a 25°C por 10 minutos, em seguida a 50°C por 50 minutos e finalmente a 85°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso.

3.9. PCR em Tempo Real

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®), com *primers* específicos para mRNAs de interesse (Tabela 3.1) desenhados com auxílio do programa *Primer Express 2.0®* (Applied Biosystems®), sendo a detecção realizada por fluorescência de *Sybr Green* e em triplicata técnica e experimental.

Para determinação da concentração ideal de cada par de *primers* a serem utilizados na reação de PCR em tempo real foram testadas as concentrações de 200, 400, 600 e 800 nM. A concentração utilizada foi a menor concentração que apresentou curva de dissociação com somente um pico e não apresentou variação do ciclo limiar quando comparado às maiores concentrações analisadas. Para todos os pares de *primers*, a concentração ótima determinada foi 200 nM. Para determinação da eficiência de cada par de *primers* (ver Tabela 3.1), após a determinação da concentração ótima, foi realizada uma reação de PCR em tempo real com diluições de cDNA nas proporções 1:15, 1:30, 1:60, 1:120 e 1:240. Os resultados dos ciclos limiares foram então relacionados à concentração do cDNA correspondente, gerando um gráfico. O coeficiente angular da equação de reta gerada foi utilizado para calcular a eficiência de cada par de *primers*, de acordo com a equação a seguir:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

Para a reação de PCR em tempo real foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços 3 µL do cDNA, 3 µL do *mix* de *primers* (*forward e reverse*) 200 ηM para os genes de interesse (Tabela 3.1) e 6 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®), de forma que os mesmos respeitem pré-requisitos otimizados para qRT-PCR conforme aconselhado pelo fabricante. A quantificação relativa dos genes alvos (Tabela 3.1) nas amostras foi determinada pelo método $\Delta\Delta C_t$ utilizando como controle endógeno genes humanos de expressão constitutiva GAPDH e β -actina.

Primers	Sequências	Eficiência
AURKA	Fw. 5' GAAAGCCGGAGTGGAGCAT 3' Rv. 5' TGCCGAAGGTGGGACTGTAT 3'	97,04%
ABCG2	Fw. 5' ACTTTGGGCTAAAAAATGATTCTACTG 3' Rv. 5' CACTGGTTGGTGGTCAGGAA 3'	97,40%
β -actina	Fw. 5' GGCACCCAGCACAATGAAG 3' Rv. 5' CCGATCCACACGGGAGTACTTG 3'	127,26%
BMI	Fw. 5' CCCACCTGATGTGTGTGCT 3' Rv. 5' GGTCTCCAGGTAACGAACAATACA 3'	98,20%
CD24	Fw. 5' GACATGGGCAGAGCAATGGTGGC 3' Rv. 5' GAGTGAGACCACGAAGAGACTGGC 3'	89,85%
CXCR4	Fw. 5' GGCCGACCTCCTCCTTTGT 3' Rv. 5' TTGCCACGGGCATCAACTG 3'	122,20%
GAPDH	Fw. 5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAAC 3' Rv. 5' ATGGTGGTGAAGACGCCAGT 3'	152,07%
KLF4	Fw. 5' AGCAGGTGCCCCGAATAAC 3' Rv. 5' TCCAGGTCCAGGAGATCGTT 3'	100%
KRAS	Fw. 5' CCCAGGTGCGGGAGAGA 3' Rv. 5' CAGCTCCAACCTACCACAAGTTT 3'	141,44%
Nanog	Fw. 5' CCTCAGCCTCCAGCAGATG 3' Rv. 5' CAGTTGTTTTCTGCCACCTCTT 3'	103,10%
Oct4	Fw. 5' TCGAGCAATTTGCCAAGCT 3' Rv. 5' GCCTCAAAGCGGCAGATG 3'	93,50%
Sox2	Fw. 5' CCCGGCGGAAAACCAA 3' Rv. 5' GCCGGGCAGCGTGTACT 3'	137,90%

Tabela 3.1. Sequências de *primers forward* (Fw.) e *reverse* (Rv.) utilizadas nas reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

3.10. Transfecção com siRNAs

A inibição transiente de KRAS ou AURKA nas linhagens pulmonares A549 e H358 foi realizada utilizando-se um *pool* (Dharmacon *siGenome Smart Pool siRNA Design*[®]) contendo 5 *small interfering RNAs* (siRNAs) para a KRAS humana (siKRAS, cat# M-005069-00 Dharmacon) ou para a AURKA humana (siAURKA, Cat# M-003545-10 Dharmacon). Como controle negativo, as células foram transfectadas com siRNA controle *non-targeting* #3 (siCtrl, Cat# D-001210-03-20 Dharmacon), que não possui homologia a genes humanos conhecidos. Para tanto, as células A549 e H358 foram plaqueadas (1.10^5 células/poço) em placas de 6 poços em meio RMPI-1640 suplementado com 10% de soro feral bovino. Após 24h, foi preparado o *mix* de siRNA e reagente de transfecção. No tubo 1, 5 μ L do siRNA de interesse na concentração estoque de 20 μ M foi diluído em 45 μ L de tampão siRNA *buffer* 1x (Dharmacon), em seguida, 150 μ L de meio RPMI sem soro feral bovino foi adicionado ao tubo 1. No tubo 2, 4 μ L do reagente de transfecção DharmaFECT[®] (Cat# T-2001-02 GE Dharmacon) foi diluído em 196 μ L de meio RPMI sem soro feral bovino e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, o conteúdo do tubo 2 foi adicionado ao tubo 1 e mantido à temperatura ambiente por 20 minutos. Nesse intervalo, o meio foi retirado da placa, as células lavadas com PBS e foram adicionados 1,6 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro feral bovino em cada poço. Por fim, 400 μ L do *mix* de siRNA + DharmaFECT foi adicionado a cada poço contendo as células e as mesmas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂. Para enriquecimento de células iniciadoras tumorais por cultura de tumoresferas, as células foram utilizadas 24h-48h após a transfecção. Para avaliar a eficiência de inibição da expressão dos genes de interesse, o RNA foi extraído 72h após a transfecção.

3.11. Identificação de marcadores de superfície por citometria de fluxo

Para citometria de fluxo foram utilizadas 1.10^5 células A549 ou H358 cultivadas de forma aderente ou oriundas de tumoresferas dissociadas com Accutase (Sigma). As células foram lavadas com PBS e incubadas com PBS contendo 1% de albumina bovina sérica por 30 minutos a 4°C para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos utilizados. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com os seguintes anticorpos primários monoclonais marcados com *tags* fluorescentes PE (ficoeritrina) ou FITC (isotiocianato de fluoresceína): CD133/1 (AC133)-PE (Miltenyi Biotec), FITC mouse anti-human CD 24 clone ML5 (BD Pharmingen) e/ou mouse anti-human CD44-PE clone G44-26 (C26) (BD Pharmingen). Após serem lavadas duas vezes com PBS, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% e analisadas em um citômetro de fluxo BD FACScalibur™ (Becton-Dickinson, EUA). Foram analisados um total de 10.000 eventos por amostra. O *gating* foi estabelecido com base na amostra parental sem o anticorpo utilizado, de forma que 100% dessas células estivessem fora do *gate* de marcação. Os dados coletados foram analisados pelo programa KALUZA.

3.12. Purificação de células por citometria de fluxo

As células A549 e H358 parentais foram tripsinizadas, lavadas com PBS e incubadas com meio RPMI contendo 1% de albumina bovina por 30 minutos a 4°C para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo monoclonal fluorescente FITC *mouse anti-human CD24 clone ML5* (BD Pharmingen). Após serem lavadas duas vezes com PBS, as amostras foram levadas em meio

RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino ao *FACS Aria III Cell Sorter* (CEFAP – ICB) para separação celular. Após a separação, as células foram plaqueadas separadamente em cultura CD24+ e CD24-, na ausência e presença do inibidor da quinase Aurora A (AI II), para formação de tumoresferas.

3.13. Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados na forma de média e desvio padrão ou através de imagens representativas de 3 experimentos independentes. A significância no número de tumoresferas formadas, na expressão gênica por PCR em tempo real e a expressão de marcadores de superfície foram determinadas pelo teste “student t” não pareado para amostras com variação desigual, sendo consideradas significativas diferenças com valor $p \leq 0.05$

4. RESULTADOS

4.1. A células oriundas de tumoresferas possuem maior capacidade clonogênica e tumorigênica

A cultura de tumoresferas enriquece para CITs *in vitro*, sendo que o número de tumoresferas formadas é proporcional ao número de CITs presentes na população celular (Cao e col., 2011). Por outro lado, uma das críticas sobre o uso desta cultura para enriquecer para CITs é a possibilidade de que as tumoresferas observadas não sejam oriundas de CITs individuais, mas de agregados das células plaqueadas, principalmente quando as tumoresferas formadas tem formato irregular. Para demonstrar que as tumoresferas que observamos nas nossas culturas são de fato oriundas de uma única célula inicial, nós realizamos, na linhagem H358, um ensaio de formação de tumoresfera *single cell*, aonde plaqueamos uma única célula por poço em placa de 96 poços e observamos o crescimento de uma tumoresfera a partir de uma única célula (Figura 4.1).

Após demonstrar que as tumoresferas de fato se originam de uma única célula inicial, nós continuamos a avaliar se as tumoresferas oriundas das nossas linhagens apresentavam de fato enriquecimento do fenótipo tronco-tumoral quando comparadas com as linhagens parentais aderentes.

Uma das características das CITs é que elas apresentam expressão aumentada de genes que são expressos em células tronco normais, incluindo fatores de transcrição e proteínas de superfície (Moghbeli *et al*, 2014). Portanto, uma das formas de validar o enriquecimento de CITs pela cultura de tumoresferas é avaliar se ocorre um enriquecimento da expressão destes marcadores. Inicialmente, nós avaliamos por qRT-PCR, a expressão dos fatores de transcrição de células tronco SOX2, OCT4, NANOG e BMI1, da bomba de efluxo ABCG2, que tem

expressão aumentada em células tronco (Wang et al, 2014), e CXCR4, um receptor de quimioquina enriquecido em CITs envolvido em promover metástase (Hermann et al, 2007). Como pode ser visto na Figura 4.2, quando comparada às células oriundas de cultura aderente, as células oriundas de tumoresferas das duas linhagens avaliadas (H358 e A549) apresentam um aumento significativo na expressão destes fatores.

Uma outra característica das CITs é que elas são mais oncogênicas que as outras células tumorais (Reya et al, 2001; Ricci-Vitani et al, 2007; Cao et al, 2011). Portanto, para verificar se as células oriundas de tumoresferas são mais oncogênicas que as células cultivadas de forma aderente, nós realizamos ensaios de formação de colônia, que medem a clonogenicidade celular. Nós observamos que as células oriundas de tumoresferas secundárias formam maior número de colônias do que as primárias, que, por sua vez, formam maior número de colônias que as aderentes (Figura 4.3).

Figura 4.1. Formação de tumoresfera a partir de uma célula única. Fotos representativas do crescimento de uma tumoresfera a partir de uma única célula. A barra de escala corresponde a 100 μm.

Figura 4.2. A cultura de tumoresferas leva a um aumento da expressão de fatores de célula tronco. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes SOX2, NANOG, BMI1, OCT4, ABCG2 e CXCR4 em tumoresferas oriundas da linhagem A549 (A) ou H358 (B) comparadas à cultura aderente das mesmas linhagens. GAPDH foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, de acordo com o teste Student-t.

Posteriormente, avaliamos a capacidade tumorigênica das tumoresferas *in vivo*. Para tanto, nos geramos tumoresferas primárias da linhagem A549 e inoculamos células oriundas das tumoresferas no lado direito do dorso de camundongos BalbC/nude. Como controle, inoculamos o mesmo número de células parentais oriundas de cultura aderente no lado esquerdo do dorso do mesmo camundongo. Como observado na Figura 4.4, as células oriundas das tumoresferas formaram tumores significativamente maiores, quando comparados com os tumores formados pelas células aderentes.

Com esses dados nós confirmamos que, quando comparadas às células parentais cultivadas de forma aderente, as células oriundas de tumoresferas apresentam maior clonogenicidade *in vitro* e maior tumorigenicidade *in vivo*. Estes resultados corroboram a nossa hipótese de que a cultura de tumoresferas das nossas linhagens são enriquecidas para um fenótico tronco tumoral.

Figura 4.3. Células oriundas de tumoresferas apresentam maior clonogenicidade. Número de colônias formadas de células A549 (A) e H358 (B) cultivadas de forma aderente ou oriundas de tumoresferas primárias e secundárias. Os asteriscos indicam $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, de acordo com o teste ANOVA. Imagens representativas das colônias formadas foram incluídas à direita.

Figura 4.4. Células oriundas de tumoresferas apresentam maior tumorigenicidade. Camundongos BalbC/Nude foram inoculados subcutaneamente com 1.10^5 células A549 oriundas de cultura aderente (flanco esquerdo) ou oriundas de tumoresferas (flanco direito). O gráfico representa os pesos dos tumores formados 40 dias após a inoculação (n=3 por grupo). O valor p está indicado, de acordo com o teste Student-t.

4.2. A inibição da atividade ou expressão de AURKA nas linhagens A549 e H358 reduz a quantidade de CITs e sua capacidade de autorrenovação.

Para avaliar como as quinases Aurora afetam as CITs, nós utilizamos, nas linhagens A549 e H358, tanto inibição farmacológica da atividade das quinases Aurora com Aurora Kinase Inhibitor II (AI II, Calbiochem®), quanto interferência de RNA (RNAi) para inibir diretamente a expressão de KRAS e AURKA. Em seguida nós avaliamos, usando a cultura de tumoresferas, o número de CITs e sua capacidade de autorrenovação.

Como pode ser visto na Figura 4.5, a inibição dual das quinases Aurora A e B com AI II promove uma redução no número e no tamanho das tumoresferas primárias formadas. Na linhagem H358 esta redução ocorreu de forma dose-dependente atingindo 75% de redução na concentração de 5 μ M de AI II.

É possível ainda que o número de tumoresferas formadas, seja subestimado, uma vez que essas tumoresferas possuem mobilidade na cultura em suspensão e possam ocorrer fusões entre tumoresferas já formadas, principalmente no controle devido a maior quantidade e tamanho de tumoresferas formadas, levando a uma quantificação menor ao final de 15 dias.

Como o inibidor AI II é um inibidor dual, nós realizamos a inibição por interferência de RNA da quinase Aurora A individualmente para determinar o papel desta quinase para a formação de tumoresferas, usando como controle positivo a inibição de KRAS e como controle negativo a transfecção com um siRNA sem homologia a genes humanos conhecidos. Primeiramente, nós obtivemos uma inibição eficiente, tanto da expressão de KRAS (da ordem de 91%), quanto da expressão de AURKA (da ordem de 89%) (Figura 4.6a e 4,7a). Conforme esperado, a inibição de KRAS reduziu o número de tumoresferas em 83% na linhagem H358 e 86% na linhagem A549. De maneira similar, a inibição da quinase Aurora A nas duas

linhagens também levou a uma diminuição semelhante no número e tamanho das tumoresferas primárias (Figura 4.6b e 4.7b).

Figura 4.5. A inibição da atividade das quinases Aurora reduz a formação de tumoresferas. Número de tumoresferas provenientes das linhagens celulares A549 (A) e H358 (B) tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas ou 0,1% DMSO como controle de solvente (Ctrl). Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$ e * $p < 0.05$, de acordo com o teste ANOVA. Imagens representativas das tumoresferas formadas foram incluídas à direita. A barra de escala corresponde a 100 μ m.

Figura 4.6. A inibição da expressão de KRAS e da quinase Aurora A reduz a formação de tumoresferas. (A) Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes KRAS e AURKA nas células A549 transfectadas com siRNAs para AURKA (siAURKA), KRAS (siKRAS), comparadas às mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, de acordo com o teste Student-t. (B) Número das tumoresferas provenientes das linhagens celulares A549 transfectadas com siRNAs para AURKA (siAURKA), KRAS (siKRAS) ou siRNA sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, de acordo com o teste ANOVA. Imagens representativas das tumoresferas formadas para cada linhagem foram incluídas à direita. A barra de escala corresponde a 100 μm .

Figura 4.7. A inibição da expressão de KRAS e da quinase Aurora A reduz a formação de tumoresferas. (A) Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes KRAS e AURKA nas células H358 transfectadas com siRNAs para AURKA (siAURKA), KRAS (siKRAS), comparadas às mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$ e *** $p < 0.001$, de acordo com o teste Student-t. (B) Número das tumoresferas provenientes das linhagens celulares H358 transfectadas com siRNAs para AURKA (siAURKA), KRAS (siKRAS) ou siRNA sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, de acordo com o teste ANOVA. Imagens representativas das tumoresferas formadas para cada linhagem foram incluídas à direita. A barra de escala corresponde a 100 μm .

Considerando que o número tumoresferas está correlacionado com o número de CITs presentes, estes resultados sugerem que, tanto a inibição de KRAS, quanto a inibição de AURKA reduzem o número de células com fenótipo tronco-tumoral, ou seja, de CITs.

Uma vez que a capacidade de autorrenovação é uma propriedade de células tronco importante para a função das CITs, nós resolvemos avaliar se as CITs restantes após a inibição de AURKA tem sua capacidade de autorrenovação preservada. O ensaio de tumoresferas permitem que as células permaneçam indiferenciadas, de forma que a eficiência de formação de esferas em passagens seriadas pode ser utilizada como teste de auto renovação *in vitro* (Dontu et al, 2003). Para tanto, nós avaliamos a capacidade de formar tumoresferas em culturas secundárias e terciárias. As culturas de tumoresferas primárias foram passadas até a cultura terciária, sendo que o inibidor AI II foi adicionado somente no primeiro dia da cultura primária. Após 15 dias, as esferas primárias foram dissociadas e um número idêntico de células de cada tratamento plaqueadas novamente para formação de tumoresferas secundárias. Para formação de tumoresferas terciárias, o procedimento foi repetido dissociando-se as esferas secundárias.

Em todas as passagens, as células tratadas com AI II, quando comparadas ao controle tratado com DMSO da mesma passagem, apresentaram redução no número e tamanho de esferas formadas (Figura 4.8). Infelizmente, não conseguimos obter células suficientes para cultura terciária das tumoresferas secundárias tratadas com 5 μ M de AI II para a linhagem A549 e 2 e 5 μ M para a linhagem H358, o que indica uma perda significativa na capacidade de autorrenovação das CITs oriundas destas linhagens após o tratamento inicial com AI II. Observamos ainda uma queda no número de esferas entre a cultura primária e secundária das amostras controle (tratadas com DMSO, Figura 4.8). Este resultado inesperado pode ser explicado pelo fato de que na cultura primária, algumas células que não apresentam propriedades de célula tronco tumoral conseguem sobreviver e formar esferas, enquanto que

na cultura secundária há uma maior seleção de células tronco tumorais, que sobrevivem graças à sua capacidade de autorrenovação. Consistente com esta ideia, não observamos diferença no número de esferas formadas nas amostras controle entre as culturas secundária e terciária. No entanto, o tratamento com AI II leva a uma redução maior na formação das tumoresferas terciárias do que na formação de tumoresferas secundárias, o que indica que as células tratadas com este inibidor tiveram sua capacidade de autorrenovação reduzida (Figura 4.8).

Figura 4.8. A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz formação de tumoresferas secundárias e terciárias. Número de tumoresferas em 3 passagens provenientes das linhagens celulares A549 (A) e H358 (B) tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas ou 0,1% DMSO como controle de solvente (Ctrl). Os asteriscos indicam *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ e n.s. não significativo, de acordo com o teste Student-t. Imagens representativas das tumoresferas formadas foram incluídas à direita. A barra de escala corresponde a 100 μm .

4.3. A inibição da quinase Aurora A em CITs das linhagens A549 e H358 reduz o fenótipo tronco-tumoral

Uma característica associada ao fenótipo tronco-tumoral que está enriquecida nas tumoresferas é a expressão de fatores de transcrição e proteínas de superfície que são abundantes em células tronco normais (Figura 4.2). Portanto, se a inibição da AURKA reduz o número de tumoresferas (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7) e afeta a sua função de autorrenovação (Figura 4.8), seria esperado que as tumoresferas formadas na presença da inibição de AURKA tivessem uma expressão reduzida destes marcadores de célula tronco. De fato, ao compararmos tumoresferas das linhagens A549 e H358 controle (tratadas com DMSO) e tumoresferas tratadas com AI II, nós observamos uma redução em maior ou menor grau da expressão dos fatores de células tronco SOX2, Nanog, BMI, OCT4, ABCG2 e CXCR4 nas amostras tratadas com AI II (Figura 4.9).

Nós também avaliamos como a expressão destes marcadores é afetada pela inibição da AURKA e KRAS por RNA de interferência. Para tanto, as células A549 e H358 foram transfectadas com siCtrl, siAURKA e siKRAS e depois de 24h foram plaqueadas para formação de tumoresferas por 15 dias. Como mostrado na figura 4.9, após 15 dias ainda observamos a redução da expressão de AURKA na cultura tratada com siAURKA e com siKRAS, como também a redução de KRAS na cultura tratada com siKRAS (Figura 4.10). Observamos também a redução da expressão do CXCR4 e do fator de transcrição de célula tronco KLF4 quando AURKA foi inibida (Figura 4.11a e 4.12a). Já na cultura tratada com siKRAS, não só observamos a redução dos mesmos fatores de célula tronco que reduzidos pela inibição da AURKA, mas também do ABCG2 e OCT4 (Figura 4.11b e 4.12b). Esses resultados sugerem a importância não só da quinase Aurora A para a manutenção do fenótipo tronco tumoral, como também de KRAS.

Uma outra característica associada ao fenótipo tronco-tumoral que está enriquecida nas tumoresferas é a oncogenicidade, sendo que estas células apresentam uma maior capacidade clonogênica (Figura 4.3). O ensaio de colônia é um importante ensaio para avaliação da oncogenicidade *in vitro* e da viabilidade celular (Romain et al, 2014; Mahmoodi e Akrami, 2016). Para avaliar se a inibição farmacológica das quinases Aurora com AI II afeta a oncogenicidade das CITs oriundas da linhagem A549 e H358, nós realizamos ensaios clonogênicos e comparamos a formação de colônias de células oriundas de tumoresferas tratadas com AI II com células oriundas de tumoresferas controle (tratadas com DMSO). Nós observamos uma redução na capacidade clonogênica das células oriundas de tumoresferas primárias tratadas com AI II, principalmente com a concentração de 5 μ M, uma vez que células oriundas de tumoresferas tratadas apresentaram um número bastante reduzido de colônias (Figuras 4.13 e 4.14). Esta redução na capacidade clonogênica foi mantida nas tumoresferas secundárias e terciárias (Figuras 4.13 e 4.14), que são cultivadas na ausência de AI II, indicando que a inibição inicial das quinases Aurora é suficiente para afetar a função das CITs remanescentes mesmo na ausência de inibição posterior.

Resultados semelhantes foram obtidos com a inibição de AURKA por interferência de RNA (Figura 4.15), indicando que a AURKA é importante para a manutenção do fenótipo tronco-tumoral em células pulmonares portadoras de ativação oncogênica da KRAS.

Figura 4.9. Tumoresferas tratadas com inibidor das quinases Aurora apresentam uma redução na expressão de fatores de célula tronco. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes SOX2, NANOG, BMI1, OCT4, ABCG2 e CXCR4 em tumoresferas oriundas das linhagens A549 (A) e H358 (B) tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas ou 0,1% DMSO como controle de solvente (Ctrl). GAPDH foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, de acordo com o teste ANOVA.

Figura 4.10. Análise da eficiência de inibição da expressão por interferência de RNA de AURKA e KRAS em tumoresferas formadas. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes AURKA e KRAS em tumoresferas oriundas das linhagens A549 (A) e H358 (B) transfectadas com siRNAs para AURKA (siAURKA) ou KRAS (siKRAS), comparadas às tumoresferas oriundas das mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl) após 15 dias em cultura. Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, de acordo com o teste Student-t.

Figura 4.11. A inibição da expressão da quinase Aurora A ou KRAS reduz a expressão de fatores de célula tronco em tumoresferas. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes KLF4, OCT4, ABCG2 e CXCR4 em tumoresferas oriundas da linhagem A549 transfectadas com siRNAs para (A) AURKA (siAURKA) ou (B) KRAS (siKRAS), comparadas às tumoresferas oriundas das mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, de acordo com o teste Student-t.

Figura 4.12. A inibição da expressão da quinase Aurora A ou KRAS reduz a expressão de fatores de célula tronco em tumoresferas. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo dos genes KLF4, OCT4, ABCG2 e CXCR4 em tumoresferas oriundas da linhagem H358 transfectadas com siRNAs para (A) AURKA (siAURKA) ou (B) KRAS (siKRAS), comparadas às tumoresferas oriundas das mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, de acordo com o teste Student-t.

Figura 4.13. A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz a clonogenicidade de células A549 oriundas de tumoresferas. Porcentagem de colônias formadas de células A549 oriundas de tumoresferas primárias (Esferas 1°, n=3), secundárias (Esferas 2°, n=3) e terciárias (Esferas 3°, n=1) tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas em relação às células controle (Ctrl) oriundas de tumoresferas tratadas com 0,1% DMSO (controle de solvente). Os asteriscos indicam ****p<0.0001, ***p<0.001 e **p<0.01, de acordo com o teste ANOVA. (B) Imagens representativas das colônias formadas em cada passagem foram incluídas à direita.

Figura 4.14. A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz a clonogenicidade de células H358 oriundas de tumoresferas. Porcentagem de colônias formadas de células H358 oriundas de tumoresferas primárias (Esferas 1°, n=3), secundárias (Esferas 2°, n=3) e terciárias (Esferas 3°, n=1) tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas em relação às células controle (Ctrl) oriundas de tumoresferas tratadas com 0,1% DMSO (controle de solvente). Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, e * $p < 0.05$, de acordo com o teste ANOVA. Imagens representativas das colônias formadas em cada passagem foram incluídas à direita.

Figura 4.15. A inibição da expressão de AURKA reduz a clonogenicidade de células oriundas de tumoresferas. Número de colônias formadas de células A549 (A) ou H358 (B) oriundas de cultura aderente, de tumoresferas primárias (Esferas 1°) ou secundárias (Esferas 2°) e transfectadas com siRNAs para AURKA (siAURKA) ou siRNA sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Imagens representativas das colônias formadas foram incluídas sob cada gráfico. Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, de acordo com o teste Student-t.

4.4. Seleção de marcador de célula tronco para as linhagens A549 e H358

Com o intuito de obter um enriquecimento das CITs pulmonares mais rápido e superior ao obtido na cultura de tumoresferas, nós resolvemos utilizar marcadores de superfície de célula tronco, que pudessem ser usados para purificar uma população enriquecida de CITs. Apesar de alguns tipos tumorais já terem marcadores de superfície bem estabelecidos que enriquecem para CITs, os marcadores de superfície que se encontram enriquecidos nas CITs pulmonares ainda são controversos (Alamgeer e col., 2013). Para identificar um bom marcador para posterior purificação de CITs pulmonares, nós avaliamos inicialmente os seguintes marcadores de superfície comumente associados às CITs de outros tecidos: CD44, CD24 e CD133. Para tanto, nós utilizamos citometria de fluxo para verificar se ocorreu enriquecimento de células positivas para estes marcadores em tumoresferas da linhagem A549. Quando comparado à linhagem parental aderente, nós observamos um aumento significativo (de 20,7% para 33,6%) de células marcadas para CD24 nas tumoresferas, mas não observamos enriquecimento para CD44 e CD133 (Figura 4.16).

Para corroborar os dados de citometria, avaliamos a expressão de CD24, como marcador enriquecido em CITs, por PCR quantitativo desse marcador em tumoresferas quando comparada às células provenientes de cultura aderente. Observamos que as células oriundas de tumoresferas das duas linhagens avaliadas (H358 e A549) apresentam um aumento significativo na expressão do CD24 (Figura 4.17).

Figura 4.16. Tumoresferas oriundas da linhagem A549 apresentam enriquecimento de células positivas para o marcador de células tronco CD24. Análise por citometria de fluxo do marcador de superfície CD24 (A), CD44 (B) e CD133 (C) nas células A549 e tumoresferas primárias provenientes dessas células. O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para CD24 (A), CD44 (B) no eixo horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical (A e B) usando uma escala logarítmica. (C) O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para CD24 na horizontal e CD133 na vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (área retangular ou quadrantes) foi determinado arbitrariamente usando células A549 não marcadas como referência negativa. A porcentagem de células positivas para cada marcador de superfície está indicada.

Figura 4.17. A cultura de tumoresferas leva a um aumento da expressão de *CD24*. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo do marcador de superfície de célula tronco *CD24* em tumoresferas oriundas da linhagem A549 (A) ou H358 (B) comparadas à cultura aderente das mesmas linhagens. *Actina* foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os asteriscos indicam **** $p < 0.001$ de acordo com o teste Student-t.

Interessantemente, observamos que células A549 e H358 cultivadas de maneira aderente padrão, quando tratadas com o inibidor das quinases Aurora AI II apresentam uma redução no número de células CD24 positivas (Figura 4.18). Como tanto o enriquecimento causado pela cultura de tumoresferas, quanto a redução causada por AI II parece afetar somente a expressão de CD24, escolhemos esse marcador para purificar CITs das nossas linhagens.

Figura 4.18. A inibição farmacológica das quinases Aurora nas células pulmonares A549 e H358 reduz o número de células positivas para o marcador de superfície de células tronco CD24. Análise por citometria de fluxo do marcador de superfície CD24 nas células A549 e H358 tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas ou 0,1% DMSO como controle de solvente (Ctrl) por 48h. O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células A549 (A) ou H358 (B) vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para CD24 horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (área retangular) foi determinado arbitrariamente usando células A549 (A) ou H358 (B) não marcadas como referência negativa. A porcentagem de células positivas para CD24 está indicada.

As células H358 aderentes foram marcadas com CD24 e purificadas por citometria de fluxo no FACS ARIA III Cell Sorter (CEFAP - ICB), onde recuperamos as células controles, que não foram marcadas com anticorpo anti-CD24, e as populações positivas (CD24+) e negativas (CD24-) para CD24. Essas células foram plaqueadas para crescimento de tumoresferas primárias na ausência e presença do inibidor das quinases Aurora AI II. As células CD24+ formaram maior número de tumoresferas quando comparadas às células

controle não marcadas, a um controle contendo 50% de células positivas e 50% de células negativas para CD24 (CD24+/-) misturadas após a separação celular ou quando comparadas às células CD24- (Figura 4.19). As células negativas para CD24, embora ainda formem tumoresferas, formam um número reduzido quando comparadas ao controle CD24+/- e CD24+ (Figura 4.19). O tamanho das tumoresferas nestes experimentos é menor do que observado nos experimentos mostrados anteriormente, provavelmente devido ao estresse causado pelo processo de separação celular por citometria de fluxo.

Figura 4.19. Células positivas para o marcador de superfície CD24 possuem maior capacidade de formar tumoresferas. Número de tumoresferas oriundas de células H358 não marcadas para CD24 (Ctrl), de uma mistura 1:1 de células H358 positivas e negativas para CD24 (CD24+/-), de células H358 positivas (CD24+) e de células H358 negativas (CD24-) para CD24 purificadas por citometria de fluxo. Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$, de acordo com o teste Student-t. Imagens representativas das tumoresferas formadas foram incluídas na porção inferior. A barra de escala corresponde a 100 µm.

Interessantemente, o tratamento com AI II embora tenha causado uma redução no número de tumoresferas oriundas de células negativas para CD24, inibiu preferencialmente a formação de tumoresferas a partir de células positivas para CD24 (Figura 4.20). Isto fica evidente ao analisarmos a formação de tumoresferas submetidas ao tratamento com AI II na

concentração de 2 μM . Enquanto não há redução no número de tumoresferas formadas a partir de células negativas para CD24, ocorre uma redução de cerca de 50% na formação de tumoresferas geradas a partir de células positivas para CD24 (Figura 4.20).

Figura 4.20. A inibição farmacológica das quinases Aurora reduz preferencialmente a capacidade de células CD24+ formarem tumoresferas. Quantificação das tumoresferas provenientes da linhagem celular H358 positivas (CD24+) e negativas (CD24-) para o marcador CD24 tratadas com Inibidor de Aurora (AI II) nas concentrações indicadas ou 0,1% DMSO como controle de solvente (Ctrl). Os asteriscos indicam **** $p < 0.0001$ e ** $p < 0.01$, de acordo com o teste Student-t. Imagens representativas das tumoresferas formadas foram incluídas à direita. A barra de escala corresponde a 100 μm .

Tendo em vista os resultados descritos nesta dissertação, nós concluímos que a inibição da quinases Aurora, principalmente da quinase Aurora A, leva a uma redução no número de CITs pulmonares portadoras de mutação em KRAS e afeta o fenótipo tronco tumoral das CITs restantes, reduzindo sua autorrenovação, expressão de marcadores de células tronco e diminuído sua oncogenicidade. Portanto, a inibição das quinases Aurora, combinada com outras abordagens, pode resultar no desenvolvimento de novas terapias mais eficientes, reduzindo o risco de recidivas e metástase.

5. DISCUSSÃO

O modelo das células iniciadoras de tumor propõe uma organização celular hierárquica para os tumores, na qual células iniciadoras de tumor (CITs) tumorigênicas “se diferenciam” em células não tumorigênicas (Visvader e Lindeman, 2012). Desta forma, CITs são definidas como células tumorais autorrenováveis capazes de iniciar a formação de tumores e sustentar o crescimento tumoral. CITs são resistentes à quimio- e radioterapia convencionais e acredita-se que elas sejam responsáveis pela disseminação tumoral e pelo crescimento de metástases (Visvader e Lindeman, 2012; Li et al, 2013). Portanto, as diferenças funcionais entre células com e sem potencial tumorigênico têm implicações importantes para terapia. De fato, terapias dirigidas a CITs se mostraram benéficas em câncer de pâncreas (Jimeno et al, 2009; Li et al, 2011; Balic et al, 2014) e de pulmão (Sullivan et al, 2010; Serrano et al, 2011; Jokinen et al, 2014; Yang et al, 2015; Di martile et al, 2016; Liu et al, 2016).

Entretanto, os tumores podem conter populações heterogêneas e biologicamente distintas de CITs. Estas diferenças refletem diferenças na célula de origem do tumor, nas mutações oncogênicas que guiam a tumorigênese (e vias subjacentes que promovem um fenótipo tronco-tumoral), e até diferenças no nicho das CITs (Visvader e Lindeman, 2012). Em alguns casos, múltiplas populações de CITs podem existir dentro do mesmo tumor (Hermann et al, 2007; Jaiswal et al, 2012; Visvader e Lindeman, 2012). Um desafio importante é entender, em cada caso, as vias de sinalização que induzem o fenótipo tronco-tumoral. Um melhor entendimento destas vias fornecerá pistas importantes para o desenvolvimento de abordagens adjuvantes para terapia anti-tumoral.

Uma questão crítica nos tumores hierárquicos como o câncer de pulmão é identificar e isolar estas populações de CITs para investigar seu papel na formação, progressão e recidiva tumorais. Diferentes populações celulares capazes de desempenhar um papel de CITs já foram

descritas em câncer de pulmão (Eramo et al, 2007; Jiang et al, 2009; Leung et al, 2010; Akunuru et al, 2012). Mas até hoje CITs pulmonares induzidas pelo oncogene KRAS permanecem inexploradas.

Este é uma lacuna importante por várias razões. O câncer de pulmão é o câncer que mais mata no mundo e, no câncer de pulmão, a ativação oncogênica da GTPase KRAS ocorre em cerca de 40% dos casos (Cooper et al, 2013; Boland et al, 2015). A ativação oncogênica de KRAS por mutação, não só está associada a um pior prognóstico clínico em câncer de pulmão (Adjei, 2008), mas não existem terapias efetivas para pacientes portadores de mutações oncogênicas em *KRAS* (McCormick, 2016). Finalmente, as vias induzidas pela ativação oncogênica da KRAS promovem o fenótipo tronco-tumoral de CITs em outros tipos de neoplasias (Liu et al, 2009; Kim et al, 2010; Jiang et al, 2014), sugerindo esta via oncogênica como uma via central para a biologia das CITs e uma via racional para intervenção terapêutica.

Devido à alta incidência de mutações em *KRAS* em diversos tipos de câncer, muitos grupos buscaram a inibição direta dessa GTPase, porém, sem sucesso clínico até hoje (Liu et al, 1998; End et al, 2001; Lobell et al, 2002). Alternativamente, efetores das vias de KRAS passaram a ser investigados como uma maneira de se inibir indiretamente as vias oncogênicas desencadeadas por esta oncoproteína.

Nesse contexto, nosso grupo mostrou recentemente que KRAS, não só regula positivamente a expressão das quinases AURKA e AURKB no pulmão, como também que a inibição destas quinases reduz tanto a oncogenicidade de células pulmonares com mutação em KRAS *in vitro* quanto a sua tumorigenicidade *in vivo* (dos Santos et al, 2016). Mais importante ainda, a inibição farmacológica destas quinases afeta preferencialmente células pulmonares que expressam a forma oncogênica da KRAS, sugerindo a inibição destas quinases como uma abordagem terapêutica específica para esta via.

Neste trabalho nós investigamos o papel da quinase Aurora A para o fenótipo tronco tumoral de CITs pulmonares portadoras da forma oncogênica da KRAS. Esta quinase, além de ser um alvo de KRAS no pulmão envolvido em promover o fenótipo maligno (dos Santos et al, 2016), promove o fenótipo tronco-tumoral em outros tipos de neoplasia (Camareri et al, 2010; Chefetz et al, 2011; Xia et al, 2013; Mannino et al, 2014; Zheng et al, 2014).

Para avaliar o fenótipo tronco tumoral, nós utilizamos inicialmente o cultivo das células em condições especiais para formação de tumoresferas. Nós demonstramos que esta cultura promove a expressão dos fatores de transcrição de célula tronco SOX2 (Liu et al, 2013), OCT4 (Wu e Schöler, 2014), BMI (Wnag et al, 2012), Nanog (Amsterdam et al, 2013), do receptor CXCR4, envolvido em promover metástase (Gassenmaier et al, 2013) e da bomba de efluxo ABCG2, envolvida com quimioresistência (Mo e Zhang, 2012) (Figura 4.2). Todos estes fatores estão enriquecidos em células tronco normais e CITs, sendo que alguns tem uma relação direta em promover o fenótipo maligno. De fato, a expressão genética de marcadores de célula tronco é muito utilizada para caracterização de células com fenótipo tronco-tumoral (Suvà et al, 2009; Salerno et al, 2013; Salerno et al, 2014; Tang et al, 2015; Wee et al, 2016).

Além disso, nossas células oriundas de cultura de tumoresferas se mostraram mais oncogênicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estes resultados corroboram diversos trabalhos na literatura que mostram que a cultura de tumoresferas é capaz de selecionar células com propriedades tronco-tumorais (Kondo et al, 2004; Soeda et al, 2008; Cao et al, 2011; Kim et al, 2012).

Para investigar o papel da quinase AURKA sobre o fenótipo tronco tumoral, nós realizamos tanto a inibição farmacológica quanto a inibição por interferência de RNA da AURKA seguida da cultura de tumoresferas. Primeiramente nós observamos que a inibição de AURKA diminui nas tumoresferas a expressão de CXCR4 (Figuras 4.9, 4.11 e 4.12), um receptor celular envolvido em promover metástase (Gassenmaier et al, 2013), sugerindo um

envolvimento da AURKA neste processo. Este resultado está de acordo com trabalhos da literatura que mostram que a AURKA pode promover o fenótipo metastático (Goktas et al, 2014; Maimaiti et al, 2016).

Nós observamos também uma redução na expressão de KLF4 (Figuras 4.11 e 4.12), um fator de transcrição altamente expresso em CITs (Martins-Neves et al, 2016), que tem função oncogênica demonstrada (Pandya et al, 2004; Foster et al, 2005; Yu et al, 2011).

Interessantemente, a inibição de KRAS por interferência de RNA, não só reduziu a expressão de CXCR4 e KLF4, mas reduziu também a expressão da bomba de efluxo ABCG2 e do fator de transcrição OCT4 (Figuras 4.11 e 4.12). Estes resultados indicam, que embora a AURKA possa ser um componente importante da via de KRAS envolvida em promover CITs, outras vias reguladas por KRAS contribuem para manutenção do fenótipo tronco-tumoral. Como todos estes fatores tiveram expressão reduzida em células oriundas de tumoresferas tratadas com o inibidor AI II (figura 4.9), que inibe tanto a AURKA quanto a AURKB, é possível que a AURKB também contribua para o fenótipo tronco-tumoral. Interessantemente, a AURKB foi identificada como um de 5 genes com expressão aumentada em CITs pulmonares de 4 linhagens diferentes de câncer de pulmão (Perumal et al, 2012).

Além da redução na expressão destes fatores, a inibição da AURKA também diminuiu a formação de tumoresferas e autorrenovação das CITs (Figuras 4.5 e 4.8), bem como reduziu o potencial clonogênico das células oriundas tanto de tumoresferas primárias, quanto de tumoresferas secundárias e terciárias (Figuras 4.13 e 4.14). Estes resultados são apoiados por diversos trabalhos mostrando a importante relação entre a diminuição da expressão de alguns fatores de célula tronco e a diminuição da oncogenicidade. Por exemplo, a inibição da enzima ácido graxo sintase, responsável pela síntese de ácidos graxos, afeta a capacidade de invasão de CITs de gliomas (Yasumoto et al, 2016). A inibição do receptor EphA2 leva a redução do crescimento tumoral e da capacidade de invasão de CITs de gliomas (Miao et al, 2015). Em

CITs do fígado, a inibição de β -catenina resultou em baixa proliferação e invasão (Martins-Neves et al, 2016). Finalmente, Xia et al (2013) mostraram que a AURKA promove a autorrenovação de CITs de glioma através da interação com AXIN no complexo AXIN/GSK3 β / β -catenina, que leva à destruição desse complexo e estabilização da β -catenina.

Com o intuito de obter rapidamente (sem passar pela cultura de tumoresferas) uma população com maior grau de enriquecimento para CITs, nós buscamos um marcador de superfície de célula tronco que fosse enriquecido na cultura de tumoresferas.

Diversos marcadores já foram descritos como enriquecidos em CITs pulmonares, como CD133 (Eramo et al, 2007), CD44 (Jiang et al, 2009) e ALDH (Leung et al, 2010). Por outro lado populações com fenótipo tronco tumoral que não expressam estes marcadores também foram descritas (Akunuru et al, 2012; Roudi et al, 2015). Por exemplo, tanto células CD133⁺, quanto CD133⁻ oriundas da linhagem pulmonar A549 apresentaram capacidade equivalente de formar tumoresferas e formar tumores em ensaios xenográficos (Meng et al, 2009). Consistente com este achado, nós não observamos um enriquecimento de CD133 nas tumoresferas oriundas das nossas linhagens (Figura 4.16).

Nós resolvemos avaliar o marcador CD44 em conjunto com o CD24, uma vez que CITs de diversos tumores são CD44⁺/CD24⁻ (Al-Hajj et al, 2003; Sheridan et al, 2006; Hurt et al, 2008; Ghuwalewala et al, 2013). Para a nossa surpresa, não só não houve enriquecimento de CD44 (que é amplamente expresso nas nossas linhagens), mas houve enriquecimento de CD24 nas tumoresferas das nossas linhagens (Figuras 4.16 e 4.17). CD24 é uma proteína glicosilada ancorada à membrana celular que se liga a P-selectina, que, por sua vez, é uma molécula de adesão presente na superfície de células endoteliais e plaquetas, possuindo um importante papel na adesão célula-célula e célula-matrix extracelular (Lim 2005). CD24, não só é altamente expresso em diversos tipos de câncer (Huang e Hsu, 1995; Kristiansen et al, 2004; Sagiv et al, 2006; Schabath et al, 2006), incluindo câncer de pulmão (Karimi-Busheri et

al, 2013), mas também está relacionado a uma maior capacidade invasiva e a um pior prognóstico (Sano et al, 2009).

Alem das tumoresferas estarem enriquecidas para células positivas para CD24, a inibição de AURKA com AI II reduziu a porcentagem de células positivas para CD24 (Figura 4.18), corroborando este marcador como um marcador relevante associado ao fenótipo tronco-tumoral induzido por AURKA.

Entretanto a melhor evidência que aponta para o CD24 como um bom marcador de CITs pulmonares foi a observação de que células CD24 positivas purificadas formam tumoresferas mais eficientemente que as células CD24 negativas (Figura 4.19). Consistente com estes resultados, CITs caracterizadas pela expressão positiva de CD24 vem sendo descritas em alguns tipos de câncer, como por exemplo, câncer de colon (Yeung et al, 2010; Ke et al, 2012), mesotelioma (Yamazaki et al, 2012), câncer de pâncreas (Li et al, 2007b) e carcinoma da nasofaringe (Yang et al, 2014). Células pulmonares murinas com mutação em KRAS positivas para CD24 não só foram capazes de formar mais tumoresferas e tumores seriados, quando comparadas as células negativas para CD24, mas também contribuíram para maior resistência a cisplatina nos camundongos (Zheng et al, 2013). Finalmente, corroborando os nossos resultados, um estudo avaliando CD24 na linhagem A549 demonstrou que as células CD24⁺ eram menos oncogênicas (Xu et al, 2015).

Finalmente, nós observamos que a inibição de AURKA com AI II diminuiu preferencialmente a formação de tumoresferas a partir de células CD24 positivas (Figura 4.20). Estes resultados indicam que a inibição da AURKA causa um maior efeito em CITs do que células diferenciadas.

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta dissertação indicam que a quinase AURKA promove o fenótipo tronco-tumoral de células pulmonares que expressam a

KRAS oncogênica. Tendo em vista que a população do tumor que possui um fenótipo tronco-tumoral é mais oncogênica, sendo responsável pela disseminação e reincidência tumoral, a investigação de alvos terapêuticos que possam eliminar ou contribuir para o controle desta população é de extrema importância para o desenvolvimento de uma terapia efetiva, principalmente para o câncer de pulmão positivo para KRAS, que não possui terapias-alvo efetivas. Os nossos resultados sugerem o uso da inibição da atividade de AURKA como uma abordagem terapêutica relevante para CITs de câncer de pulmão associadas a mutações ativadoras de KRAS.

6. CONCLUSÕES

Tendo como objetivo geral do nosso projeto determinar como a AURKA afeta o fenótipo tronco-tumoral de células pulmonares transformadas por KRAS, observamos que:

- a) As linhagens de adenocarcinoma pulmonar com ativação oncogênica da KRAS A549 e H358 apresentam um enriquecimento do fenótipo tronco-tumoral, quando cultivadas na forma de tumoresferas;
- b) a inibição farmacológica ou por interferência de RNA de AURKA reduz a capacidade destas linhagens formarem tumoresferas, bem como reduz a capacidade de autorrenovação das tumoresferas formadas;
- c) a inibição farmacológica ou por interferência de RNA de AURKA reduz tanto a expressão de marcadores de célula tronco, quanto a clonogenicidade das células oriundas de tumoresferas;
- d) o marcador CD24 se mostrou promissor nas nossas linhagens com mutação em KRAS para isolar uma população enriquecida em CITs;
- e) a inibição das quinases Aurora afeta preferencialmente a capacidade de formação de tumoresferas das células positivas para CD24.

7. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, R.R.; CARMENA, M.; EARNSHAW, W.C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 11(2):49-54, 2001.
- ADJEI, A.A. K-ras as a target for lung cancer therapy. *J Thorac Oncol.* 3(6 Suppl 2):S160-3, 2008.
- AKUNURU, S.; ZHAI, J.Q.; ZHENG, Y. Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity. *Cell Death Dis.* 3:e352, 2012.
- AL-HAJJ, M.; WICHA, M.S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8, 2003.
- ALVES, S.; CASTRO, L.; FERNANDES, M.S.; FRANCISCO, R.; CASTRO, P.; PRIAULT, M.; CHAVES, S.R.; MOYER, M.P.; OLIVEIRA, C.; SERUCA, R.; CÔRTE-REAL, M.; SOUSA, M.J.; PRETO, A. Colorectal cancer-related mutant KRAS alleles function as positive regulators of autophagy. *Oncotarget.* 6(31):30787-802, 2015.
- AMSTERDAM, A.; RAANAN, C.; SCHREIBER, L.; POLIN, N.; GIVOL, D. LGR5 and Nanog identify stem cell signature of pancreas beta cells which initiate pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 433(2):157-62, 2013.
- AUST, D.E.; MUDERS, M.; KÖHLER, A.; SCHMIDT, M.; DIEBOLD, J.; MÜLLER, C.; LÖHRS, U.; WALDMAN, FM.; BARETTON, G.B. Prognostic relevance of 20q13 gains in sporadic colorectal cancers: a FISH analysis. *Scand J Gastroenterol.* 39(8):766-72, 2004.
- BAI, M.; NI, J.; SHEN, S.; WU, J.; HUANG, Q.; LE, Y.; YU, L. Two newly identified sites in the N-terminal regulatory domain of Aurora-A are essential for auto-inhibition. *Biotechnol Lett.* 36(8):1595-604, 2014.
- BALIC, A.; SØRENSEN, M.D.; TRABULO, S.M.; SAINZ, B.Jr.; CIOFFI, M.; VIEIRA, C.R.; MIRANDA-LORENZO, I.; HIDALGO, M.; KLEEFF, J.; ERKAN, M.; HEESCHEN, C. Chloroquine Targets Pancreatic Cancer Stem Cells via Inhibition of CXCR4 and Hedgehog Signaling. *Mol Cancer Ther* 13, 1758-1771, 2014.
- BARBACID, M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56:779-827, 1987.
- BARKER, N.; RIDGWAY, R.A.; van ES, J.H.; van de WETERING, M.; BEGTHEL, H.; van den BORN, M.; DANENBERG, E.; CLARKE, A.R.; SANSOM, O.J.; CLEVERS, H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 457(7229):608-11, 2009.
- BASSÈRES, D.S.; EBBS, A.; LEVANTINI, E.; BALDWIN, A.S. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 70(9):3537-46, 2010.
- BERGO, M.O.; AMBROZIAK, P.; GREGORY, C.; GEORGE, A.; OTTO, J.C.; KIM, E.; NAGASE, H.; CASEY, P.J.; BALMAIN, A.; YOUNG, S.G. Absence of the CAAX

- endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation. *Mol Cell Biol.* 22(1):171-81, 2002.
- BERNARDS, A.; SETTLEMAN, J. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 14(7):377-85, 2004.
- BISCHOFF, J.R.; ANDERSON, L.; ZHU, Y.; MOSSIE, K.; NG, L.; SOUZA, B.; SCHRYVER, B.; FLANAGAN, P.; CLAIRVOYANT, F.; GINTHER, C.; CHAN, C.S.; NOVOTNY, M.; SLAMON, D.J.; PLOWMAN, G.D. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17(11):3052-65, 1998.
- BOLAND, G.M.; PIHA-PAUL, S.A.; SUBBIAH, V.; ROUTBORT, M.; HERBRICH, S.M.; BAGGERLY, K.; PATEL, K.P.; BRUSCO, L.; HOROMBE, C.; NAING, A.; FU, S.; HONG, D.S.; JANKU, F.; JOHNSON, A.; BROADDUS, R.; LUTHRA, R.; SHAW, K.; MENDELSON, J.; MILLS, G.B.; MERIC-BERNSTAM, F. Clinical next generation sequencing to identify actionable aberrations in a phase I program. *Oncotarget.* 6(24):20099-110, 2015.
- BOLANOS-GARCIA, V.M. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(8):1572-7, 2005.
- BORIACK-SJODIN, P.A.; MARGARIT, S.M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature.* 394(6691):337-43, 1998.
- BOS, J.L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 129(5):865-77, 2007.
- BOSSÙ, P.; VANONI, M.; WANKE, V.; CESARONI, M.P.; TROPEA, F.; MELILLO, G.; ASTI, C.; PORZIO, S.; RUGGIERO, P.; DI CIOCCIO, V.; MAURIZI, G.; CIABINI, A.; ALBERGHINA, L. A dominant negative RAS-specific guanine nucleotide exchange factor reverses neoplastic phenotype in K-ras transformed mouse fibroblasts. *Oncogene.* 2000 Apr 20;19(17):2147-54.
- BOURAS, T.; PAL, B.; VAILLANT, F.; HARBURG, G.; ASSELIN-LABAT, M.L.; OAKES, S.R.; LINDEMAN, G.J.; VISVADER, J.E. Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell.* 3(4):429-41, 2008.
- BRADY, A.K.; MCNEILL, J.D.; JUDY, B.; BAUML, J.; EVANS, T.L.; COHEN, R.B.; LANGER, C.; VACHANI, A.; AGGARWAL, C. Survival outcome according to KRAS mutation status in newly diagnosed patients with stage IV non-small cell lung cancer treated with platinum doublet chemotherapy. *Oncotarget.* 6(30):30287-94, 2015.
- BRAUN, B.S.; TUVESON, D.A.; KONG, N.; LE, D.T.; KOGAN, S.C.; ROZMUS, J.; LE BEAU, M.M.; JACKS, T.E.; SHANNON, K.M. Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(2): 597-602, 2004.
- BREMBECK, F.H.; SCHREIBER, F.S.; DERAMAUDT, T.B.; CRAIG, L.; RHOADES, B.; SWAIN, G.; GRIPPO, P.; STOFFERS, D.A.; SILBERG, D.G.; RUSTGI, A.K. The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res.* 63(9):2005-9, 2003.

- BRIASSOULI, P.; CHAN, F.; SAVAGE, K.; REIS-FILHO, J.S.; LINARDOPOULOS, S. Aurora-A regulation of nuclear factor- κ B signaling by phosphorylation of I κ B α . *Cancer Res.* 67(4):1689-95, 2007.
- BURNETT, J.C.; ROSSI, J.J.; TIEMANN, K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol J.* 6(9):1130-46, 2011.
- CAMMARERI, P.; SCOPELLITI, A.; TODARO, M.; ETERNO, V.; FRANCESCANGELI, F.; MOYER, M.P.; AGRUSA, A.; DIELI, F.; ZEUNER, A.; STASSI, G. Aurora-a is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Cancer Res.* 70(11):4655-65, 2010.
- CAO, L.; ZHOU, Y.; ZHAI, B.; LIAO, J.; XU, W.; ZHANG, R.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, L.; QIAN, H.; WU, M.; YIN, Z. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol.* 11:71, 2011.
- CARRIÈRE, C.; YOUNG, A.L.; GUNN, J.R.; LONGNECKER, D.S.; KORC, M. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(3):561-5, 2009.
- CAULIN, C.; NGUYEN, T.; LONGLEY, M.A.; ZHOU, Z.; WANG, X.J.; ROOP, D.R. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res.* 64(15):5054-8, 2004.
- CHAN, C.S.; BOTSTEIN, D. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics.* 135(3):677-91, 1993.
- CHAN, I.T.; KUTOK, J.L.; WILLIAMS, I.R.; COHEN, S.; KELLY, L.; SHIGEMATSU, H.; JOHNSON, L.; AKASHI, K.; TUVESON, D.A.; JACKS, T.; GILLILAND, D.G. Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. *J Clin Invest.* 113(4):528-38, 2004.
- CHANG, E.H.; FURTH, M.E.; SCOLNICK, E.M.; LOWY, D.R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature.* 297(5866):479-83, 1982.
- CHEFETZ, I.; HOLMBERG, J.C.; ALVERO, A.B.; VISINTIN, I.; MOR, G. Inhibition of Aurora-A kinase induces cell cycle arrest in epithelial ovarian cancer stem cells by affecting NF κ B pathway. *Cell Cycle.* 10(13):2206-14, 2011.
- COFFIN, J.M.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.; ESSEX, M.; HARDY, W.D.Jr.; MARTIN, G.S.; ROSENBERG, N.E.; SCOLNICK, E.M.; WEINBERG, R.A.; VOGT, P.K. Proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes. *J Virol.* 40(3):953-7, 1981.
- COOPER, W.A.; LAM, D.C.; O'TOOLE, S.A.; MINNA, J.D. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 5 Suppl 5:S479-90, 2013.
- DAOUTI, S.; WANG, H.; LI, W.H.; HIGGINS, B.; KOLINSKY, K.; PACKMAN, K.; SPECIAN, A.Jr.; KONG, N.; HUBY, N.; WEN, Y.; XIANG, Q.; PODLASKI, F.J.; HE, Y.; FOTOUHI, N.; HEIMBROOK, D.; NIU, H. Characterization of a novel mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor with a unique mechanism of action for cancer therapy. *Cancer Res.* 69(5):1924-32, 2009.

- DER, C.J.; KRONTIRIS, T.G.; COOPER, G.M. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(11):3637-40, 1982.
- DI MARTILE M.; DESIDERI, M.; DE LUCA, T.; GABELLINI, C.; BUGLIONI, S.; ERAMO, A.; SETTE, G.; MILELLA, M.; ROTILI, D.; MAI, A.; CARRADORI, S.; SECCI, D.; DE MARIA, R.; DEL BUFALO, D.; TRISCIUOGLIO, D. Histone acetyltransferase inhibitor CPTH6 preferentially targets lung cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 7(10):11332-48, 2016.
- DONTU, G.; AL-HAJJ, M.; ABDALLAH, W.M.; CLARKE, M.F.; WICHA, M.S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 36 Suppl 1:59-72, 2003.
- DOS SANTOS, E.O.; CARNEIRO-LOBO, T.C.; AOKI, M.N.; LEVANTINI, E.; BASSÈRES, D.S. Aurora kinase targeting in lung cancer reduces KRAS-induced transformation. *Mol Cancer*. 15:12, 2016.
- DOS SANTOS, Edmilson Ozorio. Investigação das quinases Aurora A e Aurora B como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido pelo oncogene *KRAS*. 2013. 161p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- END, D.W.; SMETS, G.; TODD, A.V.; APPLGATE, T.L.; FUERY, C.J.; ANGIBAUD, P.; VENET, M.; SANZ, G.; POIGNET, H.; SKRZAT, S.; DEVINE, A.; WOUTERS, W.; BOWDEN, C. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 61(1):131-7, 2001.
- ENGELMAN, J.A.; CHEN, L.; TAN, X.; CROSBY, K.; GUIMARAES, A.R.; UPADHYAY, R.; MAIRA, M.; MCNAMARA, K.; PERERA, S.A.; SONG, Y.; CHIRIEAC, L.R.; KAUR, R.; LIGHTBOWN, A.; SIMENDINGER, J.; LI, T.; PADERA, R.F.; GARCÍA-ECHEVERRÍA, C.; WEISSLEDER, R.; MAHMOOD, U.; CANTLEY, L.C.; WONG, K.K. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med*. 14(12):1351-6, 2008.
- ERAMO, A.; LOTTI, F.; SETTE, G.; PILOZZI, E.; BIFFONI, M.; DI VIRGILIO, A.; CONTICELLO, C.; RUCO, L.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 15(3):504-14, 2008.
- FISHER, G.H.; WELLEN, S.L.; KLIMSTRA, D.; LENCZOWSKI, J.M.; TICHELAR, J.W.; LIZAK, M.J.; WHITSETT, J.A.; KORETSKY, A.; VARMUS, H.E. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev*. 15(24):3249-62, 2001.
- FLEMING, J.B.; SHEN, G.L.; HOLLOWAY, S.E.; DAVIS, M.; BREKKEN, R.A. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. *Mol Cancer Res*. 3(7):413-23, 2005.
- FOSTER, K.W.; LIU, Z.; NAIL, C.D.; LI, X.; FITZGERALD, T.J.; BAILEY, S.K.; FROST, A.R.; LOURO, I.D.; TOWNES, T.M.; PATERSON, A.J.; KUDLOW, J.E.; LOBO-RUPPERT, S.M.; RUPPERT, J.M. Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. *Oncogene*. 24(9):1491-500, 2005.

- FRIDAY, B.B.; ADJEI, A.A. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1756(2):127-44, 2005.
- GASSENMAIER, M.; CHEN, D.; BUCHNER, A.; HENKEL, L.; SCHIEMANN, M.; MACK, B.; SCHENDEL, D.J.; ZIMMERMANN, W.; POHLA, H. CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells*. 31(8):1467-76, 2013.
- GAVRIILIDIS, P.; GIAKOUSTIDIS, A.; GIAKOUSTIDIS, D. Aurora Kinases and Potential Medical Applications of Aurora Kinase Inhibitors: A Review. *J Clin Med Res*. 7(10):742-51, 2015.
- GHUWALEWALA, S.; GHATAK, D.; DAS, P.; DEY, S.; SARKAR, S.; ALAM, N.; PANDA, C.K.; ROYCHOUDHURY, S. CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res*. 16(2):405-17, 2016.
- GINESTIER, C.; HUR, M.H.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; MONVILLE, F.; DUTCHER, J.; BROWN, M.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; KLEER, C.G.; LIU, S.; SCHOTT, A.; HAYES, D.; BIRNBAUM, D.; WICHA, M.S.; DONTU, G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 1(5):555-67, 2007.
- GLOVER D M, LEIBOWITZ M.H.; MCLEAN, D.A.; PARRY, H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*. 81(1):95-105, 1995.
- GOKTAS, S.; YILDIRIM, M.; SUREN, D.; ALIKANOGU, A.S.; DILLI, U.D.; BULBULLER, N.; SEZER, C.; YILDIZ, M. Prognostic role of Aurora-A expression in metastatic colorectal cancer patients. *J BUON*. 19(3):686-91, 2014.
- GOLDSTEIN, A.S.; HUANG, J.; GUO, C.; GARRAWAY, I.P.; WITTE, O.N. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*. 329(5991):568-71, 2010.
- GORFE, A.A.; GRANT, B.J.; MCCAMMON, J.A. Mapping the nucleotide and isoform-dependent structural and dynamical features of Ras proteins. *Structure*. 16(6):885-96, 2008.
- GYSIN, S.; SALT, M.; YOUNG, A.; MCCORMICK, F. Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer*. 2(3):359-72, 2011.
- HALL, A.; MARSHALL, C.J.; SPURR, N.K.; WEISS, R.A. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*. 303(5916):396-400, 1983.
- HAMADA, M.; YAKUSHIJIN, Y.; OHTSUKA, M.; KAKIMOTO, M.; YASUKAWA, M.; FUJITA, S. Aurora2/BTAK/STK15 is involved in cell cycle checkpoint and cell survival of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 121(3):439-47, 2003.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70, 2000.
- HARVEY, J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*. 204:1104-5, 1964.
- HASHIDA, S.; YAMAMOTO, H.; SHIEN, K.; MIYOSHI, Y.; OHTSUKA, T.; SUZAWA, K.; WATANABE, M.; MAKI, Y.; SOH, J.; ASANO, H.; TSUKUDA, K.; MIYOSHI,

- S.; TOYOOKA, S. Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib. *Cancer Sci.* 106(10):1377-84, 2015.
- HEDDLESTON, J.M.; LI, Z.; LATHIA, J.D.; BAO, S.; HJELMELAND, A.B.; RICH, J.N. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer.* 102(5):789-95, 2010.
- HEIM, M.; SHARIFI, M.; HILGER, R.A.; SCHEULEN, M.E.; SEEGER, S.; STRUMBERG, D. Antitumor effect and potentiation or reduction in cytotoxic drug activity in human colon carcinoma cells by the Raf kinase inhibitor (RKI) BAY 43-9006. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41(12):616-7, 2003.
- HERMANN, P.C.; HUBER, S.L.; HERRLER, T.; AICHER, A.; ELLWART, J.W.; GUBA, M.; BRUNS, C.J.; HEESCHEN, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313-323, 2007.
- HIROTA, T.; KUNITOKU, N.; SASAYAMA, T.; MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; NITTA, M.; HATAKEYAMA, K.; SAYA, H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell.* 114(5):585-98, 2003.
- HOLLAND, E.C.; CELESTINO, J.; DAI, C.; SCHAEFER, L.; SAWAYA, R.E.; FULLER, G.N. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet.* 25(1):55-7, 2000.
- HOLT, S.V.; LOGIĆ, A.; ODEDRA, R.; HEIER, A.; HEATON, S.P.; ALFEREZ, D.; DAVIES, B.R.; WILKINSON, R.W.; SMITH, P.D. The MEK1/2 inhibitor, selumetinib (AZD6244; ARRY-142886), enhances anti-tumour efficacy when combined with conventional chemotherapeutic agents in human tumour xenograft models. *Br J Cancer.* 106(5):858-66, 2012.
- HUANG, L.R.; HSU, H.C. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res.* 55(20):4717-21, 1995.
- HURT, E.M.; KAWASAKI, B.T.; KLARMANN, G.J.; THOMAS, S.B.; FARRAR, W.L. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer.* 98(4):756-65, 2008.
- INAMURA, K.; SONG, M.; JUNG, S.; NISHIHARA, R.; YAMAUCHI, M.; LOCHHEAD, P.; QIAN, Z.R.; KIM, S.A.; MIMA, K.; SUKAWA, Y.; MASUDA, A.; IMAMURA, Y.; ZHANG, X.; POLLAK, M.N.; MANTZOROS, C.S.; HARRIS, C.C.; GIOVANNUCCI, E.; FUCHS, C.S.; CHO, E.; CHAN, A.T.; WU, K.; OGINO, S. Prediagnosis Plasma Adiponectin in Relation to Colorectal Cancer Risk According to KRAS Mutation Status. *J Natl Cancer Inst.* 108(4), 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inea_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014
- JACKSON, E.L.; WILLIS, N.; MERCER, K.; BRONSON, R.T.; CROWLEY, D.; MONTOYA, R.; JACKS, T.; TUVESON, D.A. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 15(24):3243-8, 2001.

- JACKSON, J.H, LI, J.W.; BUSS, J.E.; DER, C.J.; COCHRANE, C.G. Polylysine domain of K-ras 4B protein is crucial for malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(26):12730-4, 1994.
- JAISWAL, K.R, XIN, H.W.; ANDERSON, A.; WIEGAND, G.; KIM, B.; MILLER, T.; HARI, D.; RAY, S.; KOIZUMI, T.; RUDLOFF, U.; THORGEIRSSON, S.S.; AVITAL, I. Comparative Testing of Various Pancreatic Cancer Stem Cells Results in a Novel Class of Pancreatic-Cancer-Initiating Cells. *Stem Cell Res*. 9, 249–260, 2012.
- JIANG, F.; QIU, Q.; KHANNA, A.; TODD, N.W.; DEEPAK, J.; XING, L.; WANG, H.; LIU, Z.; SU, Y.; STASS, S.A.; KATZ, R.L. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 7(3):330-8, 2009.
- JIANG, R.; LI, Y.; ZHANG, A.; WANG, B.; XU, Y.; XU, W.; ZHAO, Y.; LUO, F.; LIU, Q. The acquisition of cancer stem cell-like properties and neoplastic transformation of human keratinocytes induced by arsenite involves epigenetic silencing of let-7c via Ras/NF- κ B. *Toxicol Lett*. 227(2):91-8, 2014
- JIMENO, A.; FELDMANN, G.; SUÁREZ-GAUTHIER, A.; RASHEED, Z.; SOLOMON, A.; ZOU, G.M.; RUBIO-VIQUEIR, A.B.; GARCÍA-GARCÍA, E.; LÓPEZ-RÍOS, F.; MATSUI, W.; MAITRA, A.; HIDALGO, M. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* 8, 310-314, 2009.
- JOKINEN, E.; LAURILA, N.; KOIVUNEN, P.; KOIVUNEN, J.P. Combining targeted drugs to overcome and prevent resistance of solid cancers with some stem-like cell features. *Oncotarget*. 5(19):9295-307, 2014.
- JORGE, R.; ZARICH, N.; OLIVA, J.L.; AZAÑEDO, M.; MARTÍNEZ, N.; DE LA CRUZ, X.; ROJAS, J.M. HSos1 contains a new amino-terminal regulatory motif with specific binding affinity for its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. 277(46):44171-9, 2002.
- JORGE, S.E.; KOBAYASHI, S.S.; COSTA, D.B. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. *Braz J Med Biol Res*. [Epub ahead of print] 2014.
- JUNG, C.W.; HAN, KH.; SEOL, H.; PARK, S.; KOH, J.S.; LEE, S.S.; KIM, M.J.; CHOI, I.J.; MYUNG, J.K. Expression of cancer stem cell markers and epithelial-mesenchymal transition-related factors in anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(1): 560–568, 2015.
- JUNTILA, M.R.; DEVASTHALI, V.; CHENG, J.H.; CASTILLO, J.; METCALFE, C.; CLERMONT, A.C.; OTTER, D.D.; CHAN, E.; BOU-RESLAN, H.; CAO, T.; FORREST, W.; NANNINI, M.A.; FRENCH, D.; CARANO, R.; MERCHANT, M.; HOEFLICH, K.P.; SINGH, M. Modeling targeted inhibition of MEK and PI3 kinase in human pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 14(1):40-7, 2015.
- JINUSHI, M.; CHIBA, S.; YOSHIYAMA, H.; MASUTOMI, K.; KINOSHITA, I.; DOSAKA-AKITA, H.; YAGITA, H.; TAKAOKA, A.; TAHARA, H. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(30):12425-30, 2011.

- KARIMI-BUSHERI, F.; RASOULI-NIA, A.; ZADOROZHNY, V.; FAKHRAI, H. CD24+/CD38- as new prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Multidiscip Respir Med.* 8(1):65, 2013.
- KATAYAMA, H.; OTA, T.; JISAKI, F.; UEDA, Y.; TANAKA, T.; ODASHIMA, S.; SUZUKI, F.; TERADA, Y.; TATSUKA, M. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst.* 91(13):1160-2, 1999.
- KE, J.; WU, X.; WU, X.; HE, X.; LIAN, L.; ZOU, Y.; HE, X.; WANG, H.; LUO, Y.; WANG, L.; LAN, P. A subpopulation of CD24⁺ cells in colon cancer cell lines possess stem cell characteristics. *Neoplasma.* 2012;59(3):282-8, 2012.
- KHAN, J.; EZAN, F.; CRÉMET, J.Y.; FAUTREL, A.; GILOT, D.; LAMBERT, M.; BENAUD, C.; TROADEC, M.B.; PRIGENT, C. Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation. *PLoS One.* 6(10):e26512, 2011.
- KHVALEVSKY, E.Z.; EZAN, F.; CRÉMET, J.Y.; FAUTREL, A.; GILOT, D.; LAMBERT, M.; BENAUD, C.; TROADEC, M.B.; PRIGENT, C. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(51):20723-8, 2013.
- KIM, C.F.; JACKSON, E.L.; WOOLFENDEN, A.E.; LAWRENCE, S.; BABAR, I.; VOGEL, S.; CROWLEY, D.; BRONSON, R.T.; JACKS, T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 121(6):823-35, 2005.
- KIM, J.; JUNG, J.; LEE, S.J.; LEE, J.S.; PARK, M.J. Cancer stem-like cells persist in established cell lines through autocrine activation of EGFR signaling. *Oncol Lett.* 3(3):607-612, 2012.
- KIM, R.J.; KIM, S.R.; ROH, K.J.; PARK, S.B.; PARK, J.R.; KANG, K.S.; KONG, G.; TANG, B.; YANG, Y.A.; KOHN, E.A.; WAKEFIELD, L.M.; NAM, J.S. Ras activation contributes to the maintenance and expansion of Sca-1pos cells in a mouse model of breast cancer. *Cancer Lett.* 287(2):172-81, 2010.
- KIM, Y.S.; Kang, M.J.; Cho, Y.M. Low production of reactive oxygen species and high DNA repair: mechanism of radioresistance of prostate cancer stem cells. *Anticancer Res.* 33(10):4469-74, 2013.
- KIRSTEN, W.H.; MAYER, L.A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst.* 39(2):311-35, 1967.
- KONDO, T.; SETOGUCHI, T.; TAGA, T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(3):781-6, 2004.
- KONG, D.; SETHI, S.; LI, Y.; CHEN, W.; SAKR, W.A.; HEATH, E.; SARKAR, F.H. Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *Prostate.* 75(2):161-74, 2015.
- KÖTTING, C.; KALLENBACH, A.; SUVEYZDIS, Y.; WITTINGHOFER, A.; GERWERT, K. The GAP arginine finger movement into the catalytic site of Ras increases the activation entropy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(17):6260-5, 2008.
- KOYA, R.C.; MOK, S.; OTTE, N.; BLACKETOR, K.J.; COMIN-ANDUIX, B.; TUMEH, P.C.; MINASYAN, A.; GRAHAM, N.A.; GRAEBER, T.G.; CHODON, T.; RIBAS, A.

BRAF inhibitor vemurafenib improves the antitumor activity of adoptive cell immunotherapy. *Cancer Res.* 72(16):3928-37, 2012.

- KRISTIANSEN, G.; PILARSKY, C.; PERVAN, J.; STÜRZEBECHER, B.; STEPHAN, C.; JUNG, K.; LOENING, S.; ROSENTHAL, A.; DIETEL, M. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate.* 58(2):183-92, 2004.
- LEE, E.C.; FROLOV, A.; LI, R.; AYALA, G.; GREENBERG, N.M. Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* 66(10):4996-5002, 2006.
- LEMJABBAR-ALAOUI, H.; HASSAN, O.U.; YANG, Y.W.; BUCHANAN, P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 1856(2):189-210, 2015.
- LEON, G.; MACDONAGH, L.; FINN, S.P.; CUFFE, S.; BARR, M.P. Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacol Ther.* 158:71-90, 2016.
- LEUNG, E.L.; LEUNG, E.L.; FISCUS, R.R.; TUNG, J.W.; TIN, V.P.; CHENG, L.C.; SIHOE, A.D.; FINK, L.M.; MA, Y.; WONG, M.P. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One.* 5(11):e14062, 2010.
- LI, C.; LEE C.J.; SIMEONE, D.M. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67(3):1030-7, 2007b.
- LI, C.; WU J.J.; HYNES, M.; DOSCH, J.; SARKAR, B.; WELLING, T.H.; PASCA di MAGLIANO, M.; SIMEONE, D.M. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology* 141, 2218–2227, e5, 2011.
- LI, F.; TIEDE, B.; MASSAGUÉ, J.; KANG, Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17(1):3–14, 2007a.
- LI, L.; NEAVES, W.B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res.* 66(9):4553-7, 2006.
- LI, W.; KONG, D.; AHMAD, A.; BAO, B.; SARKAR, F.H. Pancreatic cancer stem cells: Emerging target for designing novel therapy. *Cancer Letters* 338, 94–100, 2013.
- LIM, K.H.; BRADY, D.C.; KASHATUS, D.F.; ANCRILE, B.B.; DER, C.J.; COX, A.D.; COUNTER, C.M. Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. *Mol Cell Biol.* 2010 Jan;30(2):508-23.
- LIM, S.C. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother.* 59 Suppl 2:S351-4, 2005.
- LIN, G.; HU, R.; LAW, W.C.; CHEN, C.K.; WANG, Y.; LI CHIN, H.; NGUYEN, Q.T.; LAI, C.K.; YOON, H.S.; WANG, X.; XU, G.; YE, L.; CHENG, C.; YONG, K.T. Biodegradable nanocapsules as siRNA carriers for mutant K-Ras gene silencing of human pancreatic carcinoma cells. *Small.* 9(16):2757-63, 2013.
- LIN, X.; JUNG, J.; KANG, D.; XU, B.; ZARET, K.S.; ZOGHBI, H. Prenylcysteine carboxylmethyltransferase is essential for the earliest stages of liver development in mice. *Gastroenterology.* 123(1):345-51, 2002.
- LIOUTAS, A.; VERNOS, I. Aurora A kinase and its substrate TACC3 are required for central spindle assembly. *EMBO Rep.* 14(9):829-36, 2013.

- LIU, J.; e BROWN, R.E. Immunohistochemical detection of epithelialmesenchymal transition associated with stemness phenotype in anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 3(8):755-62, 2010.
- LIU, K.; LIN, B.; ZHAO, M.; YANG, X.; CHEN, M.; GAO, A.; LIU, F.; QUE, J.; LAN, X. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal.* 25(5):1264-71, 2013.
- LIU, M.; CASIMIRO, M.C.; WANG, C.; SHIRLEY, L.A.; JIAO, X.; KATYAR, S.; JU, X.; LI, Z.; YU, Z.; ZHOU, J.; JOHNSON, M.; FORTINA, P.; HYSLOP, T.; WINDLE, J.J.; PESTELL, R.G. p21CIP1 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 106(45):19035-9, 2009.
- LIU, M.; et al. Antitumor activity of SCH 66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice. *Cancer Res.* 58(21):4947-56, 1998.
- LIU, X.; WANG, L.; CUI, W.; YUAN, X.; LIN, L.; CAO, Q.; WANG, N.; LI, Y.; GUO, W.; ZHANG, X.; WU, C.; YANG, J. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget.* doi: 10.18632, 2016.
- LOBELL, R.B.; LIU, D.; BUSER, C.A.; DAVIDE, J.P.; DEPUY, E.; HAMILTON, K.; KOBLAN, K.S.; LEE, Y.; MOSSER, S.; MOTZEL, S.L.; ABBRUZZESE, J.L.; FUCHS, C.S.; ROWINSKY, E.K.; RUBIN, E.H.; SHARMA, S.; DEUTSCH, P.J.; MAZINA, K.E.; MORRISON, B.W.; WILDONGER, L.; YAO, S.L.; KOHL, N.E. Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778,123, a dual inhibitor of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase type-I. *Mol Cancer Ther.* 1(9):747-58, 2002.
- LOBELL, R.B.; OMER, C.A.; ABRAMS, M.T.; BHIMNATHWALA, H.G.; BRUCKER, M.J.; BUSER, C.A.; DAVIDE, J.P.; DESOLMS, S.J.; DINSMORE, C.J.; ELLIS-HUTCHINGS, M.S.; KRAL, A.M.; LIU, D.; LUMMA, W.C.; MACHOTKA, S.V.; RANDS, E.; WILLIAMS, T.M.; GRAHAM, S.L.; HARTMAN, G.D.; OLIFF, A.I.; HEIMBROOK, D.C.; KOHL, N.E. Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. *Cancer Res.* 61(24):8758-68, 2001.
- LOCKYER, P.J.; KUPZIG, S.; CULLEN, P.J. CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. *Curr Biol.* 11(12):981-6, 2001.
- LOWENSTEIN, E.J.; DALY, R.J.; BATZER, A.G.; LI, W.; MARGOLIS, B.; LAMMERS, R.; ULLRICH, A.; SKOLNIK, E.Y.; BAR-SAGI, D.; SCHLESSINGER, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell.* 70(3):431-42, 1992.
- MAIMAITI, Y.; JIE, T.; JING, Z.; CHANGWEN, W.; PAN, Y.; CHEN, C.; TAO, H. Aurora kinase A induces papillary thyroid cancer lymph node metastasis by promoting cofilin-1 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 473(1):212-8, 2016.
- MANI, S.A.; GUO, W.; LIAO, M.J.; EATON, E.N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A.Y.; BROOKS, M.; REINHARD, F.; ZHANG, C.C.; SHIPITSIN, M.; CAMPBELL, L.L.; POLYAK, K.; BRISKEN, C.; YANG, J.; WEINBERG, R.A. The epithelial-

- mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133(4):704-15, 2008.
- MANNINO, M.; GOMEZ-ROMAN, N.; HOCHEGGER, H.; CHALMERS, A.J. Differential sensitivity of Glioma stem cells to Aurora kinase A inhibitors: implications for stem cell mitosis and centrosome dynamics. *Stem Cell Res*. 13(1):135-43, 2014.
- MARTINS-NEVES, S.R.; CORVER, W.E.; PAIVA-OLIVEIRA, D.I.; van den AKKER, B.E.; BRIAIRE-DE-BRUIJN, I.H.; BOVÉE, J.V.; GOMES, C.M.; CLETON-JANSEN, A.M. Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ β -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4. *J Cell Physiol*. 231(4):876-86, 2016.
- MARUMOTO, T.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; KUNITOKU, N.; ZHANG, D.; ICHIKAWA, Y.; SASAYAMA, T.; KUNINAKA, S.; MIMORI, T.; TAMAKI, N.; KIMURA, M.; OKANO, Y.; SAYA, H. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*. 7(11):1173-82, 2002.
- MARUMOTO, T.; HONDA, S.; HARA, T.; NITTA, M.; HIROTA, T.; KOHMURA, E.; SAYA, H. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*. 278(51):51786-95, 2003.
- MAURER, T.; GARRENTON, L.S.; OH, A.; PITTS, K.; ANDERSON, D.J.; SKELTON, N.J.; FAUBER, B.P.; PAN, B.; MALEK, S.; STOKOE, D.; LUDLAM, M.J.; BOWMAN, K.K.; WU, J.; GIANNETTI, A.M.; STAROVASNIK, M.A.; MELLMAN, I.; JACKSON, P.K.; RUDOLPH, J.; WANG, W.; FANG, G. Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(14):5299-304, 2012.
- MCCORMICK, F. K-Ras protein as a drug target. *J Mol Med (Berl)*. 94(3):253-8, 2016.
- McCUBREY, J.A, et al. Advances in targeting signal transduction pathways. *Oncotarget*. 3(12):1505-21, 2012.
- MEDEMA, J.P.; VERMEULEN, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 474(7351):318-26, 2011.
- MENDIOLA, M.; BARRIUSO, J.; MARIÑO-ENRÍQUEZ, A.; REDONDO, A.; DOMÍNGUEZ-CÁCERES, A.; HERNÁNDEZ-CORTÉS, G.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, E.; SÁNCHEZ-NAVARRO, I.; VARA, J.A.; SUÁREZ, A.; ESPINOSA, E.; GONZÁLEZ-BARÓN, M.; PALACIOS, J.; HARDISSON, D. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol*. 40(5):631-8, 2009.
- MENG, E.; MITRA, A.; TRIPATHI, K.; FINAN, M.A.; SCALICI, J.; MCCLELLAN, S.; MADEIRA da SILVA, L.; REED, E.; SHEVDE, L.A.; PALLE, K.; ROCCONI, R.P. ALDH1A1 maintains ovarian cancer stem cell-like properties by altered regulation of cell cycle checkpoint and DNA repair network signaling. *PLoS One*. 9(9):e107142, 2014.
- MENG, X.; LI, M.; WANG, X.; WANG, Y.; MA, D. Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 100(6):1040-6, 2009.
- MERALDI, P.; HONDA, R.; NIGG, E.A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *EMBO J*. 21(4):483-92, 2002.

- MIAO, H.; GALE, N.W.; GUO, H.; QIAN, J.; PETTY, A.; KASPAR, J.; MURPHY, A.J.; VALENZUELA, D.M.; YANCOPOULOS, G.; HAMBARDZUMYAN, D.; LATHIA, J.D.; RICH, J.N.; LEE, J.; WANG, B. EphA2 Promotes Infiltrative Invasion of Glioma Stem Cells in vivo through Crosstalk with Akt and Regulates Stem Properties. *Oncogene*. 34(5): 558–567, 2015.
- MO, W.; ZHANG, J.T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol*. 3(1):1-27, 2012.
- MOORES, S.L.; SCHABER, M.D.; MOSSER, S.D.; RANDS, E.; O'HARA, M.B.; GARSKY, V.M.; MARSHALL, M.S.; POMPLIANO, D.L.; GIBBS, J.B. Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem*. 266(22):14603-10, 1991.
- NIKONOVA, A.S.; ASTSATUROV, I.; SEREBRIISKII, I.G.; DUNBRACK, R.L.Jr, GOLEMIS, E.A. Aurora-A kinase (AURKA) in normal and pathological cell growth. *Cell Mol Life Sci*. 70(4):661-87, 2013.
- OSTREM, J.M.; PETERS, U.; SOS, M.L.; WELLS, J.A.; SHOKAT, K.M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*. 503(7477):548-51, 2013.
- OTA, I.; MASUI, T.; KURIHARA, M.; YOOK, J.I.; MIKAMI, S.; KIMURA, T.; SHIMADA, K.; KONISHI, N.; YANE, K.; YAMANAKA, T.; KITAHARA, T. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. *Oncol Rep*. 35(1):261-6, 2016.
- PANDYA, A.Y.; TALLEY, L.I.; FROST, A.R.; FITZGERALD, T.J.; TRIVEDI, V.; CHAKRAVARTHY, M.; CHHIENG, D.C.; GRIZZLE, W.E.; ENGLER, J.A.; KRONTIRAS, H.; BLAND, K.I.; LOBUGLIO, A.F.; LOBO-RUPPERT, S.M.; RUPPERT, J.M. Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 10(8):2709-19, 2004.
- PASHAI, N.; HAO, H.; ALL, A.; GUPTA, S.; CHAERKADY, R.; de LOS ANGELES, A.; GEARHART, J.D.; KERR, C.L. Genome-wide profiling of pluripotent cells reveals a unique molecular signature of human embryonic germ cells. *PLoS One*. 7(6):e39088, 2012.
- PERUMAL, D.; SINGH, S.; YODER, S.J.; BLOOM, G.C.; CHELLAPPAN, S.P. A novel five gene signature derived from stem-like side population cells predicts overall and recurrence-free survival in NSCLC. *PLoS One*. 2012;7(8):e43589, 2012.
- PIERRE, S.; BATS, A.S.; COUMOUL, X. Understanding SOS (Son of Sevenless). *Biochem Pharmacol*. 82(9):1049-56, 2011.
- PRIOR, I.A.; HANCOCK, J.F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol*. 23(2):145-53, 2012.
- PRIOR, I.A.; LEWIS, P.D.; MATTOS, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 72(10):2457-67, 2012.
- QUINLAN, M.P.; SETTLEMAN, J. Explaining the preponderance of Kras mutations in human cancer: An isoform-specific function in stem cell expansion. *Cell Cycle*. 7(10):1332-5, 2008.
- RAIMONDI, A.R.; VITALE-CROSS, L.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; GUTKIND, J.S.; MOLINOLO, A. Rapid development of salivary gland carcinomas upon conditional

- expression of K-ras driven by the cytokeratin 5 promoter. *Am J Pathol.* 168(5):1654-65, 2006.
- REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(1):105-11, 2001.
- ROMAIN, C.; PAUL, P.; KIM, K.W.; LEE, S.; QIAO, J.; CHUNG, D.H. Targeting Aurora kinase-A downregulates cell proliferation and angiogenesis in neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 49(1):159-65, 2014.
- ROSE, W.C.; LEE, F.Y.; FAIRCHILD, C.R.; LYNCH, M.; MONTICELLO, T.; KRAMER, R.A.; MANNE, V. Preclinical antitumor activity of BMS-214662, a highly apoptotic and novel farnesyltransferase inhibitor. *Cancer Res.* 61(20):7507-17, 2001.
- ROUDI, R.; KOROURIAN, A.; SHARIFTABRIZI, A.; MADJD, Z. Differential Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1 and CD133 in Various Lung Cancer Subtypes. *Cancer Invest.* 2015;33(7):294-302, 2015.
- SAGIV, E.; KAZANOV, D.; ARBER, N. CD24 plays an important role in the carcinogenesis process of the pancreas. *Biomed Pharmacother.* 60(6):280-4, 2006.
- SAKAKURA, C.; HAGIWARA, A.; YASUOKA, R.; FUJITA, Y.; NAKANISHI, M.; MASUDA, K.; SHIMOMURA, K.; NAKAMURA, Y.; INAZAWA, J.; ABE, T.; YAMAGISHI, H. Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br J Cancer.* 84(6):824-31, 2001.
- SALERNO, M.; AVNET, S.; BONUCCELLI, G.; ERAMO, A.; de MARIA, R.; GAMBAROTTI, M.; GAMBERI, G.; BALDINI, N. Sphere-forming cell subsets with cancer stem cell properties in human musculoskeletal sarcomas. *Int J Oncol.* 43(1):95-102, 2013.
- SALERNO, M.; AVNET, S.; BONUCCELLI, G.; HOSOGI, S.; GRANCHI, D.; BALDINI, N. Impairment of lysosomal activity as a therapeutic modality targeting cancer stem cells of embryonal rhabdomyosarcoma cell line RD. *PLoS One.* 9(10):e110340, 2014.
- SANO, A.; KATO, H.; SAKURAI, S.; SAKAI, M.; TANAKA, N.; INOSE, T.; SAITO, K.; SOHDA, M.; NAKAJIMA, M.; NAKAJIMA, T.; KUWANO, H. CD24 expression is a novel prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 16(2):506-14, 2009.
- SATO, F.; KUBOTA, Y.; NATSUIZAKA, M.; MAEHARA, O.; HATANAKA, Y.; MARUKAWA, K.; TERASHITA, K.; SUDA, G.; OHNISHI, S.; SHIMIZU, Y.; KOMATSU, Y.; OHASHI, S.; KAGAWA, S.; KINUGAS, H.; WHELAN, K.A.; NAKAGAWA, H.; SAKAMOTO, N. EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 16(6):933-40, 2015.
- SCHABATH, H.; RUNZ, S.; JOUMAA, S.; ALTEVOGT, P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci.* 119(Pt 2):314-25, 2006.
- SEN, S.; ZHOU, H.; ZHANG, R.D.; YOON, D.S.; VAKAR-LOPEZ, F.; ITO, S.; JIANG, F.; JOHNSTON, D.; GROSSMAN, H.B.; RUIFROK, A.C.; KATZ, R.L.; BRINKLEY, W.; CZERNIAK, B. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 94(17):1320-9, 2002.

- SERRANO, D.; BLEAU, A.M.; FERNANDEZ-GARCIA, I.; FERNANDEZ-MARCELO, T.; INIESTA, P.; ORTIZ-DE-SOLORZANO, C.; CALVO, A. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer*. 10:96, 2011.
- SESHACHARYULU, P.; PONNUSAMY, M.P.; HARIDAS, D.; JAIN, M.; GANTI, A.K.; BATRA, S.K. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 16(1):15-31, 2012.
- SHERIDAN, C.; KISHIMOTO, H.; FUCHS, R.K.; MEHROTRA, S.; BHAT-NAKSHATRI, P.; TURNER, C.H.; GOULET, R.Jr.; BADVE, S.; NAKSHATRI, H. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 8(5):R59, 2006.
- SMITH, S.L.; BOWERS, N.L.; BETTICHER, D.C.; GAUTSCHI, O.; RATSCHILLER, D.; HOBAN, P.R.; BOOTON, R.; SANTIBÁÑEZ-KOREF, M.F.; HEIGHWAY, J. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *Br J Cancer*. 93(6):719-29, 2005.
- SOEDA, A.; INAGAKI, A.; OKA, N.; Ikegame, Y.; AOKI, H.; YOSHIMURA, S.; NAKASHIMA, S.; KUNISADA, T.; IWAMA, T. Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem*. 283(16):10958-66, 2008.
- SUKOWATI, C.H.; ANFUSO, B.; PASCUT, D.; TIRIBELLI, C. Multidrug resistance in hepatic cancer stem cells: the emerging role of miRNAs. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 9(6):723-5, 2015.
- SULLIVAN, J.P.; SPINOLA, M.; DODGE, M.; RASO, M.G.; BEHRENS, C.; GAO, B.; SCHUSTER, K.; SHAO, C.; LARSEN, J.E.; SULLIVAN, L.A.; HONORIO, S.; XIE, Y.; SCAGLIONI, P.P.; DIMAIO, J.M.; GAZDAR, A.F.; SHAY, J.W.; WISTUBA, I.I.; MINNA, J.D. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Res*. 70(23):9937-48, 2010.
- SUN, Q.; BURKE, J.P.; PHAN, J.; BURNS, M.C.; OLEJNICZAK, E.T.; WATERSON, A.G.; LEE, T.; ROSSANESE, O.W.; FESIK, S.W. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. [Angew Chem Int Ed Engl](#). 51(25):6140-3, 2012.
- SUNG, W.J.; PARK, K.S.; KWAK, S.G.; HYUN, D.S.; JANG, J.S.; PARK, K.K. Epithelial-mesenchymal transition in patients of pulmonary adenocarcinoma: correlation with cancer stem cell markers and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(8):8997-9009, 2015.
- TAN, Y.K.; WEE, T.C.; KOH, W.P.; WANG, Y.T.; ENG, P.; TAN, W.C.; SEOW, A. Survival among Chinese women with lung cancer in Singapore: a comparison by stage, histology and smoking status. *Lung Cancer*. 40(3):237-46, 2003.
- TANG, B.; LIANG, X.; TANG, F.; ZHANG, J.; ZENG, S.; JIN, S.; ZHOU, L.; KUDO, Y.; QI, G. Expression of USP22 and Survivin is an indicator of malignant behavior in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 47(6):2208-16, 2015.
- TANG, D.G. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res*. 22(3):457-72, 2012.

- TERADA, Y.; UETAKE, Y.; KURIYAMA, R. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *J Cell Biol.* 162(5):757-63, 2003.
- TORRES-DURÁN, M.; RUANO-RAVINA, A.; PARENTE-LAMELAS, I.; LEIRO-FERNÁNDEZ, V.; ABAL-ARCA, J.; MONTERO-MARTÍNEZ, C.; PENA-ÁLVAREZ, C.; CASTRO-AÑÓN, O.; GOLPE-GÓMEZ, A.; MARTÍNEZ, C.; GUZMÁN-TAVERAS, R.; MEJUTO-MARTÍ, M.J.; PROVENCIO, M.; FERNÁNDEZ-VILLAR, A.; BARROS-DIOS, J.M. Residential radon and lung cancer characteristics in never smokers. *Int J Radiat Biol.* 91(8):605-10, 2015.
- TUVESON D A, SHAW AT, WILLIS NA, SILVER DP, JACKSON EL, CHANG S, MERCER KL, GROCHOW R, HOCK H, CROWLEY D, HINGORANI SR, ZAKS T, KING C, JACOBETZ MA, WANG, L.; BRONSON, R.T.; ORKIN, S.H.; DEPINHO, R.A.; JACKS, T. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell.* 5(4):375-87, 2004.
- UNNI, A.M.; LOCKWOOD, W.W.; ZEJNULLAHU, K.; LEE-LIN, S.Q.; VARMUS, H. Evidence that synthetic lethality underlies the mutual exclusivity of oncogenic KRAS and EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Elife.* 4:e06907, 2015.
- VALENTINO, J.D.; ELLIOTT, V.A.; ZAYTSEVA, Y.Y.; RYCHAHOU, P.G.; MUSTAIN, W.C.; WANG, C.; GAO, T.; EVERS, B.M. Novel small interfering RNA cotargeting strategy as treatment for colorectal cancer. *Surgery.* 152(2):277-85, 2012.
- VISVADER, J.E. Cells of origin in cancer. *Nature.* 469(7330):314-22, 2011.
- VISVADER, J.E.; LINDEMAN, G.J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell.* 10(6):717-28, 2012.
- VITALE-CROSS, L.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; FISHER, G.; MOLINOLO, A.A.; GUTKIND, J.S. Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis. *Cancer Res.* 64(24):8804-7, 2004.
- WALTER, D.; LIER, A.; GEISELHART, A.; THALHEIMER, F.B.; HUNTSCHA, S.; SOBOTTA, M.C.; MOEHRLE, B.; BROCKS, D.; BAYINDIR, I.; KASCHUTNI, P.; MUEDDER, K.; KLEIN, C.; JAUCH, A.; SCHROEDER, T.; GEIGER, H.; DICK, T.P.; HOLLAND-LETZ, T.; SCHMEZER, P.; LANE, S.W.; RIEGER, M.A.; ESSERS, M.A.; WILLIAMS, D.A.; TRUMPP, A.; MILSOM, M.D. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature.* 520(7548):549-52, 2015b.
- WALTER, F.M.; RUBIN, G.; BANKHEAD, C.; MORRIS, H.C.; HALL, N.; MILLS, K.; DOBSON, C.; RINTOUL, R.C.; HAMILTON, W.; EMERY, J. Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer.* 112 Suppl 1:S6-13, 2015a.
- WANG, X.; ZHENG, Y.; FAN, Q.; ZHANG, X. Effect of blocking Ras signaling pathway with K-Ras siRNA on apoptosis in esophageal squamous carcinoma cells. *J Tradit Chin Med.* 33(3):361-6, 2013b.
- WANG, X.; ZHENG, Y.; FAN, Q.; ZHANG, X.; SHI, Y. siRNA blocking the RAS signalling pathway and inhibits the growth of oesophageal squamous cell carcinoma in nude mice. *Cell Biochem Funct.* 32(8):625-9, 2014.

- WANG, X.; ZHOU, Y.X.; QIAO, W.; TOMINAGA, Y.; OUCHI, M.; OUCHI, T.; DENG, C.X. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene*. 25(54):7148-58, 2006.
- WANG, Y.; KAISER, C.E.; FRETT, B.; LI, H.Y. Targeting mutant KRAS for anticancer therapeutics: a review of novel small molecule modulators. *J Med Chem*. 56(13):5219-30, 2013a.
- WHYTE, D.B.; KIRSCHMEIER, P.; HOCKENBERRY, T.N.; NUNEZ-OLIVA, I.; JAMES, L.; CATINO, J.J.; BISHOP, W.R.; PAI, J.K. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem*. 272(22):14459-64, 1997.
- WITKIEWICZ, A.K.; MCMILLAN, E.A.; BALAJI, U.; BAEK, G.; LIN, W.C.; MANSOUR, J.; MOLLAE, M.; WAGNER, K.U.; KODURU, P.; YOPP, A.; CHOTI, M.A.; YEO, C.J.; MCCUE, P.; WHITE, M.A.; KNUDSEN, E.S. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun*. 6:6744, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer - Cancer Country Profiles, Brazil, 2014. Disponível em: http://www.who.int/cancer/country-profiles/bra_en.pdf?ua=1 (b)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report 2014
- WU, G.; SCHÖLER, H.R. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen (Lond)*. 3(1):7, 2014.
- WU, J.C.; CHEN, T.Y.; YU, C.T.; TSAI, S.J.; HSU, J.M.; TANG, M.J.; CHOU, C.K.; LIN, W.J.; YUAN, C.J.; HUANG, C.Y. Identification of V23RafA-Ser194 as a critical mediator for Aurora-A-induced cellular motility and transformation by small pool expression screening. *J Biol Chem*. 280(10):9013-22, 2005.
- XIA, Z.; WEI, P.; ZHANG, H.; DING, Z.; YANG, L.; HUANG, Z.; ZHANG, N. AURKA governs self-renewal capacity in glioma-initiating cells via stabilization/activation of β -catenin/Wnt signaling. *Mol Cancer Res*. 11(9):1101-11, 2013.
- XU, H.; MU, J.; XIAO, J.; WU, X.; LI, M.; LIU, T.; LIU, X. CD24 negative lung cancer cells, possessing partial cancer stem cell properties, cannot be considered as cancer stem cells. *Am J Cancer Res*. 6(1):51-60, 2015.
- XU, J.; YUE, C.F.; ZHOU, W.H.; QIAN, Y.M.; ZHANG, Y.; WANG, S.W.; LIU, A.W.; LIU, Q. Aurora-A contributes to cisplatin resistance and lymphatic metastasis in non-small cell lung cancer and predicts poor prognosis. *J Transl Med*. 12:200, 2014.
- YAMAZAKI, H.; NAITO, M.; GHANI, F.I.; DANG, N.H.; IWATA, S.; MORIMOTO, C. Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 419(3):529-36, 2012.
- YANG, C.H.; WANG, H.L.; LIN, Y.S.; KUMAR, K.P.; LIN, H.C.; CHANG, C.J.; LU, C.C.; HUANG, T.T.; MARTEL, J.; OJCIUS, D.M.; CHANG, Y.S.; YOUNG, J.D.; LAI, H.C. Identification of CD24 as a cancer stem cell marker in human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*. 9(6):e99412, 2014.

- YANG, Y.; Xu, H.; HUANG, W.; DING, M.; XIAO, J.; YANG, D.; LI, H.; LIU, X.Y.; CHU, L. Targeting lung cancer stem-like cells with TRAIL gene armed oncolytic adenovirus. *J Cell Mol Med*. 19(5):915-23, 2015.
- YASUMOTO, Y.; MIYAZAKI, H.; VAIDYAN, L.K. KAGAWA, Y.; EBRAHIMI, M.; YAMAMOTO, Y.; OGATA, M.; KATSUYAMA, Y.; SADAHIRO, H.; SUZUKI, M.; OWADA, Y. Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS One*. 11(1): e0147717, 2016.
- YEUNG, T.M.; GANDHI, S.C.; WILDING, J.L.; MUSCHEL, R.; BODMER, W.F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(8):3722-7, 2010.
- YIN, F.; YANG, C.; WANG, Q.; ZENG, S.; HU, R.; LIN, G.; TIAN, J.; HU, S.; LAN, R.F.; YOON, H.S.; LU, F.; WANG, K.; YONG, K.T. A Light-Driven Therapy of Pancreatic Adenocarcinoma Using Gold Nanorods-Based Nanocarriers for Co-Delivery of Doxorubicin and siRNA. *Theranostics*. 5(8):818-33, 2015.
- YOUSEF, A.I.; El-MASRY, O.S.; ABDEL MOHSEN, M.A. Impact of Cellular Genetic Make-up on Colorectal Cancer Cell Lines Response to Ellagic Acid: Implications of Small Interfering RNA. *Asian Pac J Cancer Prev*. 17(2):743-8, 2016.
- YU, F.; LI, J.; CHEN, H.; FU, J.; RAY, S.; HUANG, S.; ZHENG, H.; AI, W. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*. 30(18):2161-72, 2011.
- YUAN, T.L.; FELLMANN, C.; LEE, C.S.; RITCHIE, C.D.; THAPAR, V.; LEE, L.C.; HSU, D.J.; GRACE, D.; CARVER, J.O.; ZUBER, J.; LUO, J.; MCCORMICK, F.; LOWE, S.W. Development of siRNA payloads to target KRAS-mutant cancer. *Cancer Discov*. 4(10):1182-97, 2014.
- ZENG, B.; LEI, Y.; ZHU, H.; LUO, S.; ZHUANG, M.; SU, C.; ZOU, J.; YANG, L.; LUO, H. Aurora-A is a novel predictor of poor prognosis in patients with resected lung adenocarcinoma. *Chin J Cancer Res*. 26(2):166-73, 2014.
- ZENG, L.; LI, J.; LI, J.; ZHANG, Q.; QIAN, C.; WU, W.; LIN, Z.; LIANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, K. Effective suppression of the Kirsten rat sarcoma viral oncogene in pancreatic tumor cells via targeted small interfering RNA delivery using nanoparticles. *Pancreas*. 44(2):250-9, 2015.
- ZHANG, D.; HIROTA, T.; MARUMOTO, T.; SHIMIZU, M.; KUNITOKU, N.; SASAYAMA, T.; ARIMA, Y.; FENG, L.; SUZUKI, M.; TAKEYA, M.; SAYA, H. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene*. 23(54):8720-30, 2004.
- ZHANG, F.; CHEONG, J.K. The renewed battle against RAS-mutant cancers. *Cell Mol Life Sci*. 73(9):1845-58, 2016.
- ZHENG, F.M.; LONG, Z.J.; HOU, Z.J.; LUO, Y.; XU, L.Z.; XIA, J.L.; LAI, X.J.; LIU, J.W.; WANG, X.; KAMRAN, M.; YAN, M.; SHAO, S.J.; LAM, E.W.; WANG, S.W.; LU, G.; LIU, Q. A novel small molecule aurora kinase inhibitor attenuates breast tumor-initiating cells and overcomes drug resistance. *Mol Cancer Ther.*, 13(8):1991-2003, 2014.

- ZHENG, F.; YUE, C.; LI, G.; HE, B.; CHENG, W.; WANG, X.; YAN, M.; LONG, Z.; QIU, W.; YUAN, Z.; XU, J.; LIU, B.; SHI, Q.; LAM, E.W.; HUNG, M.C.; LIU, Q. Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype. *Nat Commun.* 7:10180, 2016.
- ZHENG, Y.; DE LA CRUZ, C.C.; SAYLES, L.C.; ALLEYNE-CHIN, C.; VAKA, D.; KNAACK, T.D.; BIGOS, M.; XU, Y.; HOANG, C.D.; SHRAGER, J.B.; FEHLING, H.J.; FRENCH, D.; FORREST, W.; JIANG, Z.; CARANO, R.A.; BARCK, K.H.; JACKSON, E.L.; SWEET-CORDERO, E.A. A rare population of CD24(+)ITGB4(+)Notch(hi) cells drives tumor propagation in NSCLC and requires Notch3 for self-renewal. *Cancer Cell.* 24(1):59-74, 2013.
- ZHOU, H.; KUANG, J.; ZHONG, L.; KUO, W.L.; GRAY, J.W.; SAHIN, A.; BRINKLEY, B.R.; SEN, S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* 20(2):189-93, 1998.
- ZHOU, S.; SCHUETZ, J.D.; BUNTING, K.D.; COLAPIETRO, A.M.; SAMPATH, J.; MORRIS, J.J.; LAGUTINA, I.; GROSVELD, G.C.; OSAWA, M.; NAKAUCHI, H.; SORRENTINO, B.P. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 7(9):1028-34, 2001.
- ZHU, L.; GIBSON, P.; CURRLE, D.S.; TONG, Y.; RICHARDSON, R.J.; BAYAZITOV, I.T.; POPPLETON, H.; ZAKHARENKO, S.; ELLISON, D.W.; GILBERTSON, R.J. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature.* 457(7229):603-7, 2009.

SÚMULA CURRICULAR

1 - Dados pessoais:

Nome: Luiza Coimbra Scalabrini

Local de data de nascimento: Belo Horizonte, 12/09/1988

2 - Educação:

1. Instituto Sagrada Família, ISFUC, Brasil, 2006.
Ensino Médio
2. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG, 2014.
Bacharel em Bioquímica
 - a. University of West Florida, Pensacola, EUA, 2012.
BSc Chemistry – 6 meses, Bolsista UFV
3. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, 2016 (em andamento).
Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

3 – Publicações:

3.1) Manuscritos em preparação:

Scalabrini L.C., Carneiro-Lobo T.C., Hasenkamp L. A., Bassères D.S. Targeting Aurora kinase activity in lung cancer cells driven by oncogenic KRAS impairs lung cancer initiating cell function.

3.2) Resumos publicados em anais de eventos:

SCALABRINI, L. C. CARNEIRO-LOBO, T. C., HASENKAMP, L. A., BASSERES, D. S. Targeting Aurora A kinase activity in lung cancer cells driven by oncogenic KRAS impairs

lung cancer initiating cell function. In: XVIII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. In: SBBC, 2016, SÃO PAULO. **XVIII SBBC Congress Abstracts**, 2016. p.30 – 30.

SCALABRINI, L. C., CARNEIRO-LOBO, T. C., BASSÈRES, D. S. Targeting Aurora kinase activity in lung cancer cells driven by oncogenic KRAS impairs lung cancerinitiating cell function. In: 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)/ 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 2015, Foz do Iguaçu, Brasil. **SBBq/IUBMB 2015 Abstracts**, 2015. p.B128 - B128

CARNEIRO-LOBO, T. C., **SCALABRINI, L. C., BALDWIN, A. S., BASSÈRES, D. S.** Targeting lung cancer initiating cells driven by oncogenic KRAS mutations In: EMBO/EMBL Symposium: Frontiers in Stem Cells & Cancer, 2015, Heidelberg, Alemanha. **Frontiers in Stem Cells & Cancer**, 2015. p.113 – 113

4. Prêmios:

2016 – Melhor Pôster na Categoria Mestrado, Brazilian Society for Cell Biology.

5. Participação em eventos científicos:

1. XVIII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC). 2016.
2. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)/ 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). 2015.
3. IV Semana Acadêmica de Bioquímica da UFV. 2013.
4. 8º Encontro em Genética e Melhoramento e 3º Simpósio Internacional em Genética e Melhoramento. 2011.
5. 8º Encontro em Genética e Melhoramento e 3º Simpósio Internacional em Genética e Melhoramento. 2011.

6. 7º Encontro em Genética e Melhoramento e 2º Simpósio Internacional em Genética e Melhoramento. 2010.
7. II Semana Acadêmica de Bioquímica da UFV. 2010.

6 – Outras atividades:

1. Bolsista Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2015.
2. I Ciclo de Palestras de Empreendedorismo Tecnológico. 2011.
3. I Curso de Introdução de Bioquímica Médica e Bases Moleculares de Algumas Doenças. 2011.
4. Produção e Caracterização de Enzimas de Interesse Biotecnológico. 2011.
5. Inovar II Seminário sobre Empreendedorismo, Inovação e Desenvolvimento. 2011.
6. Curso de Noções básicas de técnicas em biologia molecular. 2010.

5. Ocupação:

Bolsista de Mestrado, CAPES, Set/2014 a Out/2016.