

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

EDMILSON OZORIO DOS SANTOS

Investigação das quinases Aurora A e Aurora B
como potenciais alvos terapêuticos no câncer de
pulmão induzido pelo oncogene *KRAS*

Versão original da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

19/09/2013

EDMILSON OZORIO DOS SANTOS

**Investigação das quinases Aurora A e Aurora B
como potenciais alvos terapêuticos no câncer de
pulmão induzido pelo oncogene *KRAS***

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

**Orientador:
Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères**

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

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

Santos, Edmilson Ozorio dos
S237i Investigação das quinases Aurora A e Aurora B como potenciais
alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido pelo oncogene
KRAS / Edmilson Ozorio dos Santos. -- São Paulo, 2013.
161p.

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

Edmilson Ozorio dos Santos

Investigação das quinases Aurora A e B como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido pelo oncogene *KRAS*

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Ao meu grande Mestre,
companheiro e sempre melhor amigo,
Deus.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, sem O qual nada em minha vida teria sentido. Por tantos momentos em que, quando tudo parecia estar perdido, Ele foi o único a estar ao meu lado e jamais me desamparar. Por ter sido Ele o meu refúgio e minha esperança em todos os momentos de angústia. Minha fonte de felicidade e paz em todos os momentos de vitória. Por todas as maravilhas alcançadas todos os dias em minha vida, e por sempre me conceder a oportunidade de aumentar a minha fé.

À Professora Dra. *Daniela Sanchez Bassères*, por ter me recebido e me acolhido tão bem em seu laboratório, por todo apoio e confiança mútua depositados ao longo desses dois anos e meio de trabalho conjunto, por todo o seu conhecimento, dedicação e incentivo incondicional para que este trabalho pudesse ser concluído, e pela honra e privilégio de ter sido seu primeiro aluno a defender sua dissertação de Mestrado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

À *Amanda (Djula)*, por ter sido, dentre todos no laboratório, quem mais me apoiou e deu forças para que eu continuasse meu trabalho e não desistisse em tantos momentos difíceis. Por todo o seu carinho e palavras de apoio e incentivo quando eu mais precisei. Pelas nossas voltas pra casa, sempre cheias de muita conversa. Por saber como ninguém alegrar o meu dia apenas com a sua presença contagiante. Pelo “*menino Ozorio*”, pelos ensinamentos de *Amelie Poulain*, pelas suas brigas, conselhos e pela amizade que construímos nesses dois anos em que nos conhecemos.

À *Aline (Lili)*, pelos inúmeros momentos de desabafo mútuo e amizade. Pelas nossas angústias compartilhadas e por todo o auxílio e brincadeiras em tantos momentos neste

laboratório, pelas nossas promessas de passeios que nunca se realizaram. Pelos doces do grêmio e saudosos bolos da Dona Roseli, além de tantos conselhos que me renderam momentos sem igual, sobretudo nestes últimos dias.

Ao *Mateus*, antigo membro do nosso grupo, pelas mentiras contadas, pelas brincadeiras, pelo apoio, auxílio e colaborações em inúmeros experimentos que foram apresentados ao longo deste trabalho, e por ter sido quem mais me ajudou, juntamente com a professora Daniela, nos primeiros momentos após minha chegada a este laboratório.

À *Viviane (Vivi)*, técnica do laboratório, e dona dos melhores conselhos, por ter me socorrido em tantos momentos de dificuldade e inexperiência no laboratório, e, acima de tudo, por sua ajuda em diversas ocasiões e por todas suas palavras de carinho que, apesar do pouco contato que passamos juntos, certamente ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

À *Thalita (Tag)*, com quem tantas vezes eu desabafei sobre minha vida, e quem sempre, com muito carinho e doçura, soube me confortar quando eu precisei. E por saber que ela vai cuidar de graça dos meus gatinhos, quando eu tiver alguns depois que ela se formar.

Ao *Fernando* e à *Renata*, meus alunos de iniciação científica, com os quais tive o privilégio de trabalhar nestes últimos meses e a quem pude ensinar um pouco do eu tenho aprendido ao longo desses anos no laboratório da professora Daniela. E também por termos, apesar do pouco tempo de trabalho juntos, já conseguido alguns resultados promissores para o Doutorado.

À *Karine*, por ter sido a melhor companheira de quarto dos últimos tempos. Pelas brincadeiras e peripécias em Foz do Iguaçu. Pela amizade e ajuda com muitos experimentos. E principalmente por todas as vezes em que eu chegava cedo ao laboratório e ela era a minha única companhia durante o nosso café da manhã.

À *Lilian*, por quem, apesar do pouco tempo que nos conhecemos, criei uma simpatia e carinho muito grandes. E por nossas aulas de dança, que, embora ainda estejam apenas começando, me trouxeram muitas alegrias.

Aos demais membros do laboratório do Professor Dr. *Fábio Luís Forti*, inclusive. Dentre eles, *Gabriela, Felipe, Renan, Alex, Juliana, Thompson e Gisele*, pelo auxílio e colaboração em vários momentos para a realização de tantos experimentos que aqui puderam ser apresentados.

À Professora Dra. *Mari Cleide Sogayar*, que gentilmente cedeu seu laboratório e materiais para a realização dos experimentos iniciais deste trabalho, momento no qual o Mateus muito me ajudou para a sua realização. E também às suas técnicas de laboratório, *Zizi, Sandra e Débora*, pelas tardes de café na copinha, e por todo o auxílio em todas as inúmeras vezes que precisei.

À Professora Dra. *Deborah Schechtman*, com a qual já estabelecemos colaborações para importantes ensaios futuros, que serão apresentados durante o Doutorado e, certamente, servirão para o enriquecimento do projeto aqui inicialmente desenvolvido.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, dentre eles *Eduardo Moraes Rego Reis, Aline Maria da Silva, Bianca Zingales, Ohara Augusto, Sayuri Miyamoto*, além da professora *Daniela Sanchez Bassères*, novamente, que foram meus supervisores durante as três monitorias em cursos da graduação, e que muito me ensinaram e me prepararam para a carreira acadêmica.

Aos meus professores da graduação, *Vânia D'Almeida, Marisa Veiga, Tânia Carmen, Luís Leoni, Mirta Mondino, Omara Cussigh, Silvia Toledo e Adelaide Vaz (in memoriam)*, grandes mestres, que me ensinaram e incentivaram e por todo o conhecimento adquirido para

a minha formação profissional e pessoal. E, sobretudo, às professoras *Lígia Azzalis, Adriana Florentino e Catharina Maria*, dos cursos de Bioquímica e Biologia Molecular, que tanto me inspiraram e que foram as responsáveis pela minha especialização na pós-graduação nesta área fascinante do conhecimento.

À *Eliana, Heloísa, Kamila, Júlio, Luan, Marina, Kátia, Lili, Ana e Cristina*, aos quais tive a oportunidade de conhecer e conviver no último ano, e que muito me alegraram, aconselharam e me estimularam a não desistir jamais dos meus objetivos. E, acima de tudo, por tantos momentos maravilhosos e divertidíssimos que passamos juntos, por nossos passeios e por terem participado, desde o início, da melhor fase da minha vida, que ainda continua.

À minha querida amiga *Jade*, que nunca me abandonou nem mesmo nos momentos de maior dificuldade. Por ter sido, dentre meus amigos, quem mais esteve presente em minha vida nos últimos quatro anos. Pelos conselhos, pelas brigas, pelas palavras de carinho, pela admiração, pela amizade, e pelos passeios e todos os momentos gostosos que passamos juntos.

Às minhas mais antigas amigas, *Valéria Shirley e Vanessa Teodoro*, e à *Brunna Maziero (Bê)*, por serem algumas das pessoas mais incríveis que já conheci. Por todos os saudosos momentos que passamos juntos e por vocês terem feito parte de momentos inesquecíveis da minha vida, que pretendo guardar para sempre. À *Valéria* e à *Vanessa*, pelos saudosos tempos de escola, e à *Brunna*, pelos *donuts*, idas ao cinema, nossas conversas e campeonatos no MSN, pela emoção do *skycoaster* e por todo o seu carinho.

Ao meu precioso amigo *Pe. Edileis*, por ter sido pra mim como um pai, quando eu precisei. Por todos os conselhos que me deu ao longo desses quase dez lindos anos em que participamos da mesma Comunidade. Por todos os passeios que me proporcionou, e acima de

tudo, por querer sempre o meu bem e estar sempre ao meu lado, me ajudando com tanto carinho e paciência em todas as minhas maiores dificuldades.

Aos meus grandes, eternos e sempre melhores amigos *Edinho* e *Lígia*, por mais de dez anos de amizade. Por tudo o que passamos até aqui, por tantos desabafos, conselhos, gargalhadas sem fim, e momentos maravilhosos que vivemos juntos. Sobretudo, pelas longas tardes de sábado que passávamos ensaiando, abdicando de tudo para aprender *ave-marias* e outras músicas difícilíssimas para cantar no dia seguinte e pelo desespero de não acordar a tempo aos domingos. Ao Edinho, pelo nosso projeto de um futuro CD, que certamente se realizará, pelos lanchinhos da Dona Maristela e todos os cafés nas manhãs de domingo. À Lígia, por me convidar para meu primeiro ensaio da Par. São Roque e por todo o carinho e momentos de amizade que tivemos ao longo de todos esses anos.

Aos meus amigos *Pe. Adilson, Pe. Hélio, Pe. Alexandre, Pe. Othoniel, Marcelo, Patrícia, Márcia, Silmara, Silvana, Emília, Luana, Rafael, Cristiane, Andréa, Gilberto, Gilberson, Vanderlei, Cida, Gabriele, Thiago, Grazielle, Djalma, Nayara, Júnior, Hugo, Juliana, Renata, Renan, Lincoln, Lucas, Mara, Raul*, e tantos outros, com os quais tive o imenso prazer de conviver por quase dez anos em que participei da equipe de liturgia da Paróquia São Roque. Por todas as longas tardes de ensaio para que tudo saísse perfeito. E pelo prazer de estar ao lado de cada um deles, por tocar e cantar unicamente para Deus.

A todos os meus demais amigos, inúmeros para aqui citá-los, e mesmo àqueles que hoje já não estão mais tão presentes, por tantos momentos de amizade e alegrias vividas juntas. Por tantas experiências novas que certamente ficarão pra sempre marcadas na minha memória para sempre.

Aos meus queridos padrinhos, *Maria José* e *Miguel*, e à minha avó, *Francisca*, que, de um modo muito especial, cuidaram de mim e me deram tanto apoio para continuar lutando

sempre nesta vida. Por me derem tantos exemplos e sempre estarem ao meu lado. Pelo orgulho que sentem por mim e pela felicidade que sinto ao lembrar os momentos em que cresci ao lado de todos eles.

Aos meus irmãos *Denise* e *Edson*, por todos os momentos vividos juntos desde a nossa infância, pelas brincadeiras e apoio ao longo de toda a minha vida. Pelas confidências, pelos passeios, pelas tardes passadas juntas e pelo apoio em inúmeras ocasiões. E também aos meus sobrinhos *Yasmim*, *Igor Henrique*, *Isabela* e *Fernando*, que tanto amo.

Aos meus muito amados pais, *Maria Laura* e *Nestor*, por tudo! Por terem lutado e sofrido tanto na vida para que nada me faltasse, pelo amor que sentem por mim, e eu por eles. Por saber que sempre pude e sempre poderei contar com eles em todos os momentos da minha vida, e por todos os exemplos diários de honestidade, humildade, confiança e amor. Por sempre me estimularem a lutar pelos meus objetivos sem jamais esmorecer e pela alegria de saber que o conforto do nosso lar, ao lado da minha família, é e sempre será o melhor lugar do mundo para descansar depois de um dia de trabalho.

Também, e não menos importante, àqueles que todos os dias entram e saem das nossas vidas, sem que percebamos, àqueles a quem às vezes esquecemo-nos até mesmo de cumprimentar na pressa do dia a dia, mas que muitas vezes cruzam nosso caminho para modificar algo sutil em nossa vida. Àqueles a quem um simples “Bom dia” dito com simpatia foi capaz de melhorar o meu humor e tornar o meu dia melhor. Àqueles a quem todos os dias somaram pequenos ensinamentos de amor, fraternidade, caridade, esperança, fé e perseverança em minha vida, sem que eu percebesse, e que hoje me ajudaram a ser o homem que sou.

À FAPESP, CAPES, CNPq e FAMRI, pelo apoio financeiro.

E, por fim, o meu mais sincero e profundo agradecimento ao meu grande e eterno amor, amigo e sempre melhor companheiro, *Ale Labate*. A você, *Mor*, o meu maior e mais bonito OBRIGADO POR TUDO! Obrigado por estes quase dois anos em que estamos juntos, provando dia após dia, o quanto valeu e vale a pena lutar quando se ama verdadeiramente. Apesar de serem tão poucas minhas palavras diante de tudo o que eu recebi de você, eu gostaria de dizer obrigado por cada segundo que vivemos desde que nos conhecemos. Por me entregar seu coração para que eu tomasse conta, pelas brincadeiras, pelas músicas que cantamos tantas vezes um para o outro e que hoje fazem parte da nossa história, pelos lugares e pessoas maravilhosas que conhecemos, pelas comidas estranhas que você me obrigou a comer, pelos nossos passeios e tardes e dias perfeitos que passamos juntos em tantos lugares. Obrigado por todos os seus conselhos, pela sua admiração, pela insistência e determinação em me ajudar em todos os momentos que eu mais precisei, por ter estado ao meu lado quando nós menos merecíamos, e por dia após dia me ensinar a ser uma pessoa cada vez melhor. Obrigado por permitir que eu te amasse como jamais amei ninguém e por ter sido você o único a me mostrar o que é ser amado verdadeiramente. Acho que este é o melhor sentimento de todo o mundo! E tudo graças a você! Obrigado por todos os sonhos que sonhamos até aqui e por todas as conquistas que alcançamos e por outras que certamente ainda virão! Obrigado por ter feito parte da minha vida passada, estar no meu presente e ser o único que eu vejo no meu futuro ao meu lado, até o último dia da minha vida. E, acima de tudo, obrigado por tornar o mundo um lugar tão perfeito para se viver, simplesmente por me fazer dia após dia sentir você ao meu lado, mesmo quando você não está.

“Porque ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão”.

O que eu tenho não me pertence, embora faça parte de mim. Tudo o que sou me foi um dia emprestado pelo Criador para que eu possa dividir com aqueles que entram na minha vida. Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão. Há muito o que dar e o que receber; há muito o que aprender, com experiências boas ou negativas. Tente ver as coisas negativas que acontecem com você como algo que aconteceu por uma razão precisa. E não se lamenta pelo ocorrido; além de não servir de nada reclamar, isso vai te vendiar os olhos, dificultando assim, continuar seu caminho. Quando não conseguimos tirar da cabeça que alguém nos feriu, estamos somente reavivando a ferida, tornando-a muitas vezes bem maior do que era no início. Nem sempre as pessoas nos ferem voluntariamente. Muitas vezes somos nós que nos sentimos feridos e a pessoa nem mesmo percebeu; e nos sentimos decepcionados porque aquela pessoa não correspondeu às nossas expectativas. E sabemos lá quais eram as nossas expectativas? Decepcionamo-nos e decepcionamos outras pessoas também. Mas, claro, é bem mais fácil pensar nas coisas que nos atingem. Quando alguém te disser que te magoou sem intenção, acredite nela! Vai te fazer bem. Assim, talvez, ela poderá entender quando você, sinceramente, disser que "foi sem querer". Dê de você mesmo o quanto puder! Sabe, quando você se for, a única coisa que vai deixar é a lembrança do que fez aqui. Seja bom, tente dar sempre o primeiro passo para a reconciliação, nunca negue uma ajuda ao seu alcance, perdoe e dê de você mesmo. Seja uma bênção a todos que o cercam! Deus não vem em pessoa para abençoar, Ele usa os que estão aqui dispostos a cumprir essa missão. Todos nós podemos ser Anjos. A eternidade está em nossas mãos. Viva de maneira honrada, para que quando envelhecer, você possa falar só coisas boas do passado e sentir assim, prazer uma segunda vez... e ter a certeza de que quando você se for, muito de você ainda fique naqueles que tiveram a boa ventura de te encontrar.

Chico Xavier

RESUMO

OZORIO DOS SANTOS, E. **Investigação das quinases Aurora A e Aurora B como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido pelo oncogene KRAS**. 2013. 161p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As alterações genéticas mais frequentes em tumores de pulmão são mutações pontuais que ativam o oncogene *KRAS*. Apesar destas mutações estarem ligadas à oncogênese de forma causal, diferentes abordagens para inibir as proteínas RAS diretamente fracassaram na clínica. Portanto, para que melhores alvos terapêuticos para o câncer de pulmão se tornem disponíveis, será necessário identificar as vias sinalizadoras ativadas pela proteína *KRAS*, que são críticas para a oncogênese. O objetivo deste projeto foi identificar novos alvos terapêuticos na oncogênese pulmonar induzida pela *KRAS*. Este projeto se baseou na seguinte hipótese: (1) a *KRAS* oncogênica leva à ativação das quinases mitóticas Aurora A e/ou B e (2) que as quinases Aurora A e/ou B são alvos terapêuticos relevantes no câncer de pulmão induzido pelo oncogene *KRAS*. Esta hipótese foi formulada com base em estudos anteriores mostrando que a quinase Aurora A fosforila diretamente componentes das vias efetoras de RAS, e que a Aurora A e Aurora B cooperam com a RAS oncogênica na transformação maligna. Para testar esta hipótese, nós inicialmente determinamos se a forma oncogênica da *KRAS* induz a expressão das quinases Aurora A e B. Para tanto, nós usamos 3 modelos celulares: (1) uma linhagem primária epitelial pulmonar imortalizada e seu par isogênico transformado pela *KRAS* oncogênica; (2) células tumorais pulmonares H1703 manipuladas geneticamente para expressar a forma oncogênica da *KRAS* de forma induzível; e (3) células de adenocarcinoma pulmonar portadoras de mutações oncogênicas em *KRAS* H358 e A549 manipuladas geneticamente para expressar *short hairpin RNAs* (shRNAs) para *KRAS* de forma induzível. Em todos os casos, a expressão da forma oncogênica da *KRAS* se correlacionou positivamente com a expressão de Aurora A e B. Para validar as quinases Aurora A e B como alvos relevantes do ponto de vista terapêutico, nós usamos, nas células mencionadas acima, abordagens genéticas ou farmacológicas para inibir a expressão ou atividade das quinases Aurora A e B. Nas células A549 e H358, portadoras da forma oncogênica da *KRAS*, a inibição da expressão das quinases Aurora A ou B por interferência de RNA de forma induzível, bem como o tratamento com um inibidor dual destas quinases, reduziu o crescimento, viabilidade e tumorigenicidade celulares *in vitro*. Mais importante do que isso, no modelo celular primário isogênico, bem como na linhagem H1703 com expressão induzível de *KRAS* oncogênica, a inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e B levou a uma redução no crescimento, viabilidade e tumorigenicidade celulares de forma dependente da presença da *KRAS* oncogênica, sugerindo que a inibição das quinases Aurora A e B afeta especificamente células transformadas pela *KRAS*. Em conclusão, nossos resultados apoiam a nossa hipótese de que as quinases Aurora são alvos da *KRAS* oncogênica no pulmão, e sugerem a inibição das quinases Aurora como uma nova abordagem para a terapia do câncer de pulmão induzido pela forma oncogênica da *KRAS*.

Palavras-chave: câncer de pulmão, *KRAS*, quinases Aurora.

ABSTRACT

OZORIO DOS SANTOS, E. **Investigation of Aurora A and Aurora B kinases as potential targets in KRAS-induced lung cancer.** 2013. 161p. Master's Degree Dissertation - Post-graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The most frequent genetic change found in lung tumors are activating point mutations in the *KRAS* gene, which have been causally linked to the oncogenic process. Unfortunately, different approaches to target RAS proteins for therapy have been unsuccessful. Therefore, in order to select better targets for lung cancer therapy, key cancer-relevant KRAS downstream pathways will need to be identified. The overall objective of this study was to identify novel therapeutic targets in KRAS-mediated lung cancer. This project was based on the following hypothesis: (1) KRAS activates mitotic kinases Aurora A and/or B; and (2) Aurora A and/or B are relevant therapeutic targets in KRAS-induced lung cancer. This hypothesis was formulated on the basis of published studies showing that Aurora A directly phosphorylates RAS effector pathway components, and Aurora A and B both cooperate with oncogenic RAS to promote malignant transformation. In order to test this hypothesis, we first determined whether oncogenic KRAS induces Aurora kinase expression. For that purpose, we used three different cell-based models: (1) an immortalized primary lung epithelial cell line and its isogenic KRAS-transformed counterpart, (2) H1703 lung cancer cell line engineered to express oncogenic KRAS inducibly, and (3) KRAS positive lung cancer cell lines H358 and A549 stably expressing inducible shRNAs targeting KRAS. In all cases, KRAS expression positively correlated with Aurora A and Aurora B expression. In order to validate Aurora A and/or B as therapeutically relevant KRAS targets in lung cancer, we used genetic and/or pharmacological approaches in the abovementioned cells to inactivate Aurora A or B. In KRAS positive H358 and A549 cell lines, inducible shRNA-mediated knockdown of Aurora A or B, as well as treatment with a dual Aurora A and B inhibitor, decreased growth, viability and tumorigenicity *in vitro*. More importantly, in the primary isogenic model and in the H1703 KRAS-inducible cell line, dual pharmacological inhibition of Aurora A and B reduced growth, viability and tumorigenicity in an oncogenic KRAS-dependent manner. This suggests that Aurora kinase inhibition therapy can specifically target KRAS transformed cells. In conclusion, our results support our hypothesis that Aurora kinases are important KRAS targets in lung cancer and suggest Aurora kinase inhibition as a novel approach for KRAS-induced lung cancer therapy.

Key-words: lung cancer, KRAS, Aurora kinases.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.1. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos e todas as faixas etárias, no ano de 2008, no mundo. | 27 |
| Figura 1.2. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos e todas as faixas etárias, no ano de 2008, no Brasil. | 28 |
| Figura 1.3. Sobrevida relativa em cinco anos para o câncer de pulmão em função do estadiamento no momento do diagnóstico. | 29 |
| Figura 1.4. Estratificação das principais mutações associadas ao desenvolvimento de NSCLC e drogas utilizadas atualmente na oncologia clínica. | 31 |
| Figura 1.5. Domínios conservados e sítios regulatórios das proteínas RAS, exemplificado por KRAS. | 36 |
| Figura 1.6. Modificações pós-traducionais necessárias para a ancoragem das proteínas RAS à membrana plasmática. | 37 |
| Figura 1.7. Ativação das proteínas RAS mediada via receptor tirosina-quinase. | 39 |
| Figura 1.8. Mecanismo de <i>switch</i> molecular das proteínas RAS. | 40 |
| Figura 1.9. Resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise enzimática da hidrólise do GTP ligado à RAS. | 41 |
| Figura 1.10. Principais vias ativadas por RAS. | 42 |
| Figura 1.11. Mecanismo molecular da oncogênese mediada por RAS. | 43 |
| Figura 1.12. Duas possíveis abordagens para a inibição da atividade oncogênica de RAS. | 50 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.13. Estrutura das quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C. | 53 |
| Figura 1.14. Estrutura dos domínios de quinase e sítio de ligação ao ATP da Aurora A. | 54 |
| Figura 1.15. Microscopia de fluorescência pra as quinases Aurora A e Aurora B durante as várias fases da mitose. | 56 |
| Figura 1.16. Representação esquemática de um possível papel para a Aurora A na oncogênese mediada por KRAS. | 60 |
| Figura 3.1. Vetor de inibição pTRIPZ da <i>Open Biosystems</i> ® | 75 |
| Figura 4.1. Determinação da eficiência (<i>Ef</i>) dos <i>primers</i> de <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> , <i>KRAS</i> , <i>GAPDH</i> , <i>ACTB</i> e <i>GUSB</i> . | 82 |
| Figura 4.2. Expressão de RFP em clones <i>knockdown</i> gerados a partir de células A549. | 85 |
| Figura 4.3. Expressão de RFP em clones <i>knockdown</i> gerados a partir de células H358. | 86 |
| Figura 4.4. Expressão gênica de <i>KRAS</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> determinada por RT-qPCR para clones <i>knockdown</i> gerados a partir de células A549. | 88 |
| Figura 4.5. Expressão gênica de <i>KRAS</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> determinada por RT-qPCR para clones <i>knockdown</i> gerados a partir de células H358. | 89 |
| Figura 4.6. Expressão gênica de <i>KRAS</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> determinada por <i>Western blotting</i> para clones <i>knockdown</i> gerados a partir de células A549. | 90 |
| Figura 4.7. Expressão gênica de <i>KRAS</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> determinada por <i>Western blotting</i> para clones <i>knockdown</i> gerados a partir de células H358. | 91 |
| Figura 4.8. Em células pulmonares primárias imortalizadas, a expressão de <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> está correlacionada à presença de <i>KRAS</i> oncogênica. | 93 |
| Figura 4.9. <i>Time-course</i> da expressão de <i>KRAS</i> em células H1703 ao longo de 24h. | 95 |

| | |
|---|------------|
| Figura 4.10. <i>Time-course</i> da expressão de KRAS em células H1703 ao longo de 13 dias. | 96 |
| Figura 4.11. Células pulmonares H1703 apresentam variação da expressão do mRNA das quinases Aurora em função da indução da expressão de KRAS oncogênica com doxiciclina. | 98 |
| Figura 4.12. Células pulmonares H1703 apresentam variação da expressão proteica das quinases Aurora em função da indução da expressão de KRAS oncogênica com doxiciclina. | 99 |
| Figura 4.13. A inibição da expressão de KRAS por interferência de RNA reduz a expressão do mRNA das quinases Aurora A e Aurora B. | 101 |
| Figura 4.14. A inibição da expressão de KRAS por interferência de RNA reduz a expressão proteica das quinases Aurora A e Aurora B. | 102 |
| Figura 4.15. A inibição da expressão de KRAS, AURKA e AURKB por interferência de RNA reduz o crescimento celular de linhagens pulmonares portadoras de KRAS oncogênica. | 104 |
| Figura 4.16. A inibição da expressão de KRAS, AURKA e AURKB por interferência de RNA reduz a viabilidade celular de linhagens pulmonares A549 e H358 portadoras de KRAS oncogênica em ensaios de formação de colônia em substrato sólido na presença de doxiciclina. | 105 |
| Figura 4.17. A inibição da expressão de KRAS, AURKA e AURKB por interferência de RNA reduz a viabilidade metabólica de linhagens pulmonares A549 e H358. | 106 |
| Figura 4.18. A inibição das quinases Aurora A ou Aurora B por RNA de interferência é capaz de levar a uma redução da tumorigenicidade <i>in vitro</i> das células A549 e H358. | 108 |
| Figura 4.19. Fórmula estrutural de Aurora Kinase Inhibitor II. | 110 |
| Figura 4.20. Cinética temporal da inibição das quinases Aurora A e Aurora B mediada | 110 |

por AI II em células A549.

Figura 4.21. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz o crescimento de células A549 e H358. **111**

Figura 4.22. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz a capacidade de formação de colônias de células A549 e H358. **112**

Figura 4.23. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz a viabilidade celular em A549 e H358. **113**

Figura 4.24. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz a tumorigenicidade *in vitro*. **114**

Figura 4.25. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz o crescimento celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. **116**

Figura 4.26. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz a capacidade de formar colônias de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. **117**

Figura 4.27. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz a viabilidade celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. **118**

Figura 4.28. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz a tumorigenicidade celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. **119**

Figura 4.29. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz o crescimento celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. **121**

Figura 4.30. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz a capacidade de formação de colônias **123**

de forma dependente da presença de KRAS oncogênica.

Figura 4.31. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz a viabilidade celular de forma **124** dependente da presença de KRAS oncogênica.

Figura 4.32. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz a tumorigenicidade in vitro de forma **125** dependente da forma oncogênica da KRAS.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 3.1. Sequências de <i>primers forward</i> (Seq _{FW}) e <i>reverse</i> (Seq _{RV}) utilizadas nas reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). | 68 |
| Tabela 3.2. Anticorpos primários utilizados e suas condições ótimas de incubação nos ensaios de <i>Western blotting</i> . | 72 |
| Tabela 3.3. Anticorpos secundários utilizados e suas condições ótimas de incubação nos ensaios de <i>western blotting</i> . | 73 |
| Tabela 4.1. Determinação da concentração ótima de cada par de primers. | 75 |
| Tabela 4.2. Genes housekeeping utilizados para normalização das reações de PCR em tempo real. | 83 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| 5'-UTR | 5'-Região não traduzida (do inglês <i>five prime untranslated region</i>) |
| AI II | Aurora kinase inhibitor II |
| ALK | Receptor tirosina quinase do linfoma anaplásico (do inglês, <i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>) |
| APS | Persulfato de amônio (do inglês, <i>ammonium persulfate</i>) |
| ATP | Adenosil trifosfato (do inglês, <i>adenosine triphosphate</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>) |
| BRAF | Oncogene viral do sarcoma murino (do inglês, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene</i>) |
| BSA | Albumina sérica bovina (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>) |
| DMEM | Meio modificado de Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| Dox | Doxiciclina |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic 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>) |
| ERBB2 | Oncogene viral da leucemia eritoblástica aviária v-erb-b2 (do inglês, <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene</i>) |
| FGF | Fator de crescimento fibroblástico (do inglês, <i>fibroblast growth factor</i>) |

| | |
|--------------|--|
| GAP | Proteína ativadora da 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 nucleotide exchange factor</i>) |
| GRB2 | Ligante do receptor do fator de crescimento (do inglês, <i>growth factor receptor-bound</i>) |
| GTP | Guanosil trifosfato (do inglês, <i>guanosine triphosphate</i>) |
| GUSB | Beta glucuronidase (do inglês, <i>glucuronidase beta</i>) |
| HRAS | Oncogene homólogo do sarcoma viral de camundongo de Harvey (do inglês, <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>) |
| ICMT | Isoprenilcisteinacarboxilmetiltransferase (do inglês, <i>isoprenylcysteinecarboxylmethyl transferase</i>) |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| KRAS | Oncogene homólogo do sarcoma viral de camundongo de Kirsten (do inglês, <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>) |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>) |
| MEKK1 | Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógenos (do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>) |
| MET | Proto-oncogene met (do inglês, <i>met proto-oncogene</i>) |
| MOI | Multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i>) |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, <i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| MTOR | Alvo farmacológico da rapamicina (do inglês, <i>mechanistic target of rapamycin</i>) |
| MTT | Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| MYC | Homólogo do oncogene viral v-myc da mielocitomatose aviária (do inglês, <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>) |
| NF1 | Neurofibromina 1 (do inglês, <i>neurofibromin 1</i>) |

| | |
|---------------|--|
| NF-κB | Fator de transcrição 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 cell lung cancer</i>) |
| NTCtrl | Controle sem alvo gênicos (do inglês, <i>non-targeting control</i>) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| 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 em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDGFRB | Polipeptídeo beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, <i>platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>) |
| PGGT1 | Geranilgeraniltransferase do tipo I (do inglês, <i>protein geranylgeranyltransferase type I</i>) |
| PGGT2 | Geranilgeraniltransferase do tipo II (do inglês, <i>protein geranylgeranyltransferase type II</i>) |
| PI | Iodeto de propídio (do inglês, <i>propidium iodide</i>) |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-quinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol-3-phosphate</i>) |
| PIK3CA | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-quinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase</i>) |
| PLC | Fosfolipase C (do inglês, <i>phospholipase C</i>) |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonila (do inglês, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>) |
| RALA | Homólogo A do oncogene viral <i>v-ral</i> da leucemia símia (do inglês, <i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A</i>) |
| RASA1 | RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1 |
| RFP | Proteína fluorescente vermelha (do inglês, <i>red fluorescent protein</i>) |
| RIPA | Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (do inglês <i>radio-immunoprecipitation assay buffer</i>) |

| | |
|----------------|--|
| RNA | Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>) |
| ROS1 | Oncogene c-ros 1 (do inglês, <i>c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>) |
| RPMI | Meio de cultura (do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute's medium</i>) |
| RTK | Receptor tirosina quinase (do inglês, <i>receptor of tyrosine-kinase</i>) |
| RT-qPCR | Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês, <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>) |
| SCLC | Câncer de pulmão de células pequenas (do inglês, <i>small cell lung cancer</i>) |
| SDS | Dodecilsulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SFB | Soro feral bovino |
| shRNA | Pequeno grampo de RNA (o inglês, <i>small hairpin RNA</i>) |
| siRNA | Pequeno RNA de interferência (do inglês, <i>small interfering RNA</i>) |
| SOS1 | Proteína homóloga 1 a <i>son of sevenless</i> (do inglês, <i>son of sevenless homolog 2</i>) |
| SOS2 | Proteína homóloga 2 a <i>son of sevenless</i> (do inglês, <i>son of sevenless homolog 2</i>) |
| SRC | Homólogo do oncogene viral v-src de sarcoma aviário (do inglês, <i>v-src avian sarcoma - Schmidt-Ruppin A-2 - viral oncogene homolog</i>) |
| TBST | Tampão salino tris/tween (do inglês, <i>tris buffered saline, tween</i>) |
| WT | Proteína selvagem (do inglês, <i>wild type</i>) |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1. O câncer de pulmão | 27 |
| 1.2. A pequena GTPase KRAS | 32 |
| 1.2.1. Histórico | 32 |
| 1.2.2. Estrutura e função das proteínas RAS | 34 |
| 1.2.3. Regulação da atividade de RAS | 38 |
| 1.2.4. KRAS e câncer | 42 |
| 1.2.5. KRAS como alvo terapêutico direto | 45 |
| 1.2.6. KRAS como alvo terapêutico indireto | 49 |
| 1.3. As quinases Aurora | 51 |
| 1.3.1. Estrutura e localização celular | 52 |
| 1.3.2. Quinases Aurora e Câncer | 56 |
| 1.3.3. Quinases Aurora e KRAS | 59 |
| 2. OBJETIVOS | 62 |
| 2.1. Objetivo específico I | 62 |
| 2.2. Objetivo específico II | 62 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 63 |
| 3.1. Linhagens celulares | 63 |
| 3.2. Condições de cultura, subcultura e preservação das linhagens celulares | 64 |
| 3.3. Extração e quantificação de RNA | 66 |
| 3.4. Síntese de cDNA | 67 |
| 3.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR. | 68 |
| 3.6. Determinação da concentração e eficiência de primers | 69 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7. Normalização do RT-qPCR | 70 |
| 3.8. Extração e quantificação de proteínas | 71 |
| 3.9. <i>Western blotting</i> | 71 |
| 3.10. Produção de lentivírus com as construções de interesse | 74 |
| 3.11. Titulação viral | 76 |
| 3.12. Determinação da concentração efetiva de puromicina | 76 |
| 3.13. Transdução viral | 76 |
| 3.14. Concentração efetiva de doxíciclina para indução | 77 |
| 3.15. Cinética temporal de indução por doxíciclina | 77 |
| 3.16. Seleção clonal das células H358 e A549 | 78 |
| 3.17. Ensaio biológicos | 78 |
| 3.17.1. <i>Curva de crescimento</i> | 78 |
| 3.17.2. <i>Ensaio clonogênicos</i> | 78 |
| 3.17.3. <i>Ensaio de viabilidade metabólica por redução de MTT</i> | 79 |
| 3.17.4. <i>Crescimento em suspensão de agarose</i> | 80 |
| 3.18. Análise estatística | 80 |
| 4. RESULTADOS | 81 |
| 4.1. Caracterização de reagentes e padronização de ensaios. | 81 |
| 4.1.1. <i>Otimização das condições ideais para RT-qPCR.</i> | 81 |
| 4.1.2. <i>Geração e caracterização de células H358 e A549 expressando shRNAs para K-Ras, Aurora A e Aurora B.</i> | 84 |
| 4.2. Resultados experimentais | 92 |
| 4.2.1. <i>A presença de KRAS oncogênica em células primárias pulmonares imortalizadas está correlacionada com uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B.</i> | 92 |
| 4.2.2. <i>A expressão induzível da KRAS oncogênica em linhagens tumorais leva a uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B.</i> | 94 |

| | |
|---|------------|
| <i>4.2.3. A inibição da expressão de KRAS em células tumorais está correlacionada com uma menor expressão de Aurora A e Aurora B.</i> | 100 |
| <i>4.2.4. A inibição genética das quinases Aurora A e Aurora B em células portadoras de KRAS oncogênica promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem.</i> | 103 |
| <i>4.2.5. A inibição farmacológica das quinases Aurora A e Aurora B em linhagens tumorais portadoras de KRAS oncogênica reduz o crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem.</i> | 109 |
| <i>4.2.6. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B em células primárias imortalizadas manipuladas para expressar constitutivamente a forma oncogênica de KRAS promove uma redução do crescimento, viabilidade, e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.</i> | 115 |
| <i>4.2.7. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B em linhagens tumorais manipuladas para expressar induzivelmente a forma oncogênica de KRAS promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui o crescimento independente de ancoragem dessas células de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.</i> | 120 |
| 5. DISCUSSÃO | 126 |
| 6. CONCLUSÕES | 133 |
| BIBLIOGRAFIA | 135 |
| SÚMULA CURRICULAR | 161 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer no mundo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o ano de 2008 apontaram o câncer de pulmão como aquele de terceira maior incidência em ambos os sexos, ou de segunda maior incidência considerando-se os sexos individualmente, com cerca de 23,7 novos casos diagnosticados para cada 100.000 habitantes. De qualquer forma, para o mesmo ano, as neoplasias pulmonares foram as responsáveis pelo maior número de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo, com cerca de 20,3 óbitos para cada 100.000 habitantes (**Figura 1.1**).

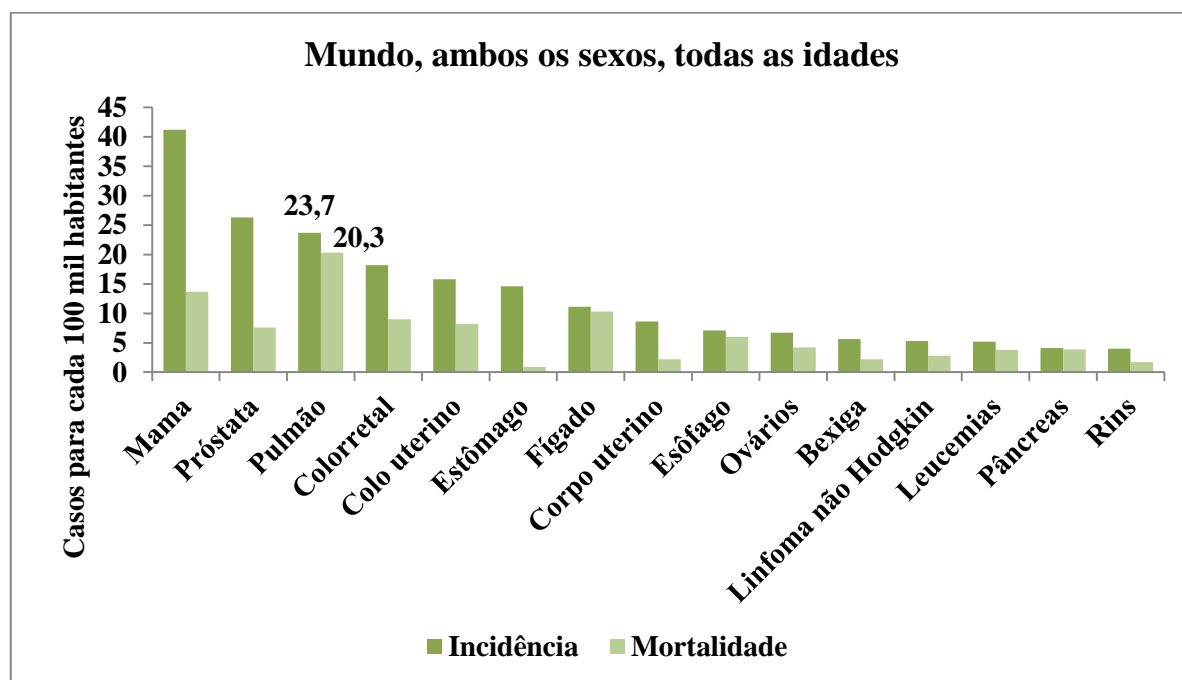


Figura 1.1. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos e todas as faixas etárias, no ano de 2008, no mundo. O câncer de pulmão apresenta a terceira maior incidência e é a principal causa de morte relacionada a neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos. Os rótulos de dados mostram a incidência e mortalidade para o câncer de pulmão, especificamente. **Adaptado de: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008.**

No Brasil, no ano de 2008, o câncer de pulmão obteve a quarta maior incidência em relação a outras neoplasias humanas, com cerca de 12,9 novos casos diagnosticados para cada

100.000 habitantes, e foi o terceiro principal responsável pelas mortes relacionadas ao câncer, com cerca de 11,8 mortes para cada 100.000 habitantes (**Figura 1.2**).

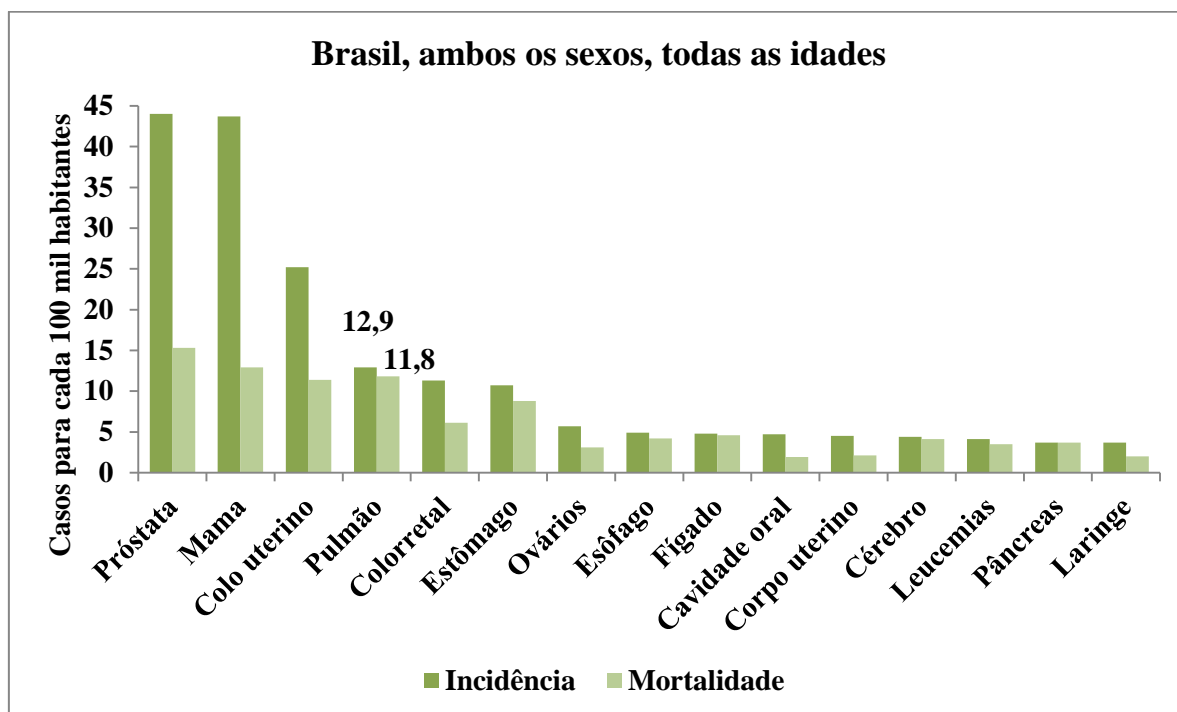


Figura 1.2. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos e todas as faixas etárias, no ano de 2008, no Brasil. O câncer de pulmão apresenta a quarta maior incidência e é uma das principais causas de morte relacionada a neoplasias humanas, considerando-se ambos os sexos. Os rótulos de dados mostram a incidência e mortalidade para o câncer de pulmão, especificamente. **Adaptado de: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008.**

As diferenças observadas em relação aos dados mundiais são devidas, sobretudo, ao fato de o câncer de pulmão possuir uma forte correlação com o histórico de fumo, hábito esse que vem decrescendo no país nas últimas décadas (CAVALCANTE, T. M., 2005). O Instituto Nacional do Câncer (INCA), em estudos realizados entre os anos de 1989 e 2004, apontou uma queda de 33% no consumo *per capita* de cigarros no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2004). Por outro lado, o consumo global mostrou um aumento cerca de 50% durante o período de 1975 a 1996, às custas do crescimento do consumo em países menos desenvolvidos (WORLD BANK, 1999; WHO, 2001).

Os primeiros estágios da doença tendem a ser assintomáticos. Conseqüentemente, no momento do diagnóstico, a maioria dos tumores tende a ser superestadiada (estágios III e IV) e é mais resistente ao tratamento quimioterápico, sendo frequentemente recorrente após dissecação (TAN, Y. K. et al., 2003). De fato, a sobrevida em cinco anos para o câncer de pulmão é uma das menores em comparação a outras neoplasias humanas, podendo chegar a menos de 5% em 5 anos para os estágios mais avançados da doença (Figura 1.3).

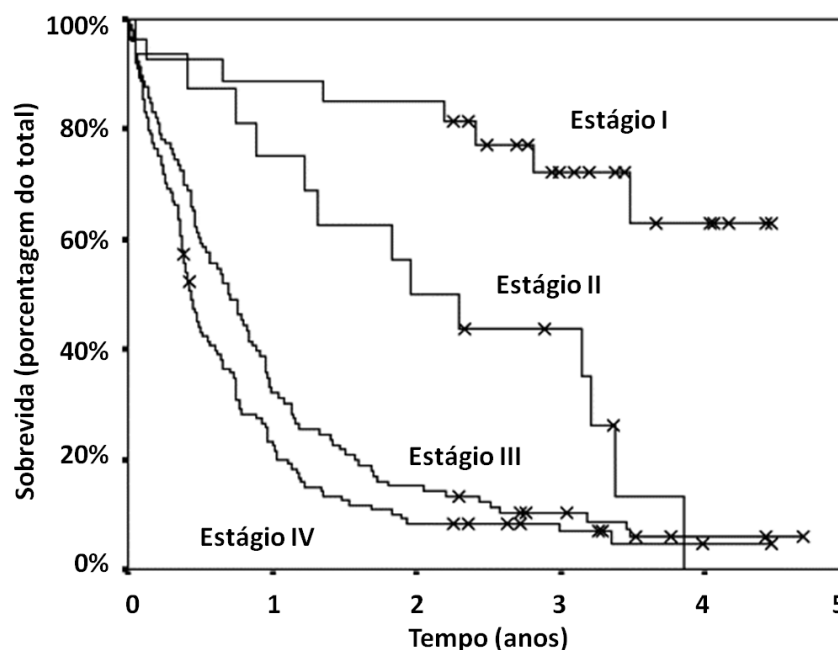


Figura 1.3. Sobrevida relativa em cinco anos para o câncer de pulmão em função do estadiamento no momento do diagnóstico. O câncer de pulmão apresenta uma das menores sobrevidas em cinco anos, comparado a outras neoplasias humanas de mesmo estadiamento. A sobrevida decai grandemente em função da evolução tumoral e resistência ao tratamento quimioterápico, podendo chegar a menos de 5% para os estágios mais avançados da doença. Modificado de: TAN, Y. K. et al., 2003.

Há dois tipos principais de cânceres de pulmão: câncer de pulmão de células não pequenas (*non-small cell lung cancer* – NSCLC) e câncer de pulmão de células pequenas (*small cell lung cancer* – SCLC). O NSCLC ocorre muito mais frequentemente e é

representativo de 85% dos casos de câncer de pulmão (**NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2009**).

De acordo com o tipo de célula afetada, o NSCLC pode, ainda, ser subdividido em carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, e carcinoma de células grandes. O carcinoma de células escamosas é responsável por cerca de 30% de todos os casos de câncer de pulmão e geralmente se desenvolve na região central, interior dos pulmões ou nos brônquios maiores, sendo aquele de maior correlação com o histórico de fumo (**AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013**).

Os adenocarcinomas representam cerca de 30% das lesões pulmonares invasivas, tendendo a ocorrer na maioria dos casos em regiões periféricas nas vias aéreas menores (**ADDARIO, G. D. et al., 2010**). Já o carcinoma de células grandes é responsável por cerca de 10% de todos os casos, cresce muito e se espalha rapidamente para outras regiões do pulmão (**NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013**).

Por outro lado, o SCLC conta com 20% de todos os casos de câncer de pulmão e crescem principalmente na região central nos brônquios maiores. Este é também o mais invasivo e metastático de todos os tipos de cânceres de pulmão (**AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012**).

Recentemente, tem se tornado muito evidente que, não somente pelo perfil histológico, os tumores possuem inúmeras e distintas características moleculares que permitem sua classificação em várias subclasses, por exemplo, de acordo com mutações específicas encontradas em genes que regulam diversas funções biológicas importantes.

De fato, mutações em diversos genes relacionados à proliferação e sobrevivência celulares tem sido descritas em inúmeros trabalhos (**Figura 1.4**). As mutações mais frequentemente encontradas em NSCLC são observadas nos genes *KRAS*, *BRAF* e *EGFR* (**SHARMA, S. V.**

et al., 2010), mas uma série de outras alterações genéticas podem também estar envolvidas na tumorigênese pulmonar, bem como em outros processos oncogênicos.

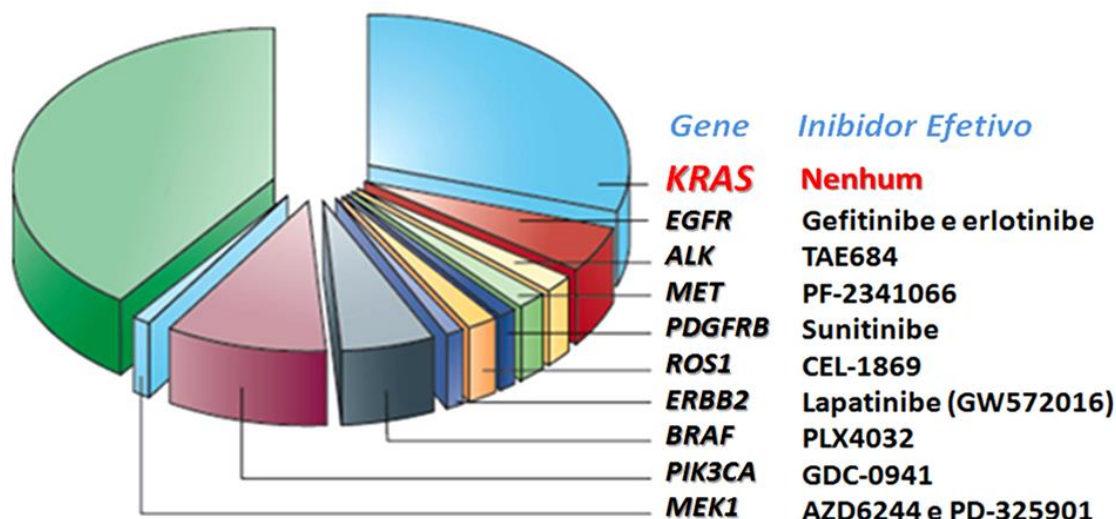


Figura 1.4. Estratificação das principais mutações associadas ao desenvolvimento de NSCLC e drogas utilizadas atualmente na oncologia clínica. Inúmeras mutações pontuais são conhecidas por estarem correlacionadas ao desenvolvimento de tumores pulmonares, e grande sucesso clínico tem sido obtido com o desenvolvimento de terapias dirigidas. *KRAS* é o gene mais frequentemente mutado encontrado em câncer de pulmão, para o qual, entretanto, ainda não existem terapias-alvo efetivas. Adaptado de: SHARMA, S. V. et al., 2010.

Com a descoberta da etiologia da maioria dos processos oncogênicos pulmonares e o conhecimento aprofundado dessas anormalidades, inúmeros esforços tem sido feitos no sentido de se desenvolver novas terapias capazes de bloquear a atividade desses genes mutados. De fato, a clínica oncológica tem obtidos sucessos com o uso de medicamentos alvo-dirigidos no tratamento do câncer de pulmão (LEE, E. et al., 2013 ; MAJEM, M. et al., 2013 ; MORABITO, A. et al., 2013). Por exemplo, inibidores como gefitinibe e crizotinibe, desenvolvidos para bloquear a atividade de EGFR mutante (PAEZ, J. G. et al., 2004) ou de quinases quiméricas resultantes da translocação do gene que codifica a quinase ALK (GERBER, D. E. et al., 2010), respectivamente, tem mostrado sucesso na clínica oncológica

(**FIGURA 1.4**). Entretanto estes sucessos beneficiam uma proporção pequena dos pacientes, uma vez que estas alterações moleculares não são muito frequentes, além de estarem associados com desenvolvimento de resistência à terapia (**XU, Y. et al., 2010; KATAYAMA, R. et al., 2012**).

As mutações em *KRAS* representam cerca de 30 a 50% de todos os casos de câncer de pulmão de células não pequenas, tornando a forma mutada da *KRAS* um alvo terapêutico racional, cuja inibição efetiva tem o potencial de contribuir de forma mais abrangente para o tratamento do câncer de pulmão. De fato, *KRAS* tem sido reportada como agente causador direto de tumores em muitos casos diagnosticados de câncer de pulmão. Entretanto, todos os esforços feitos até hoje no sentido de se inibir a atividade dessa proteína falharam clinicamente (**FRIDAY, B. B. et al., 2005**).

Portanto, para o desenvolvimento de novas terapias-alvo que contribuam efetivamente para o tratamento de pacientes portadores de câncer de pulmão induzido por mutações em *KRAS*, torna-se extremamente importante o entendimento mais aprofundado das vias de sinalização de *KRAS* na oncogênese pulmonar, visando a identificação de alvos terapêuticos potenciais.

1.2. A pequena GTPase KRAS

1.2.1. Histórico

KRAS é membro da família das pequenas GTPases, um grupo de proteínas monoméricas de aproximadamente 21kDa, ancoradas à membrana plasmática, cuja estrutura e função tem sido largamente estudadas ao longo das últimas décadas. A família RAS é constituída de três membros envolvidos na oncogênese humana, HRAS, NRAS e KRAS.

Os primeiros dois genes *RAS*, *HRAS* e *KRAS*, foram identificados nos estudos de dois vírus causadores de cânceres, o vírus dos sarcomas de Harvey e Kirsten (**CHANG, E. H. et al., 1982**), que receberam estes nomes em função de seus descobridores, Jennifer Harvey (**HARVEY, J. J. et al., 1964**) e Werner Kirsten (**KIRSTEN, W. H. et al., 1970**), respectivamente.

O maior interesse em *RAS* veio, entretanto, após a tentativa de experimentos desenhados para identificar genes humanos homólogos aos dos sarcomas de Harvey e Kirsten. Nesse sentido, em 1982, PARADA et al. transfectaram células NIH-3T3 com DNA isolado de células tumorais humanas. Após ensaios biológicos de formação de colônias, observou-se que as colônias transformadas continham o gene humano *HRAS* e que uma mutação no códon 12 desse gene era crucial para suas propriedades oncogênicas (**PARADA, L. F. et al., 1982**).

Por meio de abordagens semelhantes, outras mutações foram encontradas nos genes humanos *KRAS* e em um terceiro gene, *NRAS* (encontrado em neuroblastomas). Todas as mutações foram invariavelmente encontradas nos códons 12,13 e 61 nos três genes *RAS*. Análises posteriores de vários tumores humanos utilizando-se abordagens mais diretas para detecção de mutações revelaram que cerca de 30% de todos os tumores humanos apresentam mutações nos genes *RAS* (**BOS, J. L., 1989**).

Uma vez que as GTPases *RAS* estão envolvidas no crescimento e sobrevivência celulares, além de processos oncogênicos, adventou-se a idéia de que *RAS* poderia participar da transdução de sinais. De fato, a primeira evidência de que *RAS* está envolvida na transdução de sinais veio da observação de que *RAS* se liga ao GTP e GDP com alta afinidade (**SHIH, T. Y. et al., 1980**). Além disso, experimentos envolvendo células NIH3T3 nas quais foram introduzidos anticorpos anti-*RAS*, mostraram completa inibição da síntese de DNA induzida por soro fetal bovino (**SMITH, M. R. et al., 1986**).

Esses resultados, em combinação com as propriedades oncogênicas de RAS levaram à hipótese de que RAS controla a transdução de sinais de moléculas sinalizadoras externas até efetores intracelulares que regulam a proliferação celular (**DOWNWARD, J. et al., 1990**). Essas hipóteses foram rapidamente confirmadas com os achados de que fatores de crescimento extracelulares rapidamente ativam RAS, levando a um aumento na concentração intracelular do complexo RAS-GTP (**SATOH, T. et al., 1990**).

As mutações oncogênicas em *RAS* resultam em uma incapacidade da proteína de hidrolisar o GTP ligado no sítio regulatório e consequente permanência em seu estado ativo. Uma vez que RAS permanece constantemente ativada, as células recebem um sinal contínuo de proliferação e sobrevivência, mesmo na ausência de estímulos extracelulares (**di MAGLIANO, M. P. et al., 2013**).

1.2.2. Estrutura e função das proteínas RAS

Cada uma das proteínas RAS compartilha cerca de 85% de homologia em sua estrutura primária, em relação aos demais membros da família. O transcrito primário do gene *KRAS* é ainda sujeito a *splicing* alternativo, gerando dois transcritos, *KRAS4A* e *KRAS4B* (**DER, C. J., 1989**). Quase todas as proteínas RAS possuem 188 resíduos de aminoácidos constituintes da sua estrutura primária. Isso é válido para HRAS, NRAS e KRAS4A. A proteína KRAS4B, provinda do *splicing* alternativo do mRNA de *KRAS*, é ligeiramente maior que os demais membros da família, apresentando um resíduo de aminoácido adicional (**BARBACID, M., 1987**).

Embora as proteínas RAS apresentem alta homologia estrutural, elas são funcionalmente distintas. Esse fato é corroborado por meio da observação de que há uma

presença prevalente de oncogenes *RAS* específicos em formas particulares de tumores humanos (MITSUUCHI, Y. et al., 2002; GRADY, W. M. et al., 2002; JAFFEE, E. M. et al., 2002; ALMOGUERRA, C. et al., 1988) e, também, pelos diferentes padrões de expressão, processamento pós-traducional, localização subcelular entre as isoformas de *RAS* (CASTELLANO, E. et al., 2011).

As proteínas *RAS* apresentam domínios altamente conservados (DYKES, D. C. et al., 1992). Todos os aminoácidos 1 a 165, da extremidade aminoterminal, são altamente conservados entre os quatro membros da família *RAS*, enquanto que os 25 resíduos de aminoácidos da extremidade carboxiterminal dessas proteínas apresentam uma considerável variação quanto à sua homologia (DYKES, D. C. et al., 1993). Dentro desses motivos altamente conservados, existem diversos motivos importantes para a função dessas proteínas, incluindo sítios de ligação ao GTP, sítios múltiplos de ligação a proteínas efetoras, e duas regiões denominadas *Switch I* e *Switch II* (PAI, E. F. et al., 1990). *Switch I* e *Switch II* são responsáveis pelas interações com dois grupos de proteínas muito importantes para o controle da atividade de *RAS*, os fatores de troca do nucleotídeo de guanina (ou GEFs — do inglês, *Guanine nucleotide exchange factors*), e as proteínas ativadoras de GTPase (ou GAPs — do inglês, *GTPase activating proteins*) (PAI, E. F. et al., 1989). A estrutura cristalina das proteínas *RAS* revela que essas proteínas existem em diferentes conformações em virtude da sua ligação a GTP ou GDP (BORIACK-SJODIN, P.A. et al., 1998), que são comumente importantes para sua ligação às GAPs e GEFs (MARGARIT, S. M. et al., 2003).

A região variável na extremidade carboxiterminal contém sequências importantes que guiam as modificações pós-traducionais dessas proteínas, incluindo CAAX box, que é responsável por direcionar as modificações lipídicas nessa região, permitindo a correta ancoragem das proteínas *RAS* à membrana plasmática. KRAS4A e KRAS4B diferem nessa

região, o que resulta em uma sutil diferença quanto às modificações pós-traducionais que elas sofrem (**Figura 1.5**) (**FRIDAY, B. B. et al., 2005**).

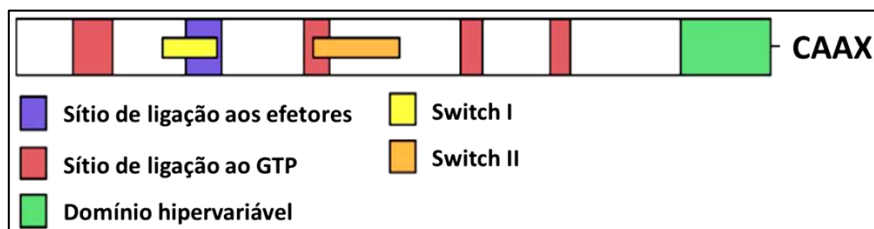


Figura 1.5. Domínios conservados e sítios regulatórios das proteínas RAS, exemplificado por KRAS. A proteína KRAS contém um número definido de domínios funcionais. Múltiplas regiões participam da ligação do GTP. Switch I é responsável pela interação com as GAPs e uma série de efetores de RAS, enquanto que Switch II é responsável pela interação com as GEFs. O domínio hipervariante contém uma região rica em resíduos de lisina e uma sequência de resíduos de aminoácidos conservados, denominada CAAX. Essas sequências são importantes para a atividade de KRAS, a primeira porque permite a ancoragem da proteína à membrana plasmática, e a segunda porque guia uma série de modificações pós-traducionais fundamentais para a localização subcelular de KRAS (**Modificado de FRIDAY, B. B. et al., 2005**).

Todas as proteínas RAS sofrem modificações pós-traducionais de múltiplos estágios, que promovem a ligação de múltiplos grupos hidrofóbicos à extremidade carboxiterminal, permitindo a ancoragem dessas proteínas à membrana (**Figura 1.6**). A correta localização dessas proteínas é essencial para sua atividade como transdutoras de sinais extracelulares. Todas as proteínas RAS sofrem farnesilação de uma cisteína presente na extremidade carboxiterminal, reação esta catalisada com uma enzima farnesiltransferase. Essa enzima reconhece um motivo específico denominado CAAX, onde C representa um resíduo de cisteína, A representa um aminoácido alifático (leucina, isoleucina ou valina) e X representa uma metionina, serina, leucina ou glutamina (**SCHABER, M. D. et al., 1990**).

Algumas proteínas RAS são também substratos para geranilgeraniltransferases do tipo I (GGT-1) ou geranilgeraniltransferases do grupo II (GGT-2), sobretudo na presença de inibidores da farnesilação. As enzimas GGT-1 reconhecem o mesmo motivo CAAX que as

farnesiltransferases, e a escolha entre farnesilação ou geranilgeranilação é determinada pelo aminoácido X terminal (**MOORES, S. L. et al., 1991**). Quando a farnesilação é inibida farmacologicamente, KRAS e NRAS, mas não HRAS, são geranilgeraniladas por GGT-1. Já as enzimas GGT-2 reconhecem proteínas contendo dois resíduos de cisteína contíguos na extremidade carboxiterminal das proteínas RAS (**WHYTE, D. B. et al., 1997**).

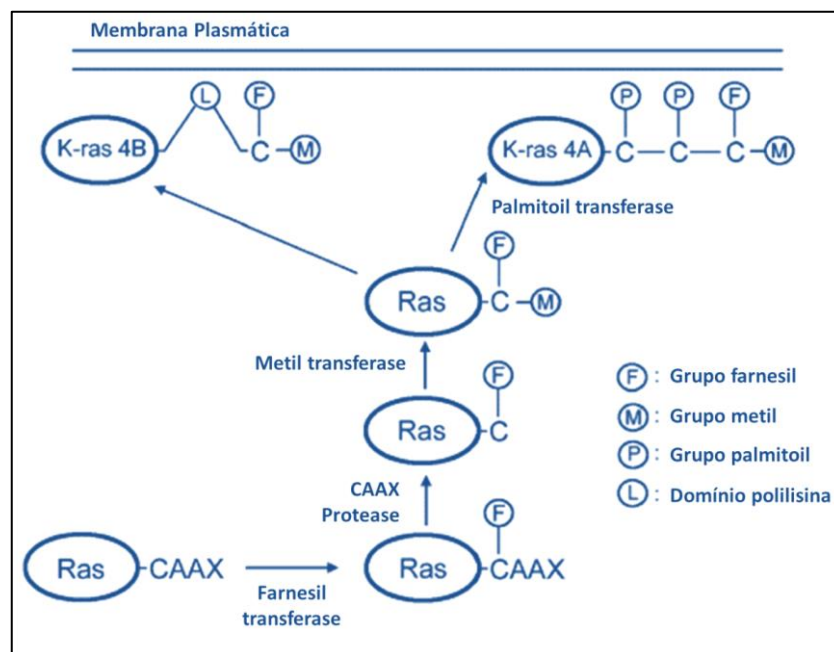


Figura 1.6. Modificações pós-traducionais necessárias para a ancoragem das proteínas RAS à membrana plasmática. Todas as proteínas RAS contêm um motivo CAAX na extremidade carboxiterminal direcionado à farnesilação no resíduo de cisteína pela farnesiltransferase. Algumas proteínas RAS são também substratos da geranilgeraniltransferase, particularmente na presença de inibidores da farnesiltransferase. Posteriormente, o tripeptídeo AAX é removido por uma enzima proteolítica Rcel, seguido pela metilação do resíduo de cisteína. A partir desse ponto, todas as proteínas RAS são modificadas diferencialmente, com KRAS4A recebendo um grupo palmitoil em um resíduo de cisteína próximo da extremidade carboxiterminal, enquanto KRAS4B utiliza um domínio rico em lisina para a ancoragem à membrana plasmática (**Modificado de FRIDAY, B. B., et al., 2005**).

Posteriormente, uma enzima proteolítica remove o tripeptídeo AAX da sequência CAAX (**TRUEBLOOD, C. E. et al., 2000**). A cisteína farnesilada remanescente é

carboximetilada por uma metiltransferase que utiliza adenosilmetionina como doador de carbonos para a reação enzimática (CLARKE, S., 1992).

Finalmente, todas as proteínas RAS, exceto KRAS4B, sofrem palmitoilação do grupo SH em resíduos de cisteína próximos à extremidade carboxiterminal, permitindo a ancoragem das proteínas RAS à membrana (RESH, M. D., 2004). Funcionalmente similar à palmitoilação, KRAS4B apresenta uma região rica em lisina que também direciona sua ancoragem à membrana (JACKSON, J. H. et al., 1994).

1.2.3. Regulação da atividade de RAS

Todas as proteínas RAS atuam no controle e transdução de sinais, de receptores de membrana até alvos intracelulares. Como todas as GTPases, o mecanismo de ativação de RAS consiste na troca de GDP por GTP, e sua inativação ocorre por hidrólise do GTP a GDP.

A ativação das vias de transdução de sinais onde as proteínas RAS participam é muito complexa, dado o vasto número de estímulos que podem iniciar a transdução de sinais por estas vias. A ativação de RAS começa com a ativação de diversos efetores a montante, incluindo os receptores de tirosina quinases, integrinas, proteínas G heterotriméricas e receptores de citocinas (AVRUCH, J. et al., 2001; CANTRELL, D. A., 2003; GHOBRIAL, I. M. et al., 2002; HENNING, S. W. et al., 1998; KINBARA, K., 2003; LIEBMANN, C., 2001; PARISE, L. V. et al., 2000).

Dentre todos esses, os mais bem estudados e entendidos são os receptores do tipo tirosina quinase (HELDIN, C. H., 1995), como o receptor de EGF, por exemplo (Figura 1.7). A ligação de um ligante ao receptor de EGF induz a sua dimerização, em um processo que resulta na justaposição de seus domínios catalíticos citoplasmáticos (LEMMON, M. A.

et al., 1994). Uma vez que esses domínios possuem atividade de tirosina quinase e que eles próprios possuem sítios suscetíveis à fosforilação, o que ocorre é a autofosforilação cruzada desse receptor, ativando-o (WEISS, F. U. et al., 1997).

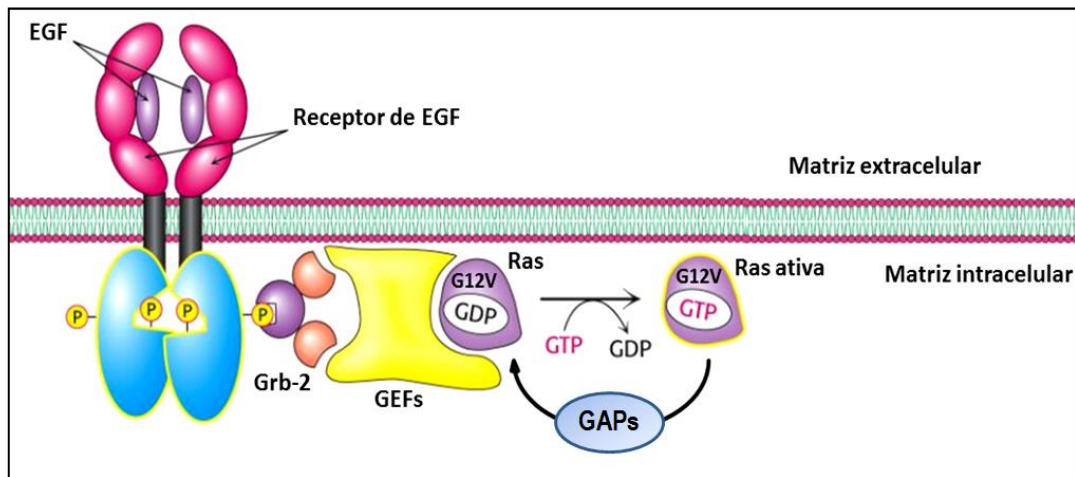


Figura 1.7. Ativação das proteínas RAS mediada via receptor tirosina-quinase. A ligação de um ligante ao receptor tirosina quinase induz sua dimerização e autofosforilação dos domínios intracelulares. Esse processo recruta proteínas assessoras GRB2, que interagem com fatores de troca do nucleotídeo de guanina (GEFs). As GEFs reconhecem o complexo RAS-GDP e deslocam o GDP para fora do sítio de ligação do nucleotídeo da GTPase. Uma vez que RAS possui igual afinidade de ligação para GTP e GDP, qualquer um destes nucleotídeos pode se ligar novamente à enzima. Entretanto, uma vez que a razão citoplasmática GTP/GDP é alta, GTP se liga preferencialmente à proteína, ativando-a. Fim do sinal molecular mediado pelo receptor tirosina-quinase, o complexo RAS-GTP é reconhecido por fatores ativadores de GTPase (GAPs), que aumentam a capacidade catalítica de RAS. O GTP é hidrolisado a GDP e um novo ciclo de ativação/inativação é iniciado.

Quando isso ocorre, proteínas adaptadoras, como GRB2, são recrutadas e estas, por sua vez, recrutam uma série de fatores de troca do nucleotídeo de guanina (GEFs) para a membrana plasmática (SCHLESSINGER, J., 2000). Atualmente, várias GEFs são conhecidas em mamíferos. Por exemplo, SOS1 e SOS2 são proteínas fortemente relacionadas que medeiam a ativação RAS pelos receptores do tipo tirosina quinase (SIMON, M. A. et al., 1993). Recentemente, a estrutura cristalina de RAS com domínios catalíticos de SOS foi resolvida, mostrando que as proteínas SOS reconhecem e interagem com sítios Switch I e

Switch II na conformação específica do complexo RAS-GDP (**BORIACK-SJODIN, P. A. et al., 1998**).

Como consequência, SOS insere um *loop* no sítio que liga GDP levando a uma alteração conformacional próximo ao Switch I. Como consequência o complexo RAS-GDP é desfeito. O sítio de ligação ao GDP/GTP, que encontra-se vazio na proteína, tem a capacidade de ligar-se a GDP ou GTP com igual afinidade ($K_d = 10\text{pM}$). Entretanto, como no citosol celular a concentração de GDP é muito menor que a de GTP, RAS se associará preferencialmente com o GTP, tornando-se ativa (**BARBACID, M., 1987**).

O final do sinal molecular do complexo RAS-GTP ocorre mediante a hidrólise do GTP a GDP pela própria atividade enzimática intrínseca de RAS. Essa atividade enzimática, entretanto, é muito pequena para permitir que RAS hidrolise eficientemente o GTP de modo compatível com o funcionamento celular normal. A atividade GTPásica de RAS é grandemente aumentada por meio de sua interação com as proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) (**FIGURA 1.8**) (**SCHEFFZEK, K. et al., 1997**).

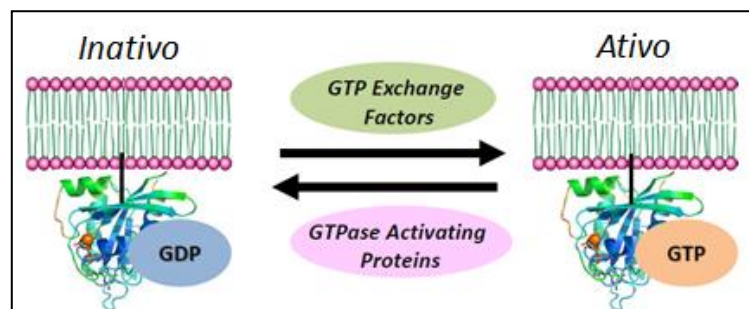


Figura 1.8. Mecanismo de *switch* molecular das proteínas RAS. As proteínas RAS oscilam entre um estado ativo, ligado ao GTP, e um estado inativo, ligado ao GDP. A troca de GDP por GTP e posterior hidrólise do GTP são processos mediados por fatores de troca do nucleotídeo de guanina (*GTP exchange factors* - GEFs) e proteínas ativadoras da GTPase (*GTPase activating proteins* - GAPs).

Pelo menos duas GAPs, p120GAP (RASA1) e NF1, são responsáveis pela regulação negativa da atividade de RAS. O sítio catalítico de RAS apresenta dois resíduos de

aminoácidos fundamentais para a catálise enzimática, uma glutamina no códon 61 e uma tirosina no códon 35, que participam diretamente da hidrólise do GTP. As GAPs fornecem um terceiro aminoácido, uma arginina (dedo de arginina) essencial para a catálise enzimática da reação de hidrólise do GTP (**Figura 1.9**) (SCHEFFZEK, K. et al., 1997).

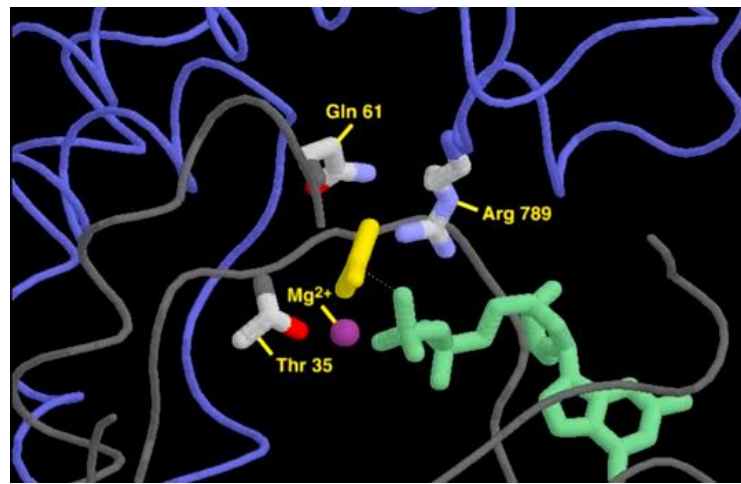


Figura 1.9. Resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise enzimática da hidrólise do GTP ligado à RAS. RAS apresenta dois aminoácidos, uma glutamina no códon 61 e uma tirosina no códon 35, fundamentais para a catálise enzimática, mas que sozinhos são incapazes de hidrolisar eficientemente o GTP ligado no sítio ativo da proteína. As GAPs fornecem um motivo estrutural contendo um arginina que aumenta grandemente a capacidade de RAS de hidrolisar o GTP, contribuindo, assim, para o fim da transdução de sinal mediada por RAS (**Modificado de: SCHEFFZEK, K. et al., 1997**).

As proteínas RAS possuem um número muito grande de efetores moleculares conhecidos relacionados a diversas funções celulares, tais como crescimento, sobrevivência, diferenciação e angiogênese. Essas vias de sinalização têm se mostrado cada vez mais complexas, uma vez que o número de efetores descritos tem aumentado e a complexidade da regulação cruzada dessas vias tem se tornado mais bem entendida (**Figura 1.10**).

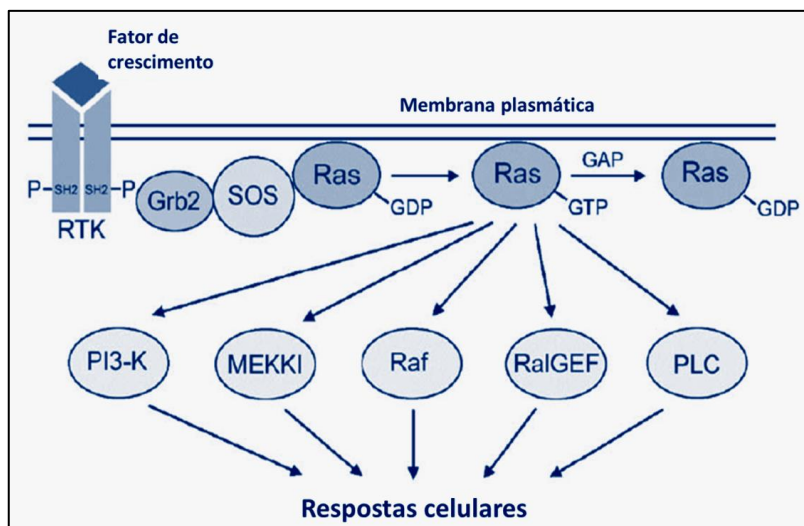


Figura 1.10. Principais vias ativadas por RAS. A ativação do receptor tirosina quinase (RTK) por fatores de crescimento (EFG e FGF) estimula a autofosforilação dos domínios SH2 no lado citosólico de RTK, recrutando a proteína GRB2. Os fatores de troca do nucleotídeo de guanina (GEFs), tais como SOS-1, estão localizados na membrana próximos ao Grb2, que, então, estimula RAS a trocar GDP por GTP. A proteína RAS ativa interage com uma série de efetores moleculares, incluindo PI3K, MEKKI, RAF, RalGEFs e PLC, gerando diferentes respostas celulares. A sinalização mediada por RAS é terminada quando a essa proteína interage com fatores denominados ativadores de GTPase (GAPs), e cliva o GTP a GDP. (Modificado de FRIDAY, B. B., et al., 2005).

1.2.4. KRAS e câncer

As proteínas RAS tem sido implicadas como responsáveis pela gênese e manutenção do fenótipo maligno de diversos tumores. O mecanismo molecular pelo qual RAS pode levar à transformação maligna está ilustrado na **Figura 1.11**. As principais alterações genéticas encontradas em RAS são mutações pontuais que ocorrem principalmente nos códons 12, 13 e 61. Os códons 12 e 13 codificam aminoácidos fundamentais para o reconhecimento das GAPs, de modo que mutações presentes nessas regiões tornam RAS incapaz de interagir com as mesmas, levando à ativação permanente de RAS, o que pode iniciar um processo oncogênico (AVIEL-RONEN, S. et al., 2006). Por outro lado, as mutações no códon 61 induzem a substituição de um resíduo de glicina presente no sítio catalítico de RAS, que é fundamental para a catálise enzimática da hidrólise do GTP ao GDP. Nesse caso, RAS perde completamente sua atividade catalítica, mesmo que as GAPs ainda sejam capazes de

reconhecer e interagir normalmente. De qualquer forma, seja por perda da atividade enzimática ou perda das interações proteína-proteína, as mutações nos códons 12, 13 e 61 impedem que o complexo RAS-GTP seja desfeito. Dessa forma, RAS permanentemente ativa é capaz de transduzir sinais moleculares constitutivamente aos seus efetores, culminando com uma maior sobrevivência e proliferação celulares, que podem resultar em transformação maligna.

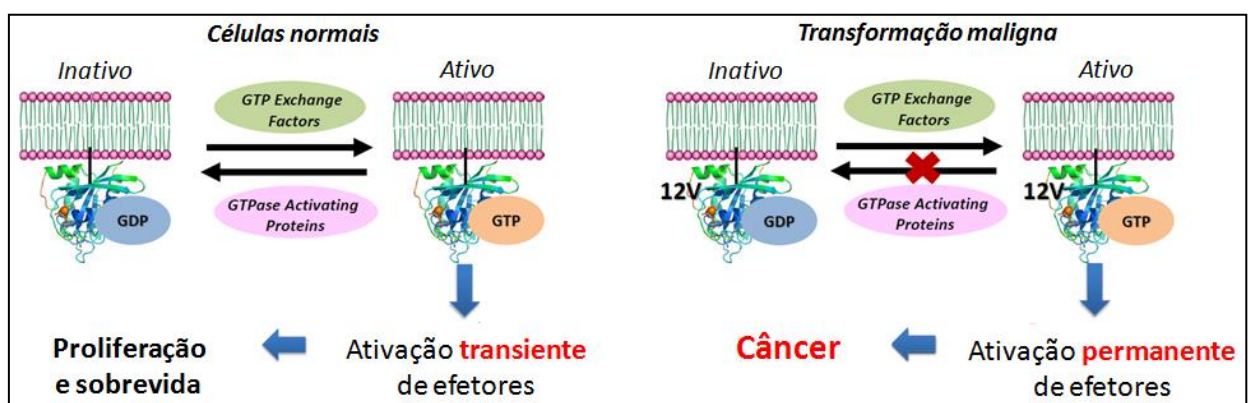


Figura 1.11. Mecanismo molecular da oncogênese mediada por RAS. Em células normais, RAS cicla entre sua forma ativa (ligada ao GTP) e inativa (ligada ao GDP), em um processo dependente da interação com GAPs e GEFs e compatível com a fisiologia normal de uma célula. Mutações pontuais nos códons 12 e 13 de RAS (aqui representada a mutação G12V) impedem que o complexo RAS-GTP seja reconhecido pelas GAPs, e RAS passa a emitir sinais constitutivamente aos seus efetores moleculares, ativando-os, o que pode iniciar o processo oncogênico. Uma terceira mutação comumente encontrada em RAS está presente no códon 61. Diferentemente dos códons 12 e 13, as mutações no códon 61 ocorrem no sítio catalítico de RAS, abolindo a capacidade catalítica de RAS, mesmo na presença de interação com as GAPs.

Uma vez que a expressão de RAS ocorre na maioria das células humanas, tumores associados a mutações em *RAS* também são encontradas nos mais diversos tecidos. De fato, os genes *RAS* são os oncogenes mais frequentemente mutados nos cânceres humanos, estando mutados em aproximadamente 30% de todos os tumores humanos.

As mutações nos genes *RAS* não são distribuídas uniformemente entre as isoformas. A maior parte das mutações em *RAS* são encontradas em *KRAS4B*, ao passo que mutações em *HRAS* são bastante raras (ELLIS, C. A. et al., 2000). De fato, os tumores humanos mostram

diferentes perfis de ativação de oncogenes entre as isoformas de RAS. As mutações em *KRAS* ocorrem principalmente em tumores epiteliais, enquanto que mutações em *NRAS* e *HRAS* são raras nessas neoplasias. Por outro lado, mutações em *NRAS* ocorrem em alta porcentagem em leucemias, enquanto que tumores de medula causados por mutações em *HRAS* e *KRAS* são muito raros (ALMOGUERRA, C. et al., 1988; RODENHUIS, S. et al., 1992; BENTIRES-ALJ, M. et al., 2006; CICHOWSKI, K. et al., 2001; ROCHLITZ, C. F. et al., 1989; TARTAGLIA, M. et al., 2005; WATZINGER, F. et al., 1999). Portanto, embora todas as proteínas RAS sejam altamente relacionadas em estrutura e parcialmente em função, as diferenças observadas quanto ao espectro de mutações em RAS e o desenvolvimento de tumores específicos são reflexo de seus níveis de expressão e funções célula-específicas (BOS, J. L. et al., 1987).

As mutações em *KRAS*, não só são mais prevalentes e incidentes nos tumores humanos, mas estão associadas, entre outros, a cerca de 90% dos tumores pancreáticos, 60% dos tumores colorretais e 50% dos tumores pulmonares (DERGHAM, S. T. et al., 1997; KRESSNER, U. et al., 1998 ; MASCAUX, C. et al., 2005; MOERKERK, P. et al., 1994; SHIBATA, D. et al., 1990; WANG, J. Y. et al., 2002).

Mesmo na ausência de mutações ativas, *KRAS* pode ainda desempenhar um papel na oncogênese de diversos tipos celulares, o que pode ocorrer por meio da amplificação do gene *KRAS*, superexpressão ou ativação de proteínas que atuam a montante. Cada uma dessas alterações celulares é capaz de promover o desenvolvimento de tumores, uma vez a maior atividade de *KRAS* culmina com a maior ativação de seus efetores. De fato, cerca de 40% dos adenocarcinomas de esôfago apresentam amplificação do gene *RAS* (GALIANA, C. et al., 1995). Adicionalmente, a transformação de linhagens celulares específicas está associada com a superexpressão de *KRAS*^{WT} (COLEMAN, W. B. et al., 1994).

Essas observações mostram apenas uma correlação entre câncer e a presença de mutações em *KRAS*. Muitos outros estudos, entretanto, evidenciam que *KRAS* tem, em relação ao processo oncogênico, uma relação de causalidade. Primeiro, *KRAS* foi inicialmente descrita como o agente transformador do vírus de sarcoma Kirsten, que era responsável pelo fenótipo maligno de linhagens celulares derivadas dos cânceres de pulmão e bexiga (DER, C. J. et al., 1982). Segundo, muitos estudos mostraram que a expressão da forma ativa da *KRAS* em camundongos é suficiente para causar a transformação neoplásica e o aparecimento de tumores (BRAUN, B. S. et al., 2003; BREMBECK, F. H. et al., 2003; CAULIN, C. et al., 2004; CHAN, I. T. et al., 2004; FISHER, G. H. et al., 2001; JACKSON, E. L. et al., 2001; RAIMOND, A. R. et al., 2006; TUVESON, D. A. et al., 2004; VITALE-CROSS, L. et al., 2004). E terceiro, a eliminação da atividade de *KRAS*, através da expressão de formas dominante-negativas ou através do bloqueio da expressão da *KRAS*, é capaz de reverter células malignas para um fenótipo não maligno (BOSSÙ, P. et al., 2000; FLEMING, J. B. et al., 2005; SHIRASAWA, S. et al., 1993). Finalmente, a alta prevalência das mutações em *KRAS* dentro de um amplo espectro de neoplasias sugere que a *KRAS* desempenha um papel central no desenvolvimento do fenótipo maligno (ARVANITAKIS, M. et al., 2004; PUIG, P. et al., 2000).

1.2.6. *KRAS* como alvo terapêutico direto

Uma vez que inúmeros estudos (descritos anteriormente) mostraram que a presença de mutações em *KRAS* é capaz de transformar malignamente diversos tipos celulares, a inibição da atividade biológica da forma oncogênica da proteína *KRAS* seria, portanto, uma abordagem terapêutica racional para o câncer de pulmão e outras neoplasias humanas associadas a esta oncoproteína (ADJEI, A. A., 2008).

A racionalidade que suporta a KRAS oncogênica como um alvo terapêutico contra o câncer é baseada em diversos fatores, incluindo a função das proteínas RAS normais, a importância de RAS na oncogênese, as consequências da inibição de RAS em linhagens celulares e modelos tumorais e a prevalência de mutações de RAS em tumores humanos (BOONSTRA, J. et al., 1995; STACEY, D. W., 2003; DOWNWARD, J., 2004; CARY, L. A. et al., 1999; KRANENBURG, O. et al., 2004).

As proteínas RAS regulam diversas vias de sinalização celulares que são importantes para o crescimento, proliferação, regulação do ciclo celular, sobrevivência, angiogênese e migração celular tumoral. Uma vez que a sinalização de RAS é muito complexa, existem muitos passos dessas vias que poderiam servir de base para o desenvolvimento de novas terapias-alvo, incluindo a inibição da expressão de RAS, inibição das modificações pós-traducionais ou do endereçamento à membrana plasmática, bloqueio das interações de RAS com as GEFs, e, por fim, aumento das interações RAS/GAPs (ADJEI, A. A., 2008).

Duas abordagens para o bloqueio da expressão proteica de RAS foram descritas: o uso de oligonucleotídeos antisense e RNA de interferência para a KRAS (FRIDAY, B. B. et al., 2005).

A estratégia de inibição com oligonucleotídeos antisense vem sendo estudada há bastante tempo e vários estudos mostraram que estas moléculas possuem efeito antitumoral *in vitro* (DUURSNA, A. M. et al., 2003; GRAY, G. D. et al., 1993; ZHANG, Y. et al., 1993; GEORGES, R. N. et al., 1993; MIURA, Y. et al., 2005). Através do uso de abordagens adenovirais, estas moléculas também mostraram atividade antitumoral *in vivo* em modelos animais xenográficos ou ortotópicos (ZHANG, Y. et al., 1993; GEORGES, R. N. et al., 1993). Finalmente, um oligonucleotídeo modificado desenhado contra a região 5'UTR de HRAS e denominado ISIS2503 é capaz de reduzir a proliferação celular *in vitro* e inibir a

formação de tumores xenográficos em camudongo, mas não demonstrou atividade antitumoral específica em ensaios clínicos de fase I (**CHEN, G. et al., 1996; HOLMLUND, J. T. et al., 1999; ADJEI, A. A. et al., 2003**), provavelmente devido à inabilidade de endereçamento seguro e eficiente dos oligonucleotídeos. Várias sequências antisense foram desenvolvidas e testadas contra as formas mutantes dos genes *RAS* (<http://www.isispharm.com>), porém até o momento nenhuma foi bem sucedida do ponto de vista clínico (**FRIDAY, B. B. et al., 2005**).

A estratégia de inibição de RAS por interferência de RNA oferece maiores vantagens, uma vez que siRNAs, além de promoverem o silenciamento de forma mais eficiente, são muito específicos às suas sequências-alvo e poderiam ser desenhados de forma a distinguir a KRAS oncogênica de sua forma não oncogênica. De fato, o silenciamento específico de KRAS^{V12} levou a uma menor tumorigenicidade, visto por meio de ensaios de formação de colônia independente de ancoragem (**BRUMMELKAMP, T. R. et al., 2002**). Esta é uma estratégia mais recente e o grande desafio está no endereçamento correto para as células tumorais e entrada eficiente nas mesmas. Infelizmente, até hoje não existem drogas baseadas em siRNA em estágio de pesquisa clínica.

A estratégia mais bem estudada para inibição direta da atividade biológica de RAS consiste na inibição dos diferentes processamentos pós-traducionais, principalmente a farnesilação (ver item 1.2.2. *Estrutura e função das proteínas RAS*). Estas modificações químicas pós-traducionais são responsáveis pela associação de RAS com a membrana, sendo esta localização subcelular essencial para a sinalização mediada por RAS.

A farnesilação é a etapa limitante do processamento pós-traducional de KRAS e crucial para sua atividade oncogênica. Nesse sentido, muitos trabalhos foram realizados com inibidores farmacológicos das farnesil transferases (**KATO, K. et al., 1992**), incluindo estudos pré-clínicos e várias fases dos estudos clínicos (**ADJEI, A. A., 2003; HALUSKA, P.**

et al., 2002; SEBTI, S. M., 2003). Alguns destes inibidores demonstraram atividade antitumoral em experimentos preliminares. O tipifarnibe é capaz de inibir eficientemente o crescimento de aproximadamente 75% tumores testados que apresentam HRAS ou KRAS oncogênicas (**END, D. W. et al., 2001**). FTI-276, um peptidomimético da extremidade carboxiterminal de KRAS4B, mostrou-se eficiente na inibição do crescimento de células NIH-3T3 transformadas com KRAS oncogênica, bem como eficiente na redução da formação de tumores xenográficos de células derivadas de carcinoma pulmonar humano injetadas em camundongos imunossuprimidos (**SUN, J. et al., 1995**).

Entretanto estes inibidores falharam em estudos clínicos, mostrando pouca ou nenhuma atividade antitumoral (**RAO, S. et al., 2004; van CUTSEM, E. et al., 2004**). Uma explicação para este fracasso é que, embora os inibidores da farnesil transferase sejam capazes de inibir a farnesilação *in vitro*, as proteínas KRAS e NRAS podem sofrer um processamento pós-traducional alternativo, sendo geranilgeraniladas em vez de farnesiladas, e, desse modo, acabam por ancorar à membrana plasmática normalmente (**WHYTE, D. B. et al., 1997**).

Uma vez que a KRAS e NRAS podem ser geranilgeraniladas e ancoradas à membrana mesmo na presença de inibidores da farnesil transferase, o uso de uma terapia combinada contra a farnesilação e geranilgeranilação poderia ser eficaz na inibição da atividade dessas proteínas. De fato, essa estratégia terapêutica apresentou atividade antitumoral *in vitro* (**LOBELL, R. B. et al., 2002**) e obteve sucesso quanto à inibição de RAS oncogênica em estudos pré-clínicos (**SUN, J. et al., 1998**). Entretanto, a inibição combinada de farnesil transferases e geranilgeranil transferases levou a inúmeros efeitos sistêmicos e cardiotoxicos, muito provavelmente devido aos efeitos dessa inibição sobre outras proteínas que também dependem destas modificações lipídicas para a sua atividade (**BRITTEN, C. D. et al., 2001**). Desse modo, tendo falhado na clínica, estes estudos foram descontinuados.

A inibição de outras etapas do processamento pós-traducional de KRAS, que incluem a clivagem proteolítica da sequência CAAX, metilação e palmitoilação, são capazes de impedir eficientemente a ancoragem de RAS à membrana plasmática. De fato, o nocaute de Rcel (enzima responsável pela clivagem proteolítica da sequência CAAX na extremidade carboxiterminal de RAS) em fibroblastos de camundongo é capaz de levar a erros do endereçamento de RAS à membrana plasmática e, desse modo, reduzir as propriedades tumorigênicas dessas células (**BERGO, M. O. et al., 2002**). A transformação de fibroblastos por KRAS oncogênica também foi inibida pela deleção do gene ICMT, que codifica a enzima isoprenilcisteína carboximetil transferase, responsável pela metilação de RAS (**WINTER-VANN, A. M. et al., 2005**).

Embora os eventos pós-traducionais de KRAS descritos acima possam ser, teoricamente, bons alvos para o desenvolvimento de terapias-dirigidas, não existe ainda comprovação da eficiência clínica, especificidade ou segurança de qualquer droga já testada contra a atividade de RAS oncogênica. Dentre todos os problemas encontrados, sobressaltamos a inabilidade de se inibir especificamente a forma oncogênica de KRAS e não sua forma normal; os efeitos *off-target* observados pela inibição da farnesilação, seja combinada com a inibição da geranylgeranilação de RAS ou não; e, por fim, o fato de que não existe racionalidade para o desenvolvimento de inibidores diretos da atividade de RAS oncogênica, visto que a oncogenicidade é causada pela própria incapacidade de KRAS mutada em hidrolisar o GTP a GDP (**FRIDAY, B. B. et al., 2005**).

1.2.6. KRAS como alvo terapêutico indireto

Uma vez que até hoje todos os esforços feitos na tentativa de se inibir eficientemente a atividade KRAS oncogênica diretamente, sem, contudo, causar toxicidade celular, falharam

do ponto de vista terapêutico, uma estratégia, que tem sido alvo de inúmeras pesquisas, é a inibição indireta de KRAS através da busca por efetores moleculares de KRAS, que são cruciais para sua atividade oncogênica, e cuja inibição poderia ser capaz de reverter o fenótipo maligno dessas células (**Figura 1.12**) (**BAINES, A. T. et al., 2011; ALVARADO, Y. et al., 2007**).

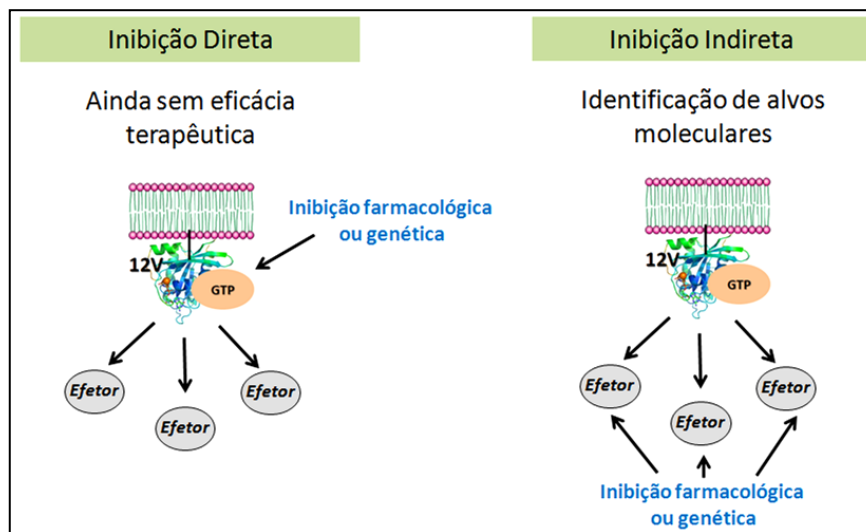


Figura 1.12. Duas possíveis abordagens para a inibição da atividade oncogênica de RAS. A inibição direta consiste no desenvolvimento de drogas que diretamente interfiram na atividade de RAS ou que impeçam sua ancoragem à membrana plasmática. A abordagem indireta consiste na identificação de alvos moleculares importantes para a gênese e manutenção do fenótipo maligno de células transformadas pela forma oncogênica de RAS e cuja inibição seja eficiente na redução das propriedades oncogênicas dessas células.

Diversos alvos moleculares efetores da atividade de KRAS já foram identificados até o momento e muitas drogas têm sido desenvolvidas na tentativa de se inibir indiretamente a atividade oncogênica de KRAS por meio da inibição de seus efetores. Os efetores de KRAS mais bem estudados sob esse aspecto incluem RAF, ERK e MTOR (**FRIDAY, B. B. et al., 2005**).

Muitas outras proteínas têm sido estudadas como possíveis candidatos a efetores, mesmo que indiretos, da atividade oncogênica de RAS. O entendimento mais amplo e

detalhado das vias ativadas por KRAS poderia servir de fundamentação teórica para o desenvolvimento de novas terapias-alvo, mais seguras e eficientes na oncologia clínica.

Nesse sentido, nós aqui propomos que as quinases Aurora, uma família de serina-treonina quinases, poderiam ser promissores alvos terapêuticos na oncogênese mediada por RAS. Para tanto, nós inicialmente descreveremos quem são as quinases Aurora, suas funções biológicas e, posteriormente, o porquê de as termos escolhido como possíveis efetores da atividade de KRAS oncogênica.

1.3. As quinases Aurora

As quinases Aurora representam uma família de serina-treonina quinases altamente relacionadas à regulação do ciclo e divisão celulares. Essa família é composta por três membros, as quinases Aurora A (AURKA), Aurora B (AURKB) e Aurora C (AURKC), estruturalmente relacionadas entre si, porém muito diversas quanto as suas funções biológicas específicas (NIGG, E. A., 2001).

Além disso, todos os membros dessa família tem sido alvo de pesquisas contra o câncer, uma vez que elas se encontram superexpressas em vários tipos de tumores, sugerindo um possível papel na oncogênese e/ou manutenção do fenótipo maligno (TATSUKA, M. et al., 1998; KIMURA, M. et al., 1999; LIN, Y. S. et al., 2006; SASAI, K. et al., 2004).

As quinases Aurora A e Aurora B são expressas especialmente em tecidos que apresentam altas taxas de proliferação celular. Os níveis de expressão destas quinases alcançam seus valores mínimos durante a fase G1/S do ciclo celular, e máximos durante a fase G2/M, sugerindo um possível papel no contexto da divisão celular para ambas as Auroras. De fato, a progressão do ciclo celular é estritamente regulada pelas quinases Aurora

A e Aurora B, tanto por fosforilação, quanto por interações proteína-proteína com fatores mitóticos (**GOTO, H. et al., 2002; HAUF, S. et al., 2003**).

A Aurora C é uma quinase tecido-específica, sendo expressa somente em testículos humanos, onde participa da espermatogênese (**BERNARD, M. et al., 1998; TSENG, T. C. et al., 1998**). Embora esta quinase possa se apresentar expressa em tumores (**TSOU, J. H. et al., 2011**), não existe relato de expressão de AURKC em tumores pulmonares induzidos por KRAS. Desta forma, essa quinase não foi incluída nos nossos estudos.

1.3.1. Estrutura e Localização Celular

As quinases Aurora contêm dois domínios estruturais principais, um domínio regulatório na extremidade amino-terminal, bastante variável entre todas as quinases Aurora, e um domínio catalítico na extremidade carboxiterminal, conservado. As quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C compartilham cerca de 60% de homologia ao longo de toda a sua sequência de aminoácidos e 70% de homologia em sua região carboxiterminal. Essas proteínas são ativadas pela fosforilação de um resíduo de treonina fundamental à sua atividade catalítica e são inativadas, sobretudo, por degradação por outras proteínas que reconhecem sítios específicos das quinases Aurora, denominados A-box e D-box (**FIGURA 1.13**) (**NGUYEN, H. G. et al., 2005 ; CASTRO, A. et al., 2002 ; CRANE, R. et al., 2004**).

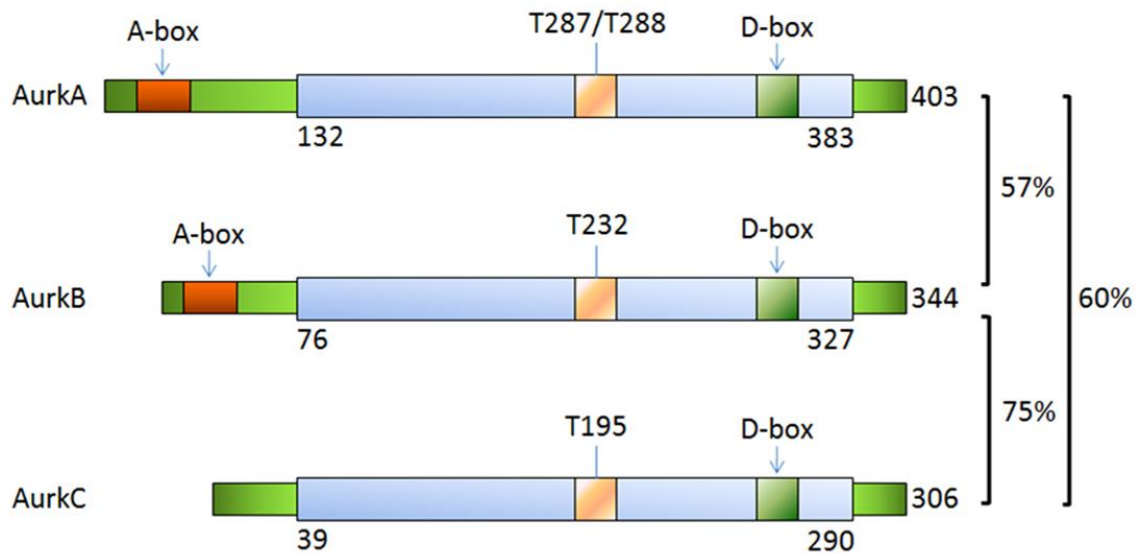


FIGURA 1.13. Estrutura das quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C. As quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C compartilham cerca de 60% de homologia em sua estrutura primária. Essa similaridade pode ser maior ou menor dependendo do alinhamento feito com os membros da família. De qualquer forma, os três membros da família apresentam domínios bem conservados. Essas regiões podem estar relacionadas à atividade das Auroras (como o domínio contendo uma treonina que ao ser fosforilada aumenta a atividade dessas enzimas) ou relacionados ao reconhecimento dessas proteínas pelo proteassomo e posterior degradação (A-box e D-box). **Adaptado de: JIANGYAN, F. et al., 2007.**

Assim como outras proteínas da classe das serina-treonina quinases, as quinases Aurora contêm dois lobos em seu domínio catalítico unidos por uma espécie de dobradiça. O lobo N é responsável por posicionar o ATP através de uma hélice αC , enquanto o lobo C contém um loop de ativação (*A-loop*) que é capaz de se ligar a substratos para as quinases Aurora (BAYLISS, R. et al., 2003). Somente quando os dois lobos chegam a uma determinada conformação, as quinases Aurora são capazes de desempenhar suas funções (Figura 1.14A) (CHEETHAM, G. M. et al., 2002). O ATP é utilizado como fonte de energia e doador de grupamentos fosfato para as reações catalisadas pelas quinases Aurora e inúmeros resíduos de aminoácidos no sítio de reconhecimento ao ATP estão envolvidos nessa função (Figura 1.14B) (SESSA, F. et al., 2005).

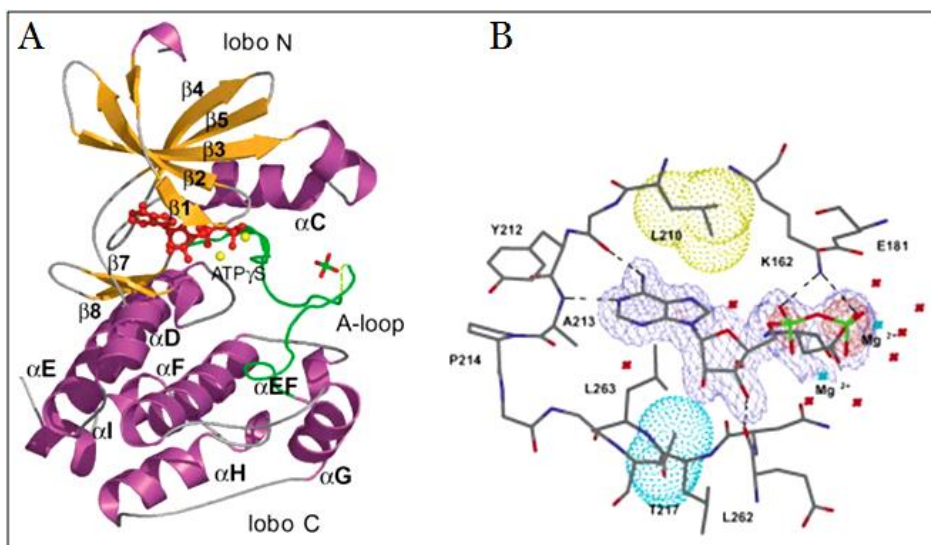


Figura 1.14. Estrutura dos domínios de quinase e sítio de ligação ao ATP da Aurora A. (A) Estrutura dos domínios de quinase orientados para mostrar as posições relativas dos lobos C- e N-terminais (α -hélices, púrpura; folhas- β , laranja; loop de ativação - A loop, verde; íons Mg^{2+} , esferas amarelas; grupamentos fosfato ligados, verde e vermelho). (B) Diagrama dos sítios de ligação ao ATP na quinase Aurora A, mostrando nove aminoácidos fundamentais para o reconhecimento e ligação ao ATP, lisina 162, glutamato 181, leucina 210, tirosina 212, alanina 213, prolina 214, treonina 217, leucina 262 e leucina 263 (átomos de C, cinza; O, vermelho; N, azul; P, verde; Mg^{2+} , cruces azuis; H_2O , cruces vermelhas). **Adaptado de: NOWAKOWSKI, J. et al., 2002.**

Apesar da grande similaridade estrutural, as quinases Aurora são completamente diferentes quanto à suas funções e localizações subcelulares. Durante a mitose as quinases Aurora A e Aurora B compartimentalizam-se distintamente (YANG, H. et al., 2006; BOLTON, M. A. et al., 2002). A análise da localização subcelular das quinases Aurora A e B por microscopia de imunofluorescência (Figura 1.15) pode ser relacionada às suas funções na mitose.

Durante toda a interfase, até o final da fase G2 do ciclo celular, a quinase Aurora A se localiza no material pericentriolar, onde participa da maturação, duplicação e separação dos centrossomos (HIROTA, T. et al., 2003). Esse fato é corroborado por estudos *in vitro* que mostram que a interferência de RNA para a quinase Aurora A é capaz de inibir a separação dos centrossomos (MARUMOTO, T. et al., 2003). À medida que o ciclo prossegue, a Aurora A migra para polos opostos da célula, onde participa da formação do fuso mitótico,

sendo ativada indiretamente pela GTPase Ran via TPX2 (CLARKE, P. R. et al., 2001; BAYLISS, R. et al., 2003).

Por outro lado, a quinase Aurora B encontra-se dispersa no material nuclear durante a interfase. Quando a célula entra em mitose, a Aurora B permanece na região central do núcleo, da prometáfase até a metáfase, onde participa da remodelagem da cromatina por meio da fosforilação da histona H3 em Ser10 e Ser28 (HSU, J. Y. et al., 2000; GOTO, H. et al., 2002), bem como CENP-A em Ser7 (ZEITLIN, S. G. et al., 2001).

Junto à placa metafásica, participa da ligação dos microtúbulos do fuso aos cinetócoros nos centrômeros, desempenhando, assim, um papel fundamental na correta segregação das cromátides-irmãs na anáfase da mitose (LARA-GONZALEZ, P. et al., 2012). A importância da Aurora B para este processo é tal que sua inibição é capaz de aumentar significativamente a frequência de ligações incorretas dos microtúbulos levando à instabilidade cromossômica (DITCHFIELD, C. et al., 2003).

Já no final da mitose a Aurora B se localiza no *midbody* celular, onde, juntamente com diversas outras proteínas, participa da citocinese. Esse fato é corroborado por estudos que mostram que a inibição da Aurora B pode induzir poliploidia em alguns modelos celulares (GIET, R. et al., 2001).

O mecanismo pelo qual a Aurora B participa da fragmentação do citoplasma não é muito bem compreendido, mas sabe-se que diversas proteínas envolvidas nesse processo são substratos ativados pela Aurora B, tais como desmina e vimentina, ZEN-4/MKLP1 e outras proteínas como TACC1 e MgcRacGAP (KAWAJIRI, A. et al., 2003; GOTO, H. et al., 2003; GUSE, A. et al., 2005; DELAVAL, B. et al., 2004; MINOSHIMA, Y. et al., 2003).

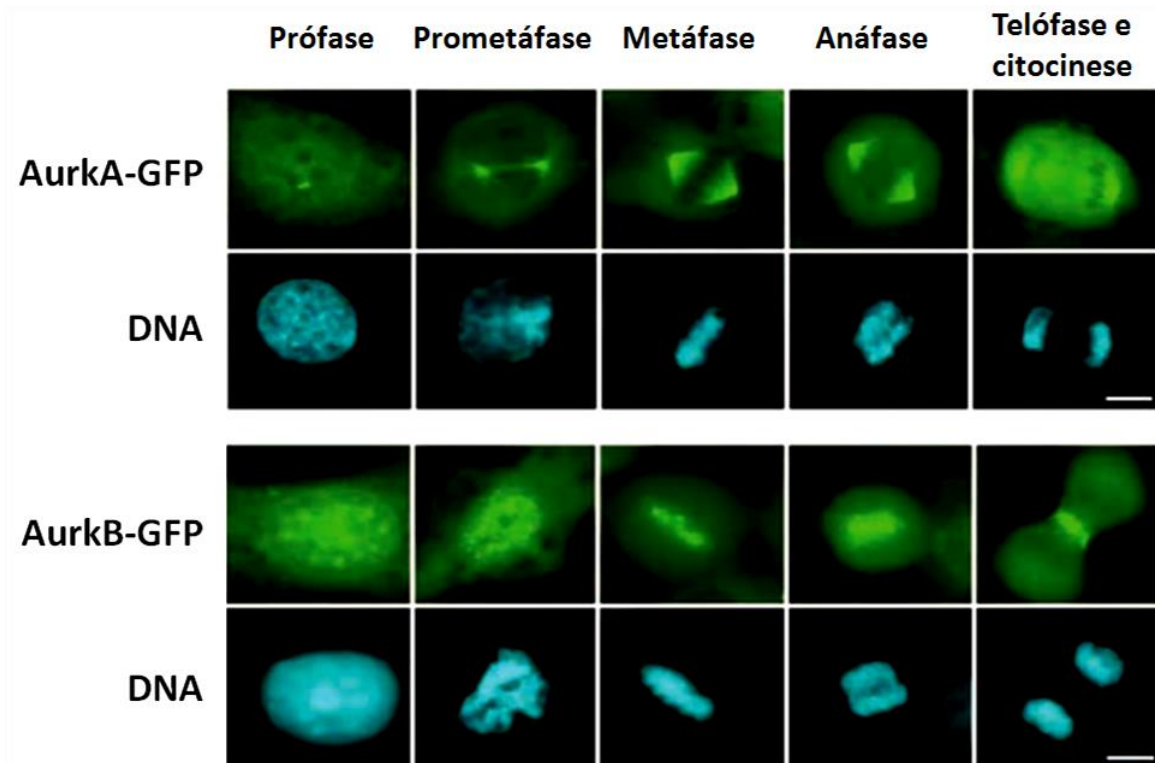


Figura 1.15. Microscopia de fluorescência pra as quinases Aurora A e Aurora B durante as várias fases da mitose. O DNA total está representado em azul e as quinases Aurora A e Aurora B, em verde. A prófase é um evento marcado pela maturação e separação dos centrosomos além da permissibilidade da entrada em mitose, eventos esses mediados pela Aurora A, que se localiza junto aos centríolos. Nesse mesmo momento, a Aurora B se encontra no núcleo participando da remodelação da cromatina e fosforilação de histonas. Durante a prometáfase e metáfase a Aurora A migra para polos opostos da célula participando da formação do fuso mitótico, enquanto que a Aurora B permanece junto aos centrômeros, promovendo a correção dos erros de ligação dos microtúbulos. A entrada em anáfase é precedida do checkpoint do fuso, evento no qual a quinase Aurora B tem fundamental importância, verificando a existência de cinetócoros não ligados aos microtúbulos e regulação da atividade de proteínas de checagem. No início da citocinese a Aurora A começa a sofrer regulação negativa, por meio de sua degradação por APC/C_{Cdk1}. A quinase Aurora B, entretanto ainda atua neste momento promovendo a correta fragmentação do citoplasma e desfazendo o fuso mitótico. Somente no final da citocinese as APC/C_{Cdk1} começam a degradar a Aurora B. **Adaptado de: JINGYAN, F. et al., 2013.**

1.3.2. Quinases Aurora e Câncer

As quinases Aurora são uma família de serina/treonina quinases, fundamentais para o controle do ciclo celular. Elas estão relacionadas à regulação de processos fundamentais para a divisão celular, tais como a montagem do fuso mitótico, separação dos centrosomos, transição entre as fases G2 e M do ciclo celular, modificação da cromatina, separação das

cromátides e citocinese (FU, J. et al, 2007; KIRUMA, M. et al., 2005; CRANE, R., 2004; KATAYAMA, H. et al., 2003).

Desta forma, não é surpreendente que alterações na expressão ou atividade dessas quinases possam ser correlacionadas à transformação maligna. Interessantemente, as quinases Aurora A e B estão superexpressas em uma variedade de tumores humanos (CHIEFFI, P. et al., 2006; GRITSKO, T. M. et al., 2003; LANDEN, C. N. et al., 2007; LI, D. et al., 2003 ; SORRENTINO, R. et al., 2005 ; ZENG, W. F. et al., 2007), incluindo tumores pulmonares (SMITH, S. L. et al., 2005; VISCHIONI, B. et al., 2006 ; XU, H. T. et al., 2006). Em muitos tecidos a superexpressão das quinases Aurora pode levar à instabilidade genética e essa observação tem servido de base para a classificação dessas quinases como oncoproteínas. A aneuploidia e a poliploidia são eventos que comumente ocorrem após erros da duplicação e separação dos centrossomos, orientação cromossômica bipolar e citocinese, eventos nos quais as quinases Aurora apresentam papéis regulatórios cruciais (KOLLAREDDY, 2008).

A quinase Aurora A foi inicialmente chamada de BTAK (do inglês, *breast tumor activated kinase*, ou quinase ativada de tumores mamários) após a observação de que uma serina-treonina quinase codificada por um gene do cromossomo 20q13 era amplificada e superexpressa em linhagens celulares derivada de tumores de mama (SEN, S. et al., 1997). Desde então, mutações nos genes que codificam a quinase Aurora A, bem como sua regulação positiva são evidenciadas em uma grande variedade de tumores, dentre os quais, o câncer de pulmão (NIKONOVA, A. S. et al., 2012).

Além disso, diversas propriedades tumorigênicas são exibidas pelas células que apresentam quinases Aurora superexpressas. A superexpressão da Aurora A em glândulas mamárias de rato contribui para o desenvolvimento de tumores (WANG, X. et al, 2006; ZHANG, D. et al, 2004). Experimentos *in vitro* mostram que a aurora A pode transformar

células NIH 3T3 e fibroblastos Rat1 (ZHOU, H. et al., 1998; BISCHOFF, J. R., 1998; LITTLEPAGE, L. E., 2002). Quando essas células são injetadas em camundongos “nude”, elas se desenvolvem em tumores (ZHANG, D. et al., 2004). Além disso, a quinase Aurora A promove mobilidade celular inapropriada, o que pode acarretar em invasão e metástase de células tumorais (NORTON, L.; MASSAGUE, J., 2006). Finalmente, estudos de correlação entre a expressão da Aurora A e o fenótipo maligno de diversas linhagens celulares mostraram que essa quinase apresenta-se até oito vezes mais expressa em linhagens tumorais do que células normais (ZHOU, H. et al., 1998).

A quinase Aurora B também desempenha um importante papel na oncogênese humana. Tanto a superexpressão quando a depleção gênica de Aurora B resulta em multinucleação e poliploidia em células humanas (ARAKI, K. et al., 2004; TATSUKA, M. et al., 1998), além de levar à amplificação dos centrossomos, promover erros na segregação dos cromossomos e citocinese (MERALDI, P. et al., 2002). Além disso, a superexpressão de Aurora B em células embrionárias de hamster chinês aumenta a capacidade invasiva *in vivo* (OTA, T. et al., 2002).

Tanto a quinase Aurora A, quanto a quinase Aurora B desempenham um papel importante no câncer de pulmão. A Aurora B está envolvida na carcinogênese pulmonar (HAYAMA, S. et al., 2007) e sua inibição bloqueia o crescimento de tumores pulmonares humanos em modelos xenográficos (WILKINSON, R. W. et al., 2007). No que se refere à Aurora A, pacientes portadores de câncer de pulmão frequentemente apresentam amplificação de TPX2, um ativador importante da Aurora A (TONON, G. et al., 2005; MA, Y. et al., 2006). A deleção de FoxM1, um regulador da Aurora A, em pulmões murinos resulta em uma redução significativa do número e tamanho de adenomas pulmonares (KIM, I. M. et al., 2006).

1.3.3. Quinases Aurora e KRAS

Existem algumas evidências que implicam as quinases Aurora A e Aurora B na oncogênese e manutenção do fenótipo maligno mediados por RAS.

No caso da quinase Aurora A, quando células de adenocarcinoma do ducto pancreático possuindo mutações em *KRAS* são estimuladas para a superexpressão de Aurora A, essas células aumentam grandemente suas propriedades tumorigênicas, sugerindo um papel importante na manutenção do fenótipo maligno induzido por RAS (FURUKAWA, T. et al., 2006). A Aurora A também aumenta a capacidade de RAS em transformar fibroblastos murinos (BOSSÙ, P. et al., 2000). Além disso, outros estudos mostram que a quinase Aurora A é capaz de ativar o NF- κ B (BRIASSOULI, P. et al., 2007), um fator de transcrição ativado por KRAS e que potencializa a transformação maligna pulmonar induzida por KRAS (BASSÈRES, D. S. et al., 2010). Finalmente, a AURKA interage com RASGAP *in vitro* e é capaz de fosforilar e ativar a GTPase Ral A, um componente da via Ral GEF, uma das vias efetoras da KRAS e fundamental para o processo oncogênico (TATSUKA, M. et al., 2005).

Apesar destas evidências, não se sabe ainda se a ativação destes efetores de KRAS pela quinase Aurora A é um processo que requer a sua ativação por KRAS oncogênica ou se esse é um processo independente que converge para as vias de sinalização de RAS. Por exemplo, não se sabe se a ativação de RalA pela quinase Aurora A depende de uma prévia ativação da quinase Aurora A por KRAS, ou se a ativação da Aurora A constitui um evento independente de KRAS, que meramente coopera aumentando o nível de RalA ativada (Figura 1.16).

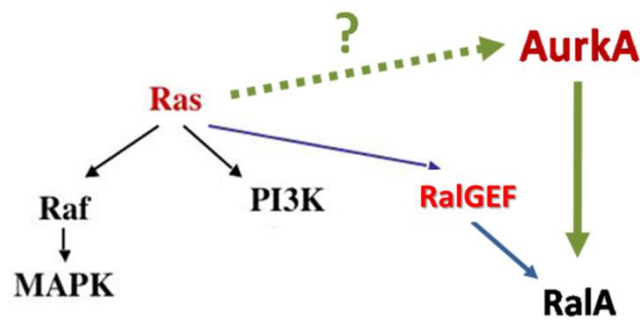


Figura 1.16. Representação esquemática de um possível papel para a Aurora A na oncogênese mediada por KRAS. Sabe-se que a Aurora A fosforila, ativa e relocaliza RalA, um efetor da via de RalGDS, que é também ativado por RAS, e que a ativação de RalA é fundamental para a oncogênese mediada por RAS. Entretanto, não se sabe se a ativação de Ral A pela Aurora A é mediado por RAS ou um processo independente que converge para as vias de sinalização de RAS.

No caso da quinase Aurora B, existem menores evidências que implicam esta quinase na oncogênese mediada por KRAS. No entanto, **KANDA, A. et al., 2005** demonstraram que a Aurora B é capaz de potencializar a transformação celular mediada por KRAS, sugerindo que a atividade aumentada da Aurora B promove transformação pelo oncogene RAS por aumentar a sinalização oncogênica, além de induzir instabilidade genética.

Diante de todas essas observações, as quinases Aurora A e Aurora B parecem estar envolvidas na oncogênese mediada por KRAS. Entretanto, até hoje nenhum estudo mostrou uma relação de causalidade entre quinases Aurora e KRAS na oncogênese pulmonar, não sendo conhecido se essas quinases são, de fato, efetores da atividade de KRAS oncogênica. Não se sabe também se a inibição da atividade destas quinases poderia constituir uma abordagem terapêutica efetiva para tumores pulmonares induzidos pela ativação oncogênica de KRAS.

Nesse sentido nós propomos neste trabalho a investigação das quinases Aurora A e B como possíveis alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido por KRAS, de modo a fornecer as bases teóricas para o desenvolvimento de novas terapias dirigidas a pacientes portadores de câncer de pulmão.

A importância deste estudo está na sua contribuição para um entendimento mais amplo de como as vias de sinalização relacionadas à KRAS oncogênica desencadeiam a transformação maligna, podendo assim ser abordadas para o tratamento do câncer. Além disso, tendo em vista a falta de opções terapêuticas efetivas para os pacientes com câncer de pulmão mediado pelo oncogene KRAS, este projeto também buscou a obtenção do conhecimento necessário para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, com o objetivo de melhorar o prognóstico destes pacientes.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é investigar o papel das quinases Aurora A e Aurora B como potenciais novos alvos terapêuticos na oncogênese pulmonar induzida pela KRAS oncogênica, visando prover fundamentação experimental para o desenvolvimento de novas terapias-alvo.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir este objetivo geral nós perseguiremos os seguintes objetivos específicos:

a) Determinar como a indução e inibição da expressão da KRAS oncogênica em células pulmonares humanas afetam a expressão e atividade das quinases Aurora A e Aurora B.

b) Determinar como a inibição da expressão das quinases Aurora A ou Aurora B afeta as propriedades oncogênicas de células pulmonares humanas transformadas pelo oncogene KRAS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

Para os ensaios de expressão gênica e ensaios biológicos de crescimento, viabilidade e tumorigenicidade *in vitro* foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

a) linhagem celular de epitélio renal, designada HEK 293T/17 (ATCC CRL-11268), manipulada para produção de partículas lentivirais de interesse;

b) linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano portadora de mutação oncogênica em *KRAS*, designada A549 (ATCC CCL-185), manipulada ou não para inibição de genes de interesse;

c) linhagem celular de carcinoma bronquioalveolar pulmonar humano portadora de mutação oncogênica em *KRAS*, designada H358 (ATCC CRL-5807), manipulada ou não para inibição de genes de interesse;

d) linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano, designada H1703 (ATCC CRL-5889), que não é portadora de mutações oncogênicas em *KRAS*, manipuladas ou não para expressar induzivelmente a *KRAS* oncogênica (já disponíveis no laboratório). Resumidamente, a expressão induzível da *KRAS* oncogênica em células H1703 (que não possuem o gene *KRAS* mutado) foi obtida por meio do sistema induzível de expressão *T-REx™ System* (Invitrogen®). Células H1703 duplamente estáveis foram geradas através de transfeções com dois vetores: o vetor regulatório pcDNA6/TR que expressa altos níveis do repressor TetR sob o controle do promotor CMV e o vetor pcDNATM/4/TO/myc-His contendo o gene de interesse, no caso a forma oncogênica G12V da *KRAS* fusionada a um *tag* HA. A expressão, neste caso, é controlada por uma versão modificada do promotor CMV,

na qual duas cópias do operador tet (TetO2) foram inseridas *in tandem*. Portanto, na ausência de tetraciclina ou doxiciclina, o repressor TetR está ligado aos operadores tet e a expressão da KRAS oncogênica é inibida. Na presença de tetraciclina ou doxiciclina o repressor TetR se desliga dos operadores e a expressão da KRAS oncogênica é induzida. Células H1703 transfectadas com a forma oncogênica da KRAS G12V foram posteriormente denominadas H1703 G12V. Como controle negativo foram geradas células H1703 duplamente estáveis para os vetores pcDNA6/TR e pcDNATM/4/TO/myc-His vazio. Essas células foram posteriormente denominadas H1703 T-RexB.

e) linhagem primária imortalizada derivada de epitélio pulmonar, manipuladas ou não para expressar KRAS oncogênica de forma constitutiva. Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Scott Randell da University of North Carolina at Chapel Hill e já foram previamente caracterizadas (LUNDBERG, S. A. et al, 2002). De forma resumida, uma cultura primária derivada de epitélio pulmonar normal foi imortalizada diretamente por meio da introdução sucessiva de *Simian Virus 40 Early Region* e da subunidade catalítica da telomerase, *hTERT*, sendo denominada *Saleb*. Concomitantemente à imortalização, essas células foram também malignamente transformadas para expressar a forma oncogênica da KRAS G12V, sendo denominadas *Sakras*. Portanto, estas são linhagens geneticamente definidas e isogênicas, sendo a única diferença entre elas a presença ou não da oncoproteína KRAS^{G12V}.

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

A linhagem HEK 293T/17 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, sem antibióticos, em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

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 à temperatura de 37°C.

Após a utilização das células A549 e H358 para a obtenção de células *knockdown* (ver procedimento 6.12-6.18), o cultivo passou a ser feito em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2µg/mL de puromicina, em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

A linhagem celular H1703, manipulada geneticamente e expressando induzivelmente a KRAS oncogênica, foi cultivada em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 3µg/mL de blasticidina e 10µg/mL de zeocina, em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

As células primárias imortalizadas Saleb e Sakras foram cultivadas em meio BEBM (Lonza, Catalog No. CC-3171), específico para a cultura de células de epitélio bronquiolar, suplementado com SingleQuots™ Kit (Lonza, Catalog No. CC-4124), de acordo com as instruções do fabricante, em placas previamente tratadas com colágeno, de modo a permitir a adesão das células em monocamada à placa de cultura, e em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

Para todas as linhagens, 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 são 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. Extração e quantificação de RNA

Para todos os ensaios que envolveram a extração de RNA de células previamente tratadas de acordo com o modelo experimental adotado, as células foram plaqueadas em placas cultura de 60mm à confluência de 1.10^6 células por placa e mantidas em cultura pelo tempo de tratamento adequados. Findo o tratamento, o meio de cultura foi removido e a placa foi lavada com solução de PBS, sem adição de cátions divalentes, por duas vezes. A seguir, a cada placa foram adicionados 1000 μ L de TRI Reagent® (*Life Technologies*, Cat. # AM9738). Após homogeneização, as placas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e, a seguir, os lisados celulares obtidos foram centrifugados à velocidade de 12000g por 10 minutos à temperatura de 4°C. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. Cada tubo foi mantido à temperatura ambiente por 15 minutos, e, a seguir, foram centrifugados à velocidade de 12000g por 10 minutos à temperatura de 4°C. Após a obtenção de uma suspensão trifásica, coletou-se a fase que continha RNA em suspensão e adicionou-se 500 μ L de isopropanol, com o objetivo de precipitar o RNA do restante da suspensão. A seguir, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados à velocidade de 12000g por 8 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1mL de uma solução de etanol 75% e centrifugado à velocidade de 7500g por 5 minutos à temperatura de 4°C. O etanol foi, então, removido e o precipitado de RNA foi deixado secar brevemente à temperatura ambiente. A dissolução do RNA foi feita em água ultrapura (*Millipore, MilliQ System*) e a concentração da solução foi determinada por meio de sua absorbância a 260nm em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*). Como controle de qualidade da extração, foram aceitáveis os valores de concentração de RNA acima de 1000ng. μ L⁻¹ e razões 260/280 e 260/230 com valores próximos a 2 e entre 2,0 e 2,2, respectivamente.

3.4. 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 µg de amostra de RNA, 1µL 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 10µL de reação. Cada tubo foi incubado à temperatura de 37°C por 30 minutos. A seguir, foi adicionado 1µL de uma solução de EDTA 50mM e cada tudo foi novamente incubado, à temperatura de 65°C por 10 minutos. As amostras de RNA, livres de DNA, foram então usadas como molde para a síntese de cDNA. A enzima M-MLV (*Promega, Cat. # M170A*) foi escolhida como transcriptase reversa para a síntese de cDNA a partir de amostras de RNA, obtidas como descrito anteriormente. Para cada síntese, foram utilizados 0,5µg de *random primers* para cada 1µg de RNA, em um volume final de 14µL, em água *MilliQ*, livre de nucleases. Os tubos foram aquecidos à temperatura de 70°C por 5 minutos, para romper a estrutura secundária do RNA, e resfriados imediatamente em gelo para prevenir a reestruturação da mesma. A seguir, a cada tubo contendo o híbrido RNA/primer foram adicionados os reagentes que se seguem, em ordem:

| |
|--|
| M-MLV 5X Reaction Buffer - 5µL |
| dNTPs 10mM - 5µL |
| M-MLV RT - 200 unidades (1µL) |
| <hr/> |
| H2O MilliQ, livre de nucleases q.s.p. - 25µL |

Cada tubo foi, posteriormente, incubado à temperatura de 42°C por 50 minutos, condição que permite máxima atividade da enzima M-MLV, seguido de inativação à temperatura de 70°C por 10 a 15 minutos.

3.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador ABI 7300 (ABI), com *primers* específicos para os genes *KRAS*, *AURKA* e *AURKB*. Cada par de *primers* foi desenhado com auxílio do programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems), a partir das sequências de mRNA de cada gene, obtidas por meio do algoritmo BLAST (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), levando-se em consideração as regiões conservadas nos éxons consecutivos de todas as variantes de cada gene (ver tabela abaixo). A predição da especificidade de cada *primer* foi feita a partir da ferramenta de bioinformática BLAT Search Genome (disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). A Tabela 3.1. mostra as sequências de *primer forward* e *reverse* desenhados para cada gene estudado e genes utilizados como controles endógenos.

| Gene alvo | Primers |
|-----------------------------------|---|
| Quinase Aurora A (<i>AURKA</i>) | Seq _{Fw} : GAAAGCCGGAGTGGAGCAT Seq _{Rv} : TGCCGAAGGTGGGACTGTAT |
| Quinase Aurora B (<i>AURKB</i>) | Seq _{Fw} : TGTCACCCCATCTGCACTTG Seq _{Rv} : CAGCTGTGGGCTGGACATT |
| <i>KRAS</i> | Seq _{Fw} : CCCAGGTGCGGGAGAGA Seq _{Rv} : CAGCTCCAACCTACCACAAGTTT |
| <i>GAPDH</i> | Seq _{Fw} : GAGCCGCATCTTCTTTTGC Seq _{Rv} : CCATGGTGTCTGAGCGATGT |
| <i>GUSB</i> | Seq _{Fw} : CTCATTTGGAATTTTGCCGATT Seq _{Rv} : CCGAGTGAAGATCCCCTTTTT |
| β -actina | Seq _{Fw} : GGCACCCAGCACAATGAAG Seq _{Rv} : CCGATCCACACGGGAGTACTTG |

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

O sistema de detecção utilizado foi a fluorescência emitida por SYBRGreen[®] e a análise dos dados foi feita a partir do método do $\Delta\Delta C_t$, utilizando-se os cálculos abaixo.

$$RQ = (Ef + 1)^{-[(Ct_{alvo}-Ct_{end})_{teste}-(Ct_{alvo}-Ct_{end})_{ref}]}$$

$$DP_{comb} = \sqrt{Ct_{alvo}^2 + Ct_{end}^2}$$

$$Desvio_{min} = RQ - (Ef + 1)^{-\{[(Ct_{alvo}-Ct_{end})_{teste}-(Ct_{alvo}-Ct_{end})_{ref}]+DP_{comb}\}}$$

$$Desvio_{max} = (Ef + 1)^{-\{[(Ct_{alvo}-Ct_{end})_{teste}-(Ct_{alvo}-Ct_{end})_{ref}]-DP_{comb}\}} - RQ$$

onde:

RQ = *relative quantification* (expressão do gene alvo em relação ao *housekeeping*);

Ef = eficiência determinada para o par de primers;

Ct_{alvo} = Ct do gene alvo;

Ct_{end} = Ct do controle endógeno;

DP_{comb} = propagação de erro;

$Desvio_{min}$ = desvio mínimo para RQ; e

$Desvio_{max}$ = desvio máximo para RQ.

3.6. Determinação da concentração e eficiência de primers

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 800nM. A concentração utilizada foi a menor concentração que apresentou curva de dissociação com somente um pico e não apresentou variação do ciclo *threshold* quando comparado às maiores concentrações analisadas. Para determinação da eficiência de cada par de *primers*, 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 *threshold* 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:

$$Ef = 10^{\left(\frac{-1}{\alpha}\right)}$$

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

Para os valores de eficiência de cada par de *primers* utilizado, ver item 4.1. *Caracterização de reagentes e padronização de ensaios.*

3.7. Normalização do RT-qPCR

Para normalização das reações de RT-qPCR e escolha dos genes endógenos mais estáveis para cada amostra, foram utilizados *primers* específicos para diversos genes *housekeeping*, tais como *GAPDH*, β -actina e *GUSB*. A expressão relativa desses genes em cada amostra foi utilizada para determinar qual o conjunto de genes endógenos mais estável, de acordo com as instruções do programa Genorm®. Desse modo, para cada condição analisada, nós elegemos dois genes endógenos mais estáveis dentre os testados, que foram utilizados para a normalização das RT-qPCR. Desse modo, para cada condição nós utilizamos um dos dois genes endógenos mais estáveis testados.

Para o conjunto de *primers housekeeping* utilizado em cada linhagem e experimento, ver item 4.1. *Caracterização de reagentes e padronização de ensaios.*

3.8. Extração e quantificação de proteínas

Para a obtenção de extrato proteico, as linhagens celulares foram cultivadas em placas p150mm e, após tratamento, lisadas com 500µL de solução RIPA, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM, benzamidina 1mM, leupeptina 0,5µg/mL, aprotinina 0, µg/mL, pepstatina 1mg/mL, fluoreto de sódio 50mM e ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 0,2mM. Os lisados obtidos foram mantidos à temperatura de 4°C por 10 minutos e vortexados vigorosamente por 15 segundos. Esse procedimento foi repetido por outras 2 vezes. Por fim, o lisado foi clarificado por centrifugação à 15000rpm, por 20 minutos à temperatura de 4°C. As amostras foram quantificadas utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad), em comprimento de onda de 595nm, em leitor de microplacas (Eon, Biotek).

3.9. Western blotting

As amostras de proteína, devidamente quantificadas e preparadas com tampão de amostra, foram fervidas por 10 minutos e submetidas a SDS-PAGE. Os géis foram construídos com concentração de poliacrilamida entre 10 e 15%, de acordo com as proteínas estudadas em cada experimento individual, e aplicados exatamente 50µg de proteína para todas as amostras analisadas. Simultaneamente, foi utilizado um padrão de peso molecular de modo a permitir a identificação posterior das bandas identificadas, de acordo com o seu peso molecular. A corrida foi realizada a 85V, por aproximadamente 8 minutos, durante a corrida no gel de empilhamento, e a 125V, por aproximadamente 60 a 80 minutos, durante a corrida no gel de separação. Após a corrida, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell BA85) por meio de eletrotransferência tradicional a 30V *overnight*, ou 120V por 80 minutos, ambos à temperatura de 4°C. A eficiência da

transferência foi monitorada corando-se o gel de poliacrilamida com *Coomassie*. Similarmente, as membranas de nitrocelulose foram coradas com corante *Ponceau S* 0,1% em 10% de ácido acético e rapidamente descoradas em solução de TBST (NaCl 137 mM; Tris-base 20 mM; Tween-20 0,1%, pH 7,6). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário foram bloqueados incubando-se a membrana de nitrocelulose em solução contendo 5% de leite em pó desnatado em TBST, durante 1h à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3X com TBST, durante 5 minutos sob leve agitação. Posteriormente, as membranas foram incubadas em uma solução contendo o anticorpo primário em diluição apropriada, azida sódica 0,1% e soro albumina bovina (BSA) 5% em solução TBST. Os anticorpos primários utilizados e suas respectivas condições de incubação encontram-se na **Tabela 3.2**.

| Anticorpo primário | Descrição do fornecedor | Condições de incubação |
|------------------------------------|--|---------------------------------|
| AURKA | Aurora A/AIK (1G4) Rabbit mAb #4718, Cell Signaling Technology® | 1:1000, <i>overnight</i> , 4°C. |
| AURKB | Aurora B/AIM1 Rabbit Antibody #3094, Cell Signaling Technology® | 1:1000, <i>overnight</i> , 4°C. |
| GAPDH | GAPDH Anticorps (FL-335) Rabbit mAb #25778, Santa Cruz Biotechnology® | 1:2000, 2h, Temp. ambiente |
| HA-tag | Monoclonal Anti-HA clone HA-7 Mouse mAb #H3663, Sigma-Aldrich® | 1:1000, <i>overnight</i> , 4°C. |
| PanRAS | Monoclonal Anti-Pan-Ras Val-12 Clone DWP Mouse mAb # R3900, Sigma-Aldrich® | 1:1000, <i>overnight</i> , 4°C. |
| pSRC | Phospho-Src Family (Tyr416) Antibody #2101, Cell Signaling Technology® | 1:1000, <i>overnight</i> , 4°C. |
| SRC | Non-phospho-Src (Tyr416) (7G9) Mouse mAb #2102, Cell Signaling Technology® | 1:1000, <i>overnight</i> , 4°C. |
| β-actina | Actin Antibody (H-196) Rabbit mAb #7210, Santa Cruz Biotechnology® | 1:2000, 2h, Temp. ambiente |
| β-tubulina | B-Tubulin Antibody (H-235) Rabbit mAb #9104, Santa Cruz Biotechnology® | 1:2000, 2h, Temp. ambiente |

Tabela 3.2. Anticorpos primários utilizados e suas condições ótimas de incubação nos ensaios de *Western blotting*.

Para reduzir um possível background resultante da presença de traços de anticorpo não ligado à proteína de interesse, as membranas foram lavadas novamente por 3X com TBST, durante 5 minutos e sob leve agitação. Os anticorpos secundários anti-IgG de coelho (*anti-rabbit*) ou de camundongo (*anti-mouse*) conjugado com o fluoróforo *Alexa Fluor*[®] ou *IRDye*[®] foram adicionados à membrana numa diluição 1:15.000, seguindo-se um tempo de incubação de 1h à temperatura ambiente, sob leve agitação e sob proteção da ação direta da luz. Novamente, para reduzir um possível background resultante da presença de traços de anticorpo secundário não ligado, as membranas foram lavadas novamente por 3X com TBST, durante 5 minutos sob leve agitação. O escaneamento da membrana foi feito em equipamento Odyssey[®], em comprimento de onda de 680nm ou 800nm, específico para o anticorpo secundário utilizado. Os anticorpos secundários conjugados ao fluoróforo *Alexa Fluor*[®] ou *IRDye*[®] encontram-se na **Tabela 3.3**.

| Anticorpo secundário | Descrição do fornecedor | Condições de incubação |
|----------------------|---|--|
| Anti-Rabbit | Alexa Fluor [®] 680 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), highly cross-adsorbed #A-21109 Life Technologies [®] | 1:15000, 1h, temperatura ambiente, sob proteção da luz |
| Anti-Mouse | Alexa Fluor [®] 680 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed #A-21058 Life Technologies [®] | 1:15000, 1h, temperatura ambiente, sob proteção da luz |
| Anti-Rabbit | IRDye [®] 800CW Goat (polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L), Highly Cross Adsorbed #926-32211, Li-Cor [®] | 1:15000, 1h, temperatura ambiente, sob proteção da luz |
| Anti-Mouse | IRDye [®] 800CW Goat (polyclonal) Anti-Mouse IgG (H+L), Highly Cross Adsorbed #926-32210, Li-Cor [®] | 1:15000, 1h, temperatura ambiente, sob proteção da luz |

Tabela 3.3. Anticorpos secundários utilizados e suas condições ótimas de incubação nos ensaios de *western blotting*.

As bandas reveladas em cada membrana foram quantificadas com o auxílio do programa ImageJ®, disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>, e os dados analisados no programa Excel. As normalizações foram feitas conforme indicado em cada experimento.

3.10. Produção de lentivírus com as construções de interesse

Com o objetivo de promover o silenciamento dos mRNAs de interesse (quinase Aurora A, quinase Aurora B e KRAS) foram feitas duas preparações lentivirais contendo sequências distintas de *short hairpin RNAs* (shRNAs) para cada mRNA alvo. As preparações lentivirais foram assim denominadas: shKRAS#1, shKRAS#2, shAURKA#1, shAURKA#2, shAURKB#1, shAURKB#2. Para obtenção de controles experimentais posteriores, foi gerada outra preparação lentiviral contendo um shRNA sem homologia a mRNAs humanos, denominada shNTCtrl. Os vetores lentivirais já contendo as sequências de expressão dos shRNAs de interesse foram obtidos da *OpenByosystems*. O vetor utilizado em todas as construções é denominado pTRIPz (**Figura 3.1**) que, além da sequência codificadora do *hairpin* de interesse, possui um gene para expressão de proteína fluorescente vermelha, turbo-RFP (*red fluorescent protein*), sendo que ambos estão sob o controle de um promotor regulado por doxiciclina (TRE). Na ausência de doxiciclina a expressão do *hairpin* e da RFP não ocorre, pois esta depende da interação da proteína regulatória “*reverse tetracycline transactivator 3*” (rtTA3, expressa no mesmo vetor a partir de um promotor constitutivo – UBC) com o promotor TRE, o que só ocorre na presença de doxiciclina.

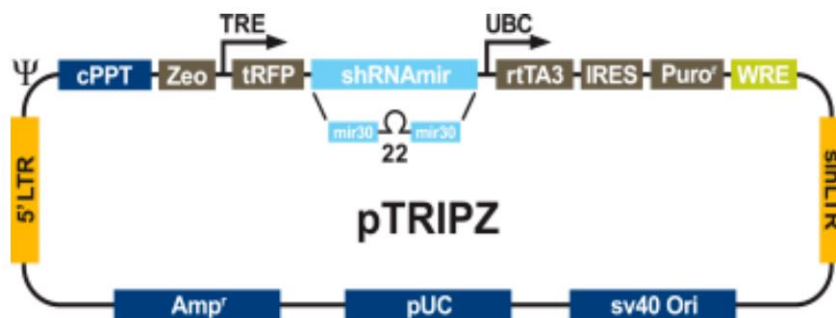


Figura 3.1. Vetor de inibição pTRIPZ da Open Biosystems®. Elementos do vetor: TRE: promotor induzível por tetraciclina ou doxiciclina; rtTA3: transativador tet reverso; promotor UBC: dirige a expressão de rtTA3, IRES e Puro'; cPPT (*central polypurine tract*): auxilia a translocação para dentro do núcleo em células que não estão se dividindo; WRE: aumenta a estabilidade e tradução dos transcritos; TurboRFP: marcador de indução da expressão do vetor; Puro' e Zeo: marcadores de seleção para células mamíferas; 5'LTR: repetição terminal 5' nativa; SIN-LTR: repetição terminal 3'; sv40 Ori: garante a replicação de alta cópia; pUC: origem de replicação plasmidial.

A produção das partículas lentivirais foi feita em células HEK293T/17, seguindo-se o protocolo a seguir.

Dia 1. Plaqueamento de 10^6 células 293T em placa 100mm;

Dia 2. Para cada construção de interesse foi feita uma mistura de empacotamento (*packing mix*), que consiste de 2,6 μ g pCMV-dR8.2 dvpr, 0,325 μ g pCMV-VSVG e água MilliQ para volume final de 26 μ L (por placa de células 293T). Estes são dois vetores de empacotamento lentivirais de segunda geração obtidos da *AddGene*. Ao volume final de cada *packing mix* foi adicionado 2,6 μ g do vetor lentiviral contendo a sequência para produção do shRNA de interesse. Em um tubo separado, foi adicionado 182 μ L de DMEM sem soro fetal bovino e 16 μ L Fugene6 (Roche®). Este volume foi adicionado a cada tubo com o vetor de interesse produzido no passo anterior, e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. O volume total foi adicionado em cada placa, levadas a estufa a 37°C e 5% CO₂ por 16h.

Dia 3. Após as 16 h da transfecção, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM cotendo 10% de soro fetal bovino.

Dia 4 e 5. O meio de cultura total foi coletado, centrifugado a 3000rpm por 5 minutos para retirada das células 293T. Os sobrenadantes contendo os vírus foram aliquotados em volume de 1mL e congelados a -80°C até sua utilização.

3.11. Titulação viral

A quantificação da produção viral foi feita com o kit de *Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit* (Clontech®), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com o software Softmax Pro (Molecular Devices®) a 450nm.

3.12. Determinação da concentração efetiva de puromicina

Células A549 e H358 parentais foram testadas para a determinação da concentração efetiva de puromicina para posterior seleção. Foram testadas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2 e 3µg/mL de puromicina por 10 dias, com troca a cada 3 dias para determinar a menor concentração capaz de matar todas as células não resistentes à puromicina. Essa concentração foi, posteriormente, utilizada no processo de seleção, uma vez que o vetor pTRIPz usado para produzir partículas lentivirais possui o gene de resistência à puromicina para seleção de células estavelmente transduzidas.

3.13. Transdução viral

Células A549 e H358 parentais foram transduzidas com uma MOI (“*multiplicity of infection*” ou número de partículas infectantes por célula) de 1, acrescida de 0,8µg/mL de polibreno para os vetores shKRAS#1, shKRAS#2, shAURKA#1, shAURKA#2,

shAURKB#1, shAURKB#2 e shNTCtrl. Foram plaqueadas 2.10^5 células em um poço de 9cm^2 , e adicionado volume viral suficiente para a MOI referida. Um dia após a transdução, foi iniciado o processo de seleção por puromicina, seguindo a concentração encontrada conforme descrito no item acima. A seleção foi feita por 15 dias, com troca de meio a cada 2 dias.

3.14. Concentração efetiva de doxiciclina para indução

Após a seleção por puromicina por 15 dias, as linhagens transduzidas A549 e H358 passaram por uma cinética de indução por doxiciclina durante 5 dias. Cada linhagem foi plaqueada em 6 poços com superfície de 9cm^2 , utilizando concentração de 500, 1000, 1500 e 2000ng/mL e sem doxiciclina em cada poço, com o meio trocado diariamente. Após este período as células foram observadas em microscopia de fluorescência em comprimento de onda de 553nm , sendo observada a proporcionalidade e intensidade de fluorescência emitida.

3.15. Cinética temporal de indução por doxiciclina

Após a determinação da concentração ótima de doxiciclina em cada uma das linhagens encontrada no experimento anterior foi realizada cinética temporal. As linhagens transduzidas A549 e H358 foram plaqueadas em 3 poços de 9cm^2 , e induzidas com doxiciclina na concentração ótima pelos tempos de 1, 2 e 3 dias de indução. Após este período as células foram observadas em microscopia de fluorescência em comprimento de onda de 553nm , sendo observada a proporcionalidade e intensidade de fluorescência emitida.

3.16. Seleção clonal das células H358 e A549

As células A549 e H358 obtidas na etapa descrita anteriormente foram plaqueadas na quantidade de 1000 células em placa de 150mm, a fim de se obter células aderidas de forma individual, e mantidas em meio de cultura RPMI, contendo 10% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂, adicionado de puromicina 2µg/mL. O meio foi trocado a cada 2 dias até o aparecimento de colônias celulares isoladas, que foram posteriormente expandidas e testadas quanto à eficiência de *knockdown*. A validação da inibição da expressão dos genes de interesse foi realizada por meio da análise de expressão gênica em nível de mRNA, por RT-qPCR, e em nível de proteína, por meio de *Western blotting*.

3.17. Ensaios biológicos

3.17.1. Curva de crescimento

Em placas de 35mm foram semeadas 1×10^5 células por poço em 2mL de meio apropriado, em triplicata e mantidas em cultura, em atmosfera 95% de O₂ e 5% CO₂ e à temperatura de 37°C. A troca de meio de cultura foi realizada quando necessário, por um período de 12 dias, no mínimo, sendo coletados os pontos referentes aos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12, salvo quando indicado. Após a suspensão, as células foram fixadas em formaldeído 10% e armazenadas à temperatura de 4°C. Os resultados obtidos com a contagem das células foram plotados e analisados com o programa Excel.

3.17.2. Ensaios clonogênicos

As células foram plaqueadas em placas de 60mm à confluência de 500 células por placa e mantidas em cultura, em atmosfera 95% de O₂ e 5% CO₂ e à temperatura de 37°C, em

meio de cultura apropriado, contendo inibidores ou antibióticos, quando apropriado. O meio foi trocado periodicamente e a cultura foi mantida até o aparecimento de colônias macroscópicas. Essas colônias foram, então, fixadas com solução de formaldeído 10% e coradas com solução cristal violeta. As placas coradas foram então fotografadas e a quantificação do número de colônias formadas feita manualmente. Os resultados expressos em porcentagem do número de colônias formadas em relação ao controle para cada experimento.

3.17.3. Ensaios de viabilidade metabólica por redução de MTT

As células previamente induzidas ou tratadas, conforme o modelo estudado, foram plaqueadas em placas de 96 poços à confluência de 1.10^4 células por poço e mantidas em cultura, em atmosfera 95% de O₂ e 5% CO₂ e à temperatura de 37°C, em meio de cultura apropriado, contendo inibidores ou antibióticos, quando necessário, num volume total de 100µL por poço. Após 24 horas, tempo necessário para adesão das células à placa, o meio foi completamente removido, e as células foram carenciadas com meio sem SFB contendo inibidores ou antibióticos, quando necessário, por mais 24h. Após esse período foi adicionado a cada poço 15µL de uma solução de MTT 1mg/mL e as células foram novamente incubadas por mais 3h, no escuro, em atmosfera 95% de O₂ e 5% CO₂ e à temperatura de 37°C. Findo o tempo de tratamento, todo o meio de cultura foi removido com o auxílio de uma bomba de vácuo, e foram adicionados 100µL de DMSO a cada poço para dissolução dos cristais de Formazan gerados a partir da redução do MTT. A placa foi posteriormente lida em aparelho espectrofotômetro (Eon, Biotek) com comprimento de onda de 570nm, e os resultados foram analisados com o auxílio do programa Excel.

3.17.4. Crescimento em suspensão de agarose

Para este ensaio foram utilizadas placas de 24 poços. Inicialmente as placas foram preparadas por meio da adição de 500 μ L de RMPI 10% de SFB, sem antibióticos, acrescido de 0,6% de agarose. Após gelificação, para cada condição, foram adicionados 1,5mL de uma suspensão celular contendo 1×10^4 células, em meio RMPI 10% de SFB, sem antibióticos, acrescido de 0,3% de agarose. Essas células foram previamente induzidas, conforme a necessidade para a expressão do gene de interesse e pelos tempos padronizados para cada condição. Após a gelificação, foram adicionados 500 μ L de RPMI 10% de SFB, sem antibióticos e as placas foram incubadas em atmosfera 95% de O₂ e 5% CO₂ e à temperatura de 37°C, por 24h. Após esse tempo, os tratamentos com inibidores ou antibióticos foram iniciados. A troca de meio de cultura foi feita a cada 2 ou 3 dias e o crescimento das colônias foi acompanhado ao longo de 2 semanas, ou até que se formassem colônias macroscópicas. Após o tempo de incubação necessário, as colônias foram coradas com 50 μ L de uma solução de MTT 1mg/mL e incubadas em atmosfera 95% de O₂ e 5% CO₂ e à temperatura de 37°C, por 3h. A aquisição das imagens foi feita com o auxílio de câmera de 5Mpx, as colônias foram contadas e os dados analisados com o auxílio do programa Excel.

3.18. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se, sempre que possível, replicatas experimentais e biológicas em número maior ou igual a 3. Os resultados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão ou através de imagens representativas de 3 ou mais experimentos independentes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prisma 3.0 e/ou o teste t-student. Foram considerados estatisticamente significativos os grupos experimentais que apresentaram valor de p menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização de reagentes e padronização de ensaios.

4.1.1. Otimização das condições ideais para RT-qPCR.

A fim de padronizar nossos experimentos de RT-qPCR, nós inicialmente determinamos as concentrações ótimas de cada par de *primers* a serem utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real. Foram testadas as concentrações de 200, 400, 600 e 800nM. A concentração utilizada foi a menor concentração que apresentou curva de dissociação com somente um pico e não apresentou variação do ciclo *threshold* (Ct) quando comparado às maiores concentrações analisadas. Os dados são mostrados a seguir (**Tabela 4.1**).

| <i>Primer</i> | [<i>primers</i>] |
|---------------|--------------------|
| <i>AURKA</i> | 200nM |
| <i>AURKB</i> | 200nM |
| <i>KRAS</i> | 200nM |
| <i>GAPDH</i> | 800nM |
| <i>ACTB</i> | 400nM |
| <i>GUSB</i> | 200nM |

Tabela 4.1. Determinação da concentração ótima de cada par de *primers*. A determinação da concentração de cada primer utilizada nas reações de PCR em tempo real foi determinada por meio da menor concentração capaz de produzir somente um pico na curva de dissociação e que não promove variação significativa de seu respectivo Ct.

Após a determinação das concentrações ótimas, nós determinamos as eficiências de todos os pares de *primers* utilizados nos experimentos de expressão gênica por PCR em tempo real. Os resultados obtidos para os primers de *AURKA*, *AURKB*, *KRAS* e para os genes *housekeeping* *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *ACTB* (β -actina) e *GUSB* (β -glucuronidase) são mostrados a seguir (**Figura 4.1**).

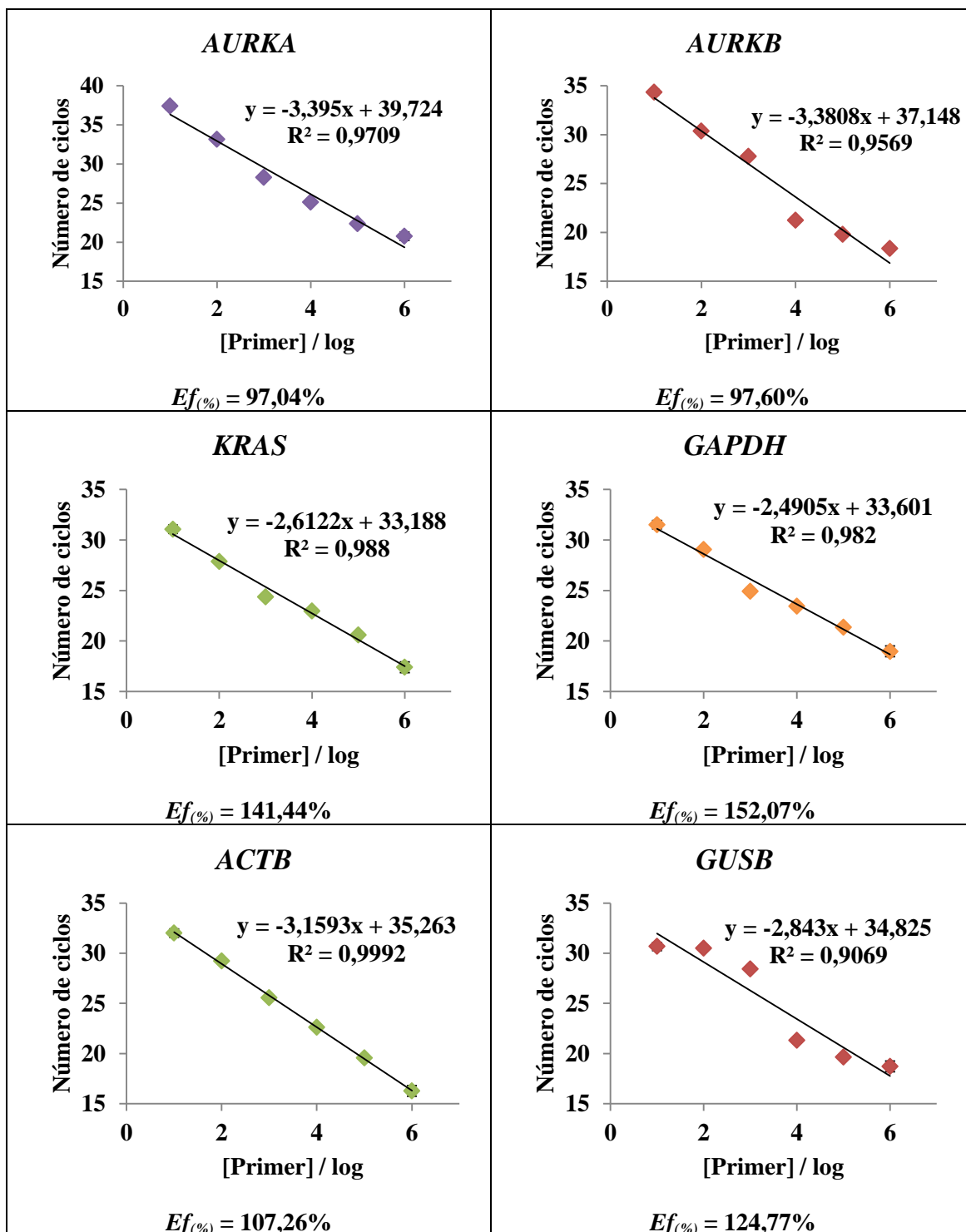


Figura 4.1. Determinação da eficiência (*Ef*) dos *primers* de *AURKA*, *AURKB*, *KRAS*, *GAPDH*, *ACTB* e *GUSB*. Após a determinação da menor concentração de primers sem variação de Ct e somente um pico na curva de dissociação, as eficiências absolutas foram calculadas por $10^{(-1/\alpha)} - 1$, onde α é o coeficiente angular da curva de eficiência de cada par de primers obtida pelo número de ciclos necessários para amplificar uma amostra qualquer em função do logaritmo da concentração de primers.

Nós também investigamos quais seriam os melhores *genes housekeeping* a serem utilizados como controles nas reações de RT-qPCR (ver item 3. MATERIAIS E MÉTODOS). Os controles endógenos eleitos para cada condição de tratamento das linhagens celulares estudadas são mostrados abaixo (**Tabela 4.2**).

| Linhagens celulares / Tratamentos | Conjunto de genes <i>housekeeping</i> |
|--|--|
| Linhagens parentais A549 e H358; tratamento com Aurora inhibitor II | <i>GAPDH</i> ; <i>GUSB</i> |
| Clones A549 e H358 <i>knockdown</i> para <i>AURKA</i> ; <i>AURKB</i> e <i>KRAS</i> | <i>GAPDH</i> ; <i>GUSB</i> |
| Clones H1703; tratamento com Aurora Inhibitor II | <i>GUSB</i> ; <i>ACTB</i> |
| Células primárias Saleb e Sakras; tratamento com Aurora Inhibitor II | <i>GUSB</i> ; <i>ACTB</i> |

Tabela 4.2. Genes *housekeeping* utilizados para normalização das reações de PCR em tempo real. *GAPDH* e *GUSB* foram utilizados como genes endógenos para todos os experimentos envolvendo PCR em tempo real para as linhagens A549 e H358 e seus respectivos clones *knockdown* gerados para *AURKA*, *AURKB*, *KRAS* e controles. Do mesmo modo, *ACTB* e, também, *GUSB* foram utilizados como controles endógenos de todos os experimentos de PCR em tempo real envolvendo a linhagem H1703 e as células primárias Saleb e Sakras.

Desse modo, para cada condição testada, nós determinamos dois genes *housekeeping* mais estáveis, que foram utilizados intercambiavelmente, sem diferença de resultados, para a análise da expressão gênica por RT-qPCR em todos os experimentos relacionados que se seguem.

4.1.2. Geração e caracterização de células H358 e A549 expressando shRNAs para KRAS, Aurora A e Aurora B.

Com o objetivo de promover o silenciamento gênico por interferência de RNA para KRAS e para as quinases Aurora A e Aurora B, nós geramos por meio de infecção lentiviral (ver item 3. MATERIAIS E MÉTODOS) células estáveis resistentes à puomicina, expressando shRNAs para os mRNAs de interesse de forma induzível por doxiciclina, sendo denominados de clones *knockdown*.

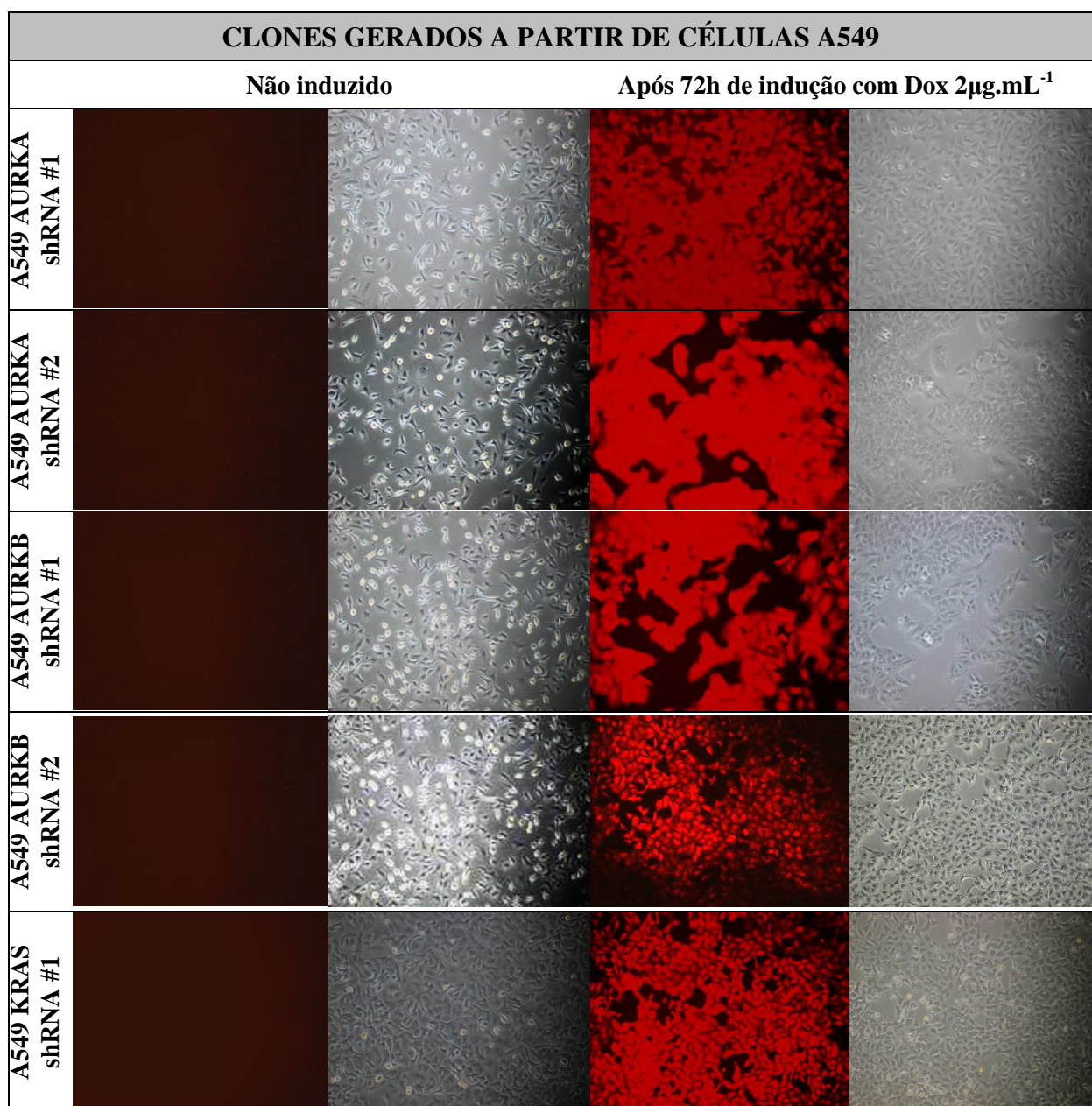
Este silenciamento induzível por doxiciclina foi feito em duas linhagens celulares, uma de adenocarcinoma pulmonar humano, denominada A549, e a outra de carcinoma bronquioalveolar pulmonar humano, denominada H358, ambas portadoras de mutações oncogênicas no gene da *KRAS*. Como controle, também foram geradas, em ambas as linhagens, células expressando um shRNA sem homologia para genes humanos, denominadas *non-targeting shRNA* (shNTCtrl). Para controlar possíveis efeitos oriundos da inibição de alvos não específicos (*off-target effects*) pelos shRNAs, foram usadas duas sequências diferentes para cada gene.

Para que a expressão do shRNA fosse alta e uniforme em toda a população clonal utilizada, e para evitar que a possível heterogeneidade da população interferisse nas análises, as células transfectadas foram submetidas à seleção clonal com 2µg/mL de puomicina por duas semanas e, posteriormente, plaqueadas em confluência suficientemente baixa que permitisse o crescimento de colônias celulares oriundas de apenas uma célula. Essas colônias (clones) foram, então, expandidas e caracterizadas.

Os clones gerados foram validados de acordo com três abordagens distintas: **a)** avaliação da expressão de proteína fluorescente vermelha (*red fluorescent protein* – RFP) em função da indução com 2µg/mL de doxiciclina (**Figura 4.2 e 4.3**); **b)** análise da expressão

gênica em nível de mRNA (RT-qPCR) em função da indução com 2 μ g/mL de doxíciclina (**Figuras 4.4 e 4.5**); e c) análise da expressão gênica em nível de proteína (*Western blotting*) em função da indução com 2 μ g/mL de doxíciclina (**Figuras 4.6 e 4.7**).

Os clones que apresentaram maior eficiência de *knockdown* e maior homogeneidade quanto à expressão de RFP foram utilizados para os ensaios funcionais posteriores e os resultados obtidos serão mostrados a seguir.



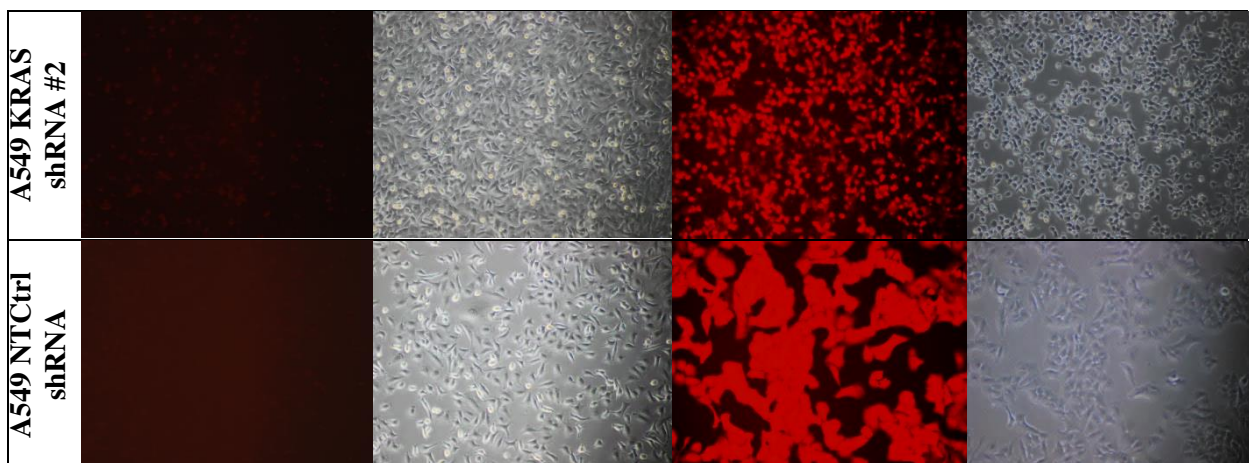
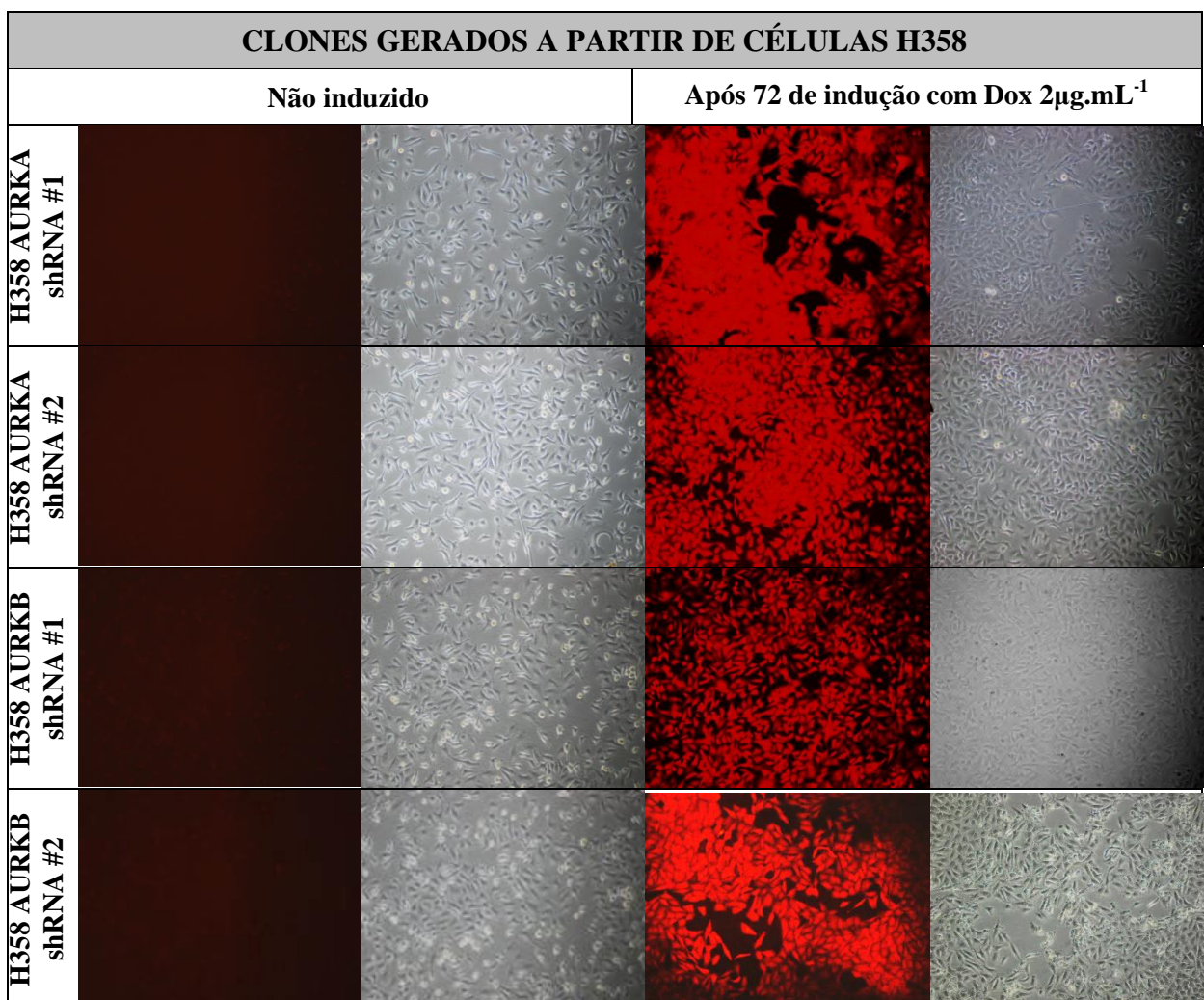


Figura 4.2. Expressão de RFP em clones *knockdown* gerados a partir de células A549. Clones *knockdown* de células A549 foram tratados com doxiciclina $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 72h. Após esse período, as placas foram observadas em luz branca e fluorescência com excitação em comprimento de onda 553nm . Como controle, placas não tratadas com doxiciclina, mas incubadas pelo mesmo período, foram fotografadas sob as mesmas condições. Aumento de 100X.



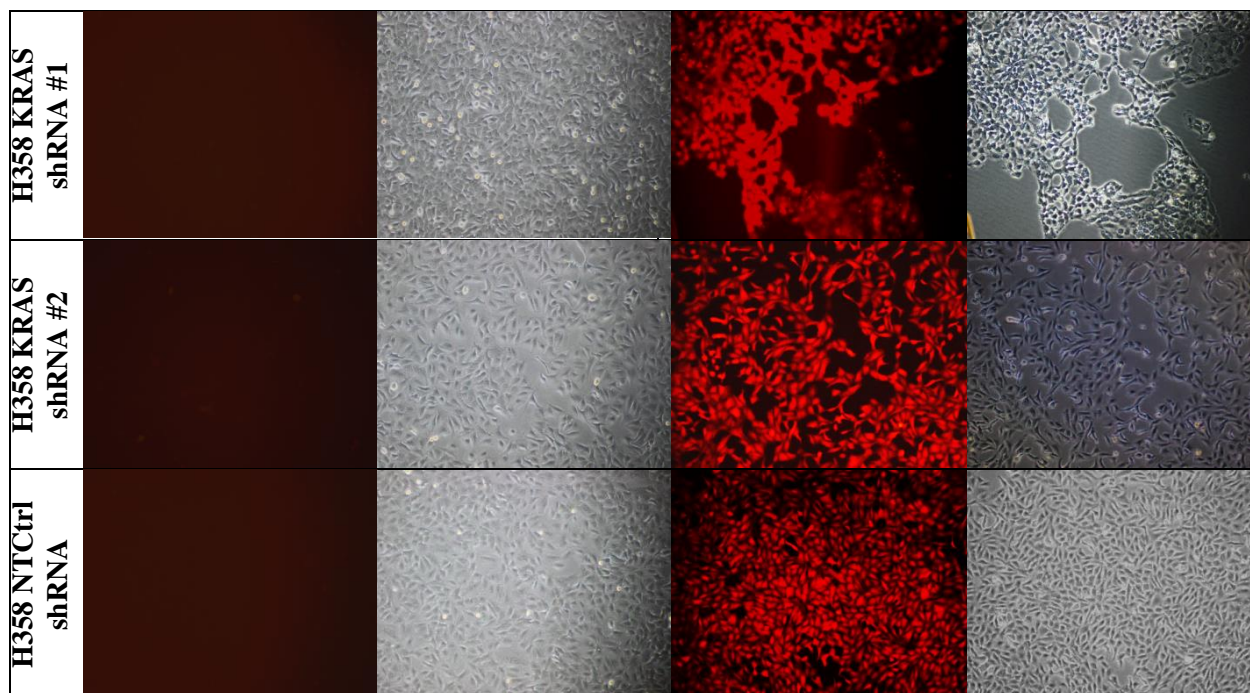


Figura 4.3. Expressão de RFP em clones *knockdown* gerados a partir de células H358. Clones *knockdown* de células H358 foram tratados com doxiciclina $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 72h. Após esse período, as placas foram observadas em luz branca e fluorescência com excitação em comprimento de onda 553nm. Como controle, placas não tratadas com doxiciclina, mas incubadas pelo mesmo período, foram fotografadas sob as mesmas condições. Aumento de 100X.

Uma vez obtidos clones que expressavam RFP homogeneamente após indução com $2\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina, estes foram validados por meio da expressão de mRNA (quantificado por RT-qPCR) (**Figuras 4.4 e 4.5**) e proteína (quantificado por *Western blotting*) (**Figuras 4.6 e 4.7**). Foram aceitos os clones estáveis que expressaram pelo menos 60% de redução da expressão em relação às condições controle.

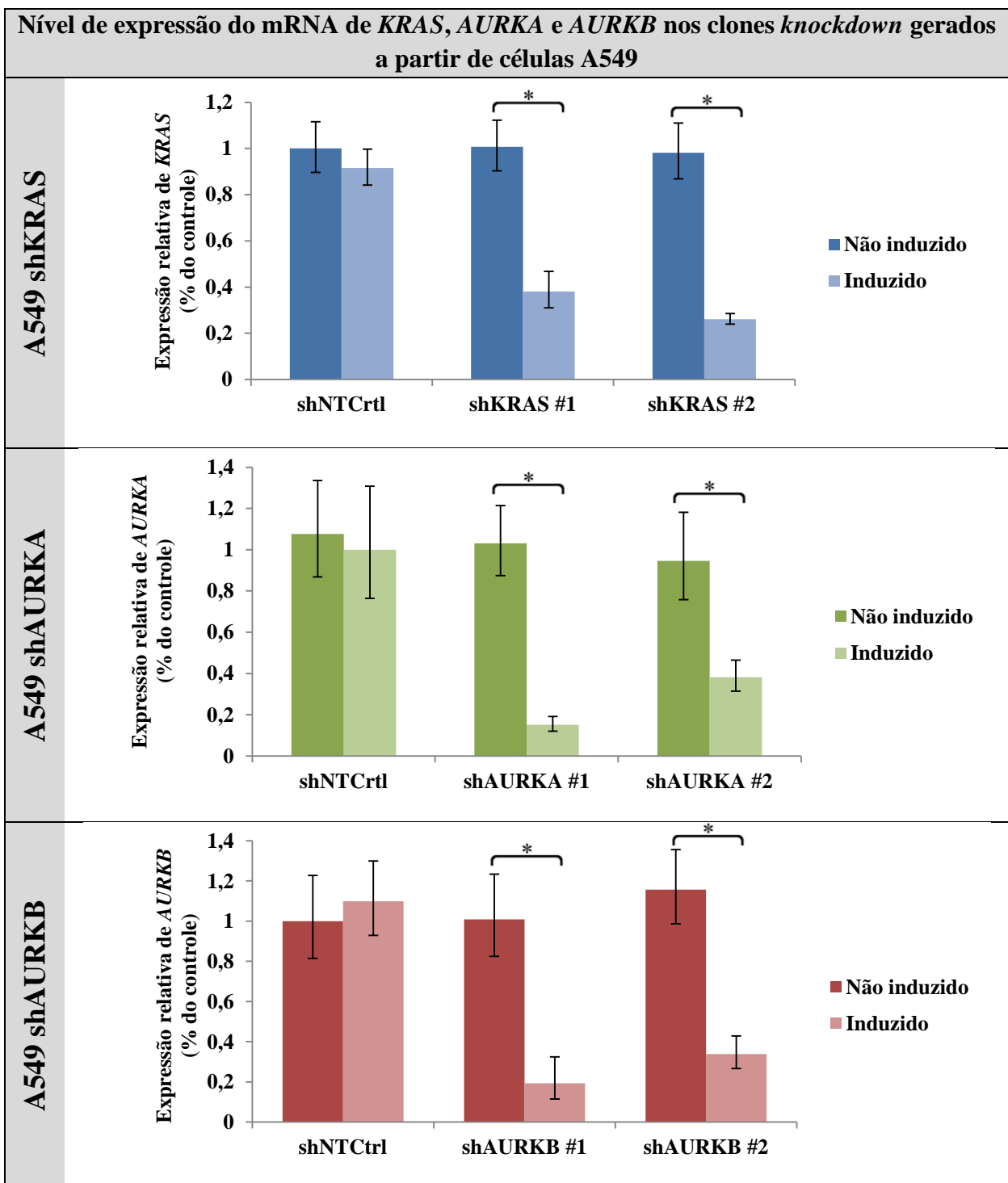


Figura 4.4. Expressão gênica de *KRAS*, *AURKA* e *AURKB* determinada por RT-qPCR para clones *knockdown* gerados a partir de células A549. Células A549 foram tratadas com doxiciclina $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 72h e analisadas por PCR em tempo real quanto à expressão do gene alvo. Células shNTCtrl também foram analisadas como controle. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste de *Student-t* para amostras induzidas com doxiciclina comparadas ao seu respectivo controle não tratado.

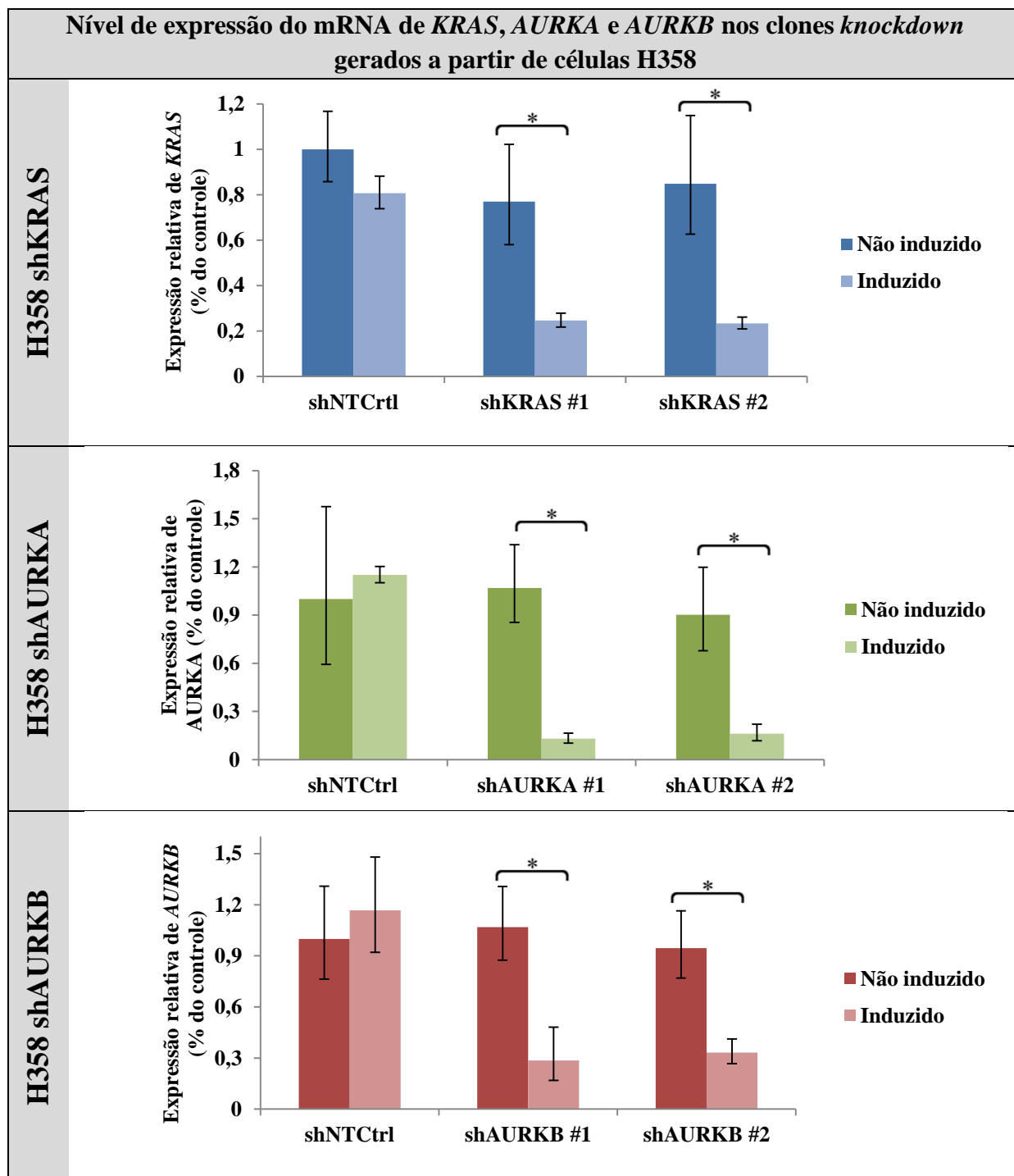


Figura 4.5. Expressão gênica de *KRAS*, *AURKA* e *AURKB* determinada por RT-qPCR para clones *knockdown* gerados a partir de células H358. Células H358 foram tratadas com doxiciclina $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 72h e analisadas por PCR em tempo real quanto à expressão do gene alvo. Células shNTCtrl também analisadas como controle. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste de *Student-t* para amostras induzidas com doxiciclina comparadas ao seu respectivo controle não tratado.

Nível de expressão proteica de KRAS, AURKA e AURKB nos clones *knockdown* gerados a partir de células A549

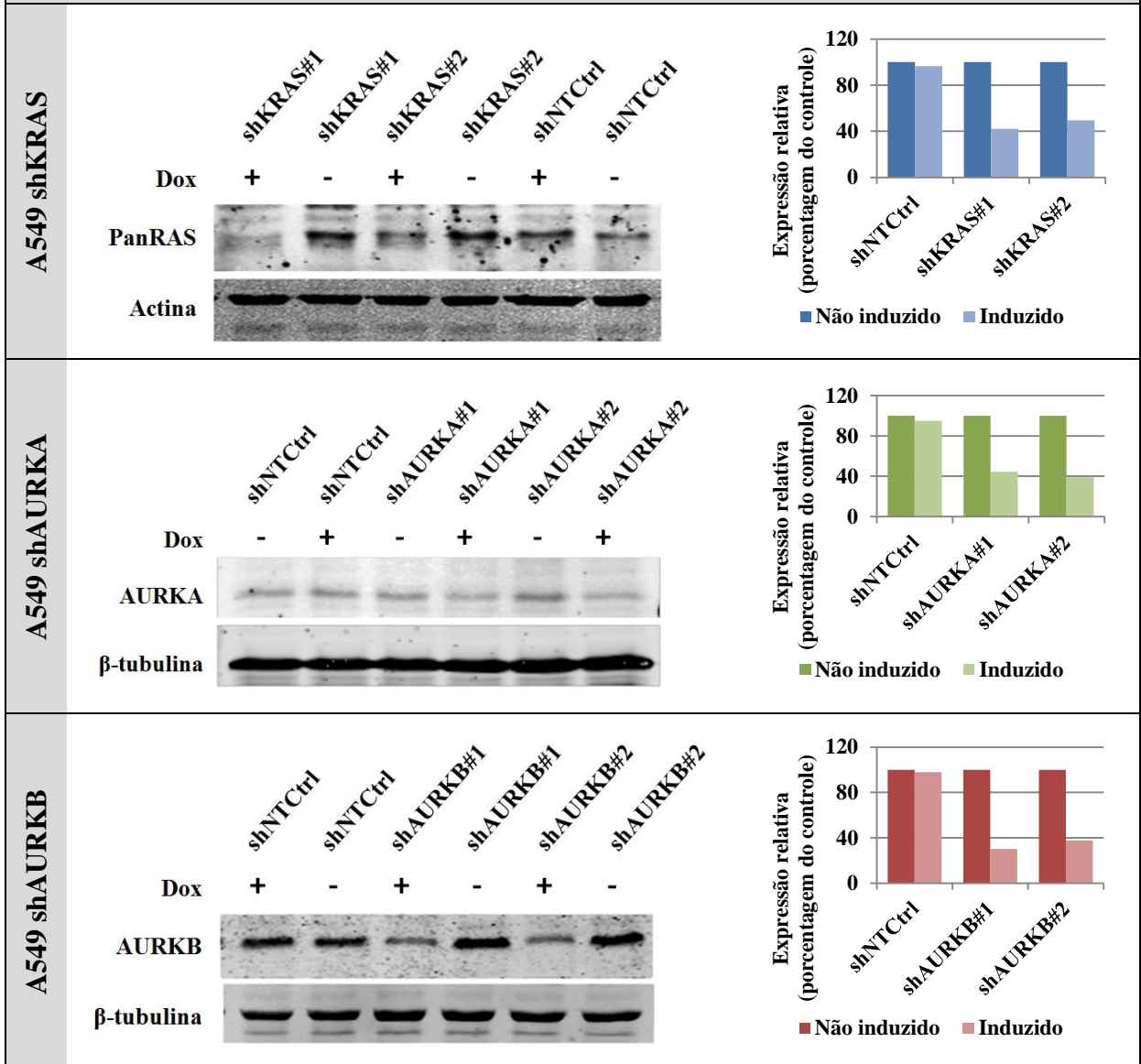


Figura 4.6. Expressão gênica de KRAS, AURKA e AURKB determinada por *Western blotting* para clones *knockdown* gerados a partir de células A549. A expressão proteica de KRAS, AURKA e AURKB em clones de células A549 foi determinada após tratamento com doxiciclina $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 72h. Gráficos adjacentes representam a quantificação das bandas por meio do programa *ImageJ*. Actina ou β-tubulina foram utilizados como controle endógeno (*loading control*).

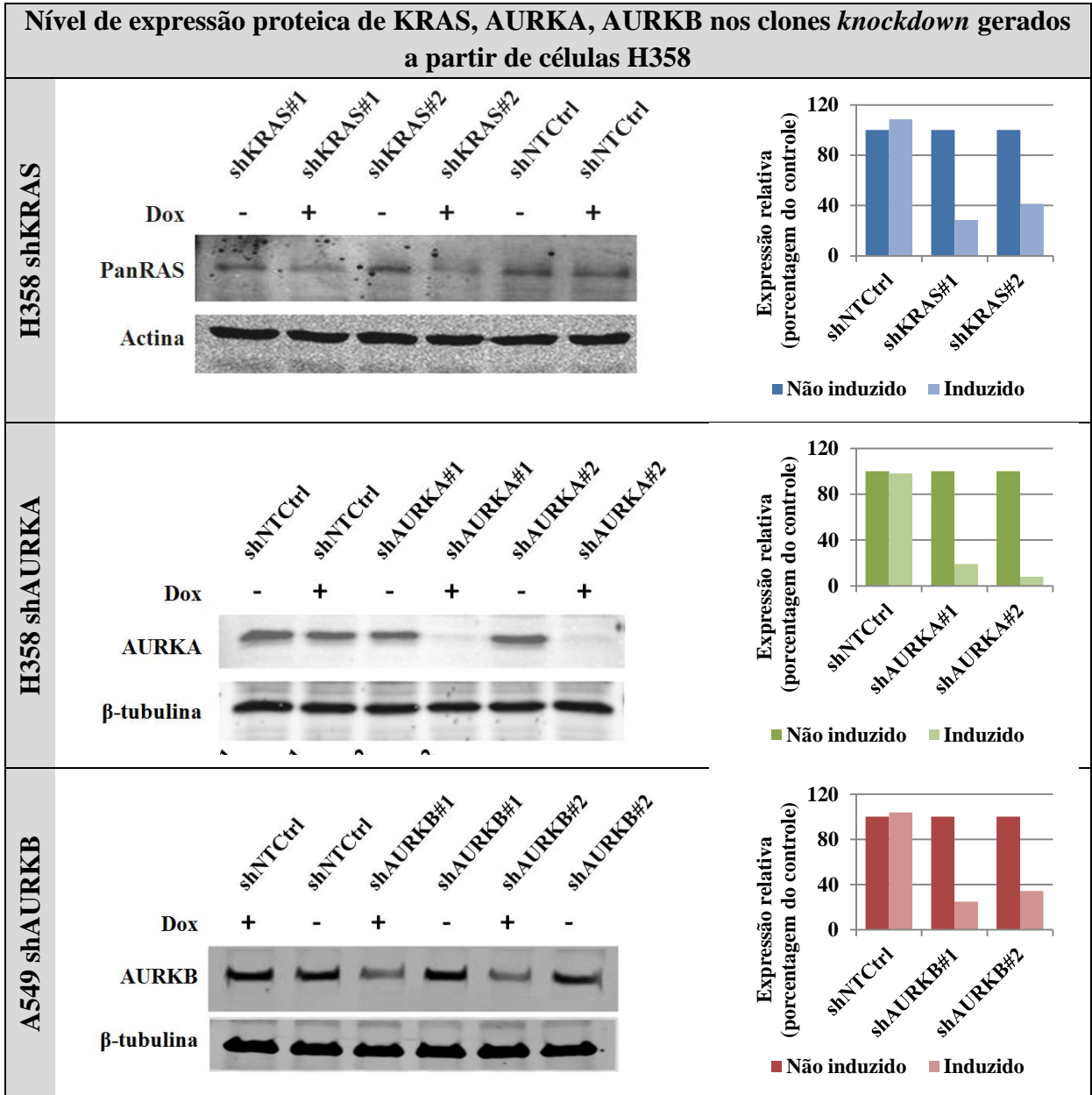


Figura 4.7. Expressão gênica de KRAS, AURKA e AURKB determinada por *Western blotting* para clones *knockdown* gerados a partir de células H358. A expressão proteica de KRAS, AURKA e AURKB em clones de células H358 foi determinada após tratamento com doxiciclina $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 72h. Gráficos adjacentes representam a quantificação das bandas por meio do programa *ImageJ*. Actina ou β -tubulina foram utilizados como controle endógeno (*loading control*).

4.2. Resultados experimentais

4.2.1. A presença de KRAS oncogênica em células primárias pulmonares imortalizadas está correlacionada com uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B.

Para avaliar se a expressão das quinases Aurora está ou não correlacionada com a presença da forma oncogênica da KRAS, nós inicialmente analisamos a expressão das quinases Aurora A e B em células primárias pulmonares imortalizadas na ausência (*Saleb*) ou na presença (*Sakras*) da forma oncogênica G12V da KRAS, expressa constitutivamente. Estas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Scott Randell da University of North Carolina at Chapel Hill (LUNDBERG, A.S. et al., 2002). A obtenção dessas células está descrita no item 3. MATERIAIS E MÉTODOS. Como pode ser visto na **Figura 4.8**, células *Sakras* expressam níveis levemente aumentados de KRAS em relação ao seu par isogênico *Saleb*, conforme esperado, tanto em nível de mRNA, quanto em nível proteico. Além disso, as células *Sakras* apresentam, em relação às células *Saleb*, expressão aumentada das quinases Aurora A e Aurora B (mRNA e proteína), mostrando uma forte correlação entre os níveis de expressão de KRAS, AURKA, e AURKB.

Apesar de a expressão de KRAS oncogênica em *Sakras* estar associada a uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B, esses resultados mostram somente uma correlação, não provando que, de fato, a expressão de AURKA e AURKB é regulada por KRAS. A comprovação da existência de uma relação de causalidade entre a expressão de KRAS oncogênica e quinases Aurora é fundamental para a caracterização dessas proteínas como alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido por mutações em KRAS.

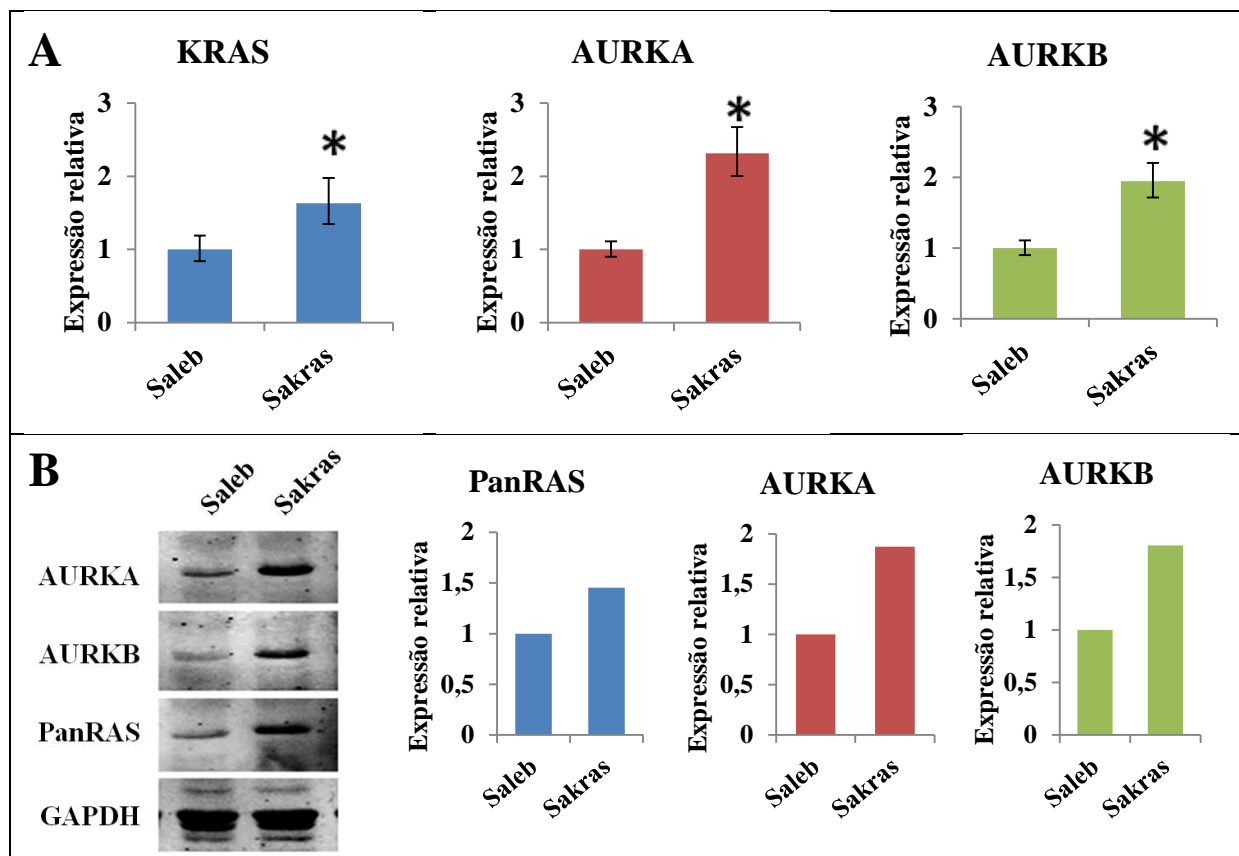


Figura 4.8. Em células pulmonares primárias imortalizadas, a expressão de AURKA e AURKB está correlacionada à presença de KRAS oncogênica. A expressão gênica de KRAS, AURKA e AURKB foi determinada por RT-qPCR (painel A) em células primárias imortalizadas denominadas Sakras, que possuem KRAS mutante. Células Saleb, células isogênicas que não expressam KRAS oncogênica, são mostradas como controle. A expressão proteica de Ras (anti-PanRas), AURKA e AURKB foi determinada por *Western blotting* (painel B, à esquerda; quantificação das bandas por meio do programa *ImageJ*, à direita) nas mesmas células descritas acima. O GAPDH foi usado como controle endógeno (*loading control*). Análise estatística: * $p < 0,05$ com base no teste de *t-student*.

Nesse sentido, nós lançamos mão de duas abordagens distintas para a investigação da expressão das quinases Aurora A e Aurora B em função da expressão de KRAS, envolvendo o ganho ou a perda de função desta proteína. Para os ensaios envolvendo ganho de função de KRAS, células tumorais H1703 sem mutação nesta proteína foram manipuladas geneticamente para a expressão induzível da forma oncogênica de KRAS. Para os ensaios de perda de função, células A549 e H358 possuindo mutações em KRAS foram manipuladas geneticamente para a expressão de um shRNA contra KRAS, e estão descritos a seguir.

4.2.2. A expressão induzível da KRAS oncogênica em linhagens tumorais leva a uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B.

De acordo com o nosso modelo de ganho de função, para determinar se a oncoproteína KRAS leva a um aumento de expressão das quinases Aurora A e Aurora B, nós utilizamos células pulmonares tumorais H1703 (que não possuem mutação em KRAS) manipuladas ou não para expressar induzivelmente a forma oncogênica G12V da KRAS fusionada a um *tag* HA. Essas células já se encontravam disponíveis em nosso laboratório e sua obtenção foi feita de acordo com o sistema induzível de expressão *T-REx™ System (Invitrogen®)*, conforme descrito no item 3. MATERIAIS E MÉTODOS.

Assim, conforme o nosso modelo celular, células H1703 transfectadas com a forma oncogênica da KRAS G12V expressam KRAS oncogênica somente mediante o tratamento com doxiciclina. Por outro lado, células H1703 T-RexB (controle negativo), não expressam KRAS oncogênica, mesmo quando tratadas com doxiciclina.

Antes de avaliar a expressão das quinases Aurora A e Aurora B em função da expressão de KRAS oncogênica em H1703, nós inicialmente realizamos um *time-course* a fim de verificar o perfil de expressão da KRAS oncogênica após indução com doxiciclina nas primeiras 24h de tratamento (**Figura 4.9**).

As células H1703 G12V expressam níveis estatisticamente significativos de KRAS oncogênica após 12h de indução com doxiciclina, em relação às células H1703 T-RexB, tratadas pelo mesmo período.

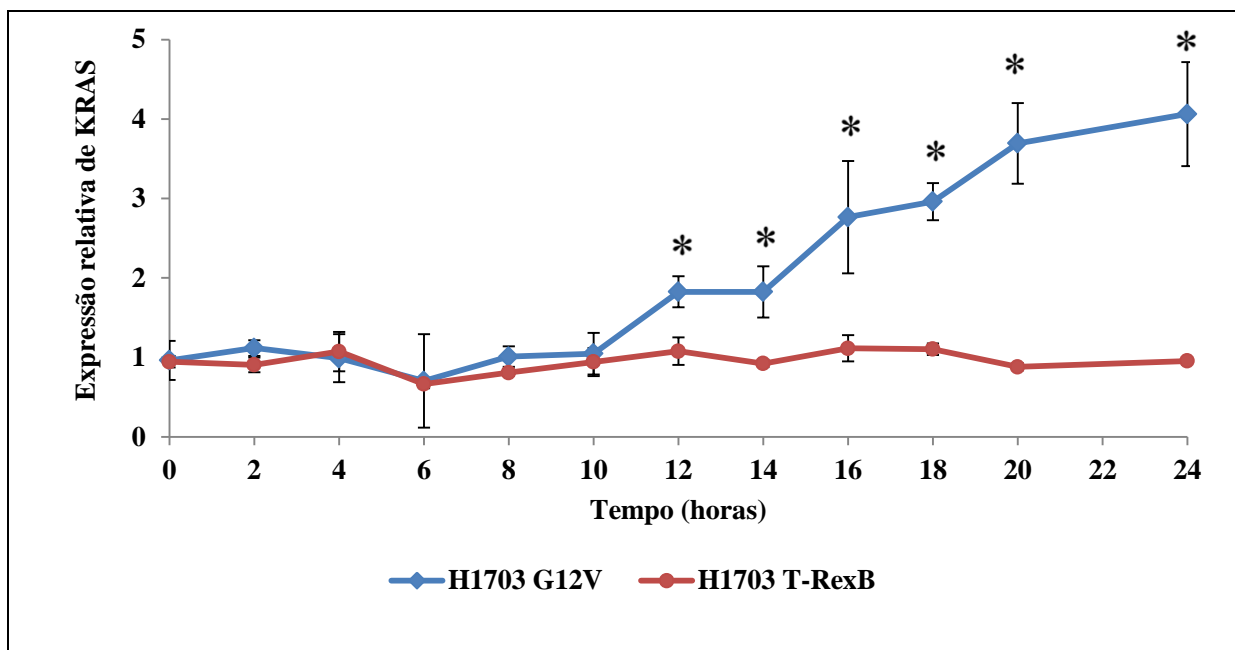


Figura 4.9. Time-course da expressão de KRAS em células H1703 ao longo de 24h. Células H1703 foram manipuladas geneticamente para a expressão induzível de KRAS oncogênica (H1703 G12V), com 2µg/mL de doxíciclina e analisadas quanto a expressão de KRAS total por PCR em tempo real. Como controle, foi avaliada a expressão de KRAS total em células H1703 T-RexB, que expressam somente KRAS selvagem endógena, tratadas sob as mesmas condições. A partir de 12h de tratamento as diferenças de expressão de KRAS total entre H1703 G12V e H1703 T-RexB são significativas. Análise estatística: (*) $p < 0,05$ com base no teste *Student-t*.

Mais adiante, nós expandimos nosso *time-course* para avaliação da expressão de KRAS oncogênica em H1703 em função da indução com doxíciclina ao longo de vários dias de tratamento (**Figura 4.10**).

Essa abordagem fez-se necessária uma vez que vários experimentos descritos mais adiante requerem um tempo de tratamento relativamente longo e os resultados observados devem ser relacionados à presença de KRAS oncogênica ao longo de todo o tempo de incubação.

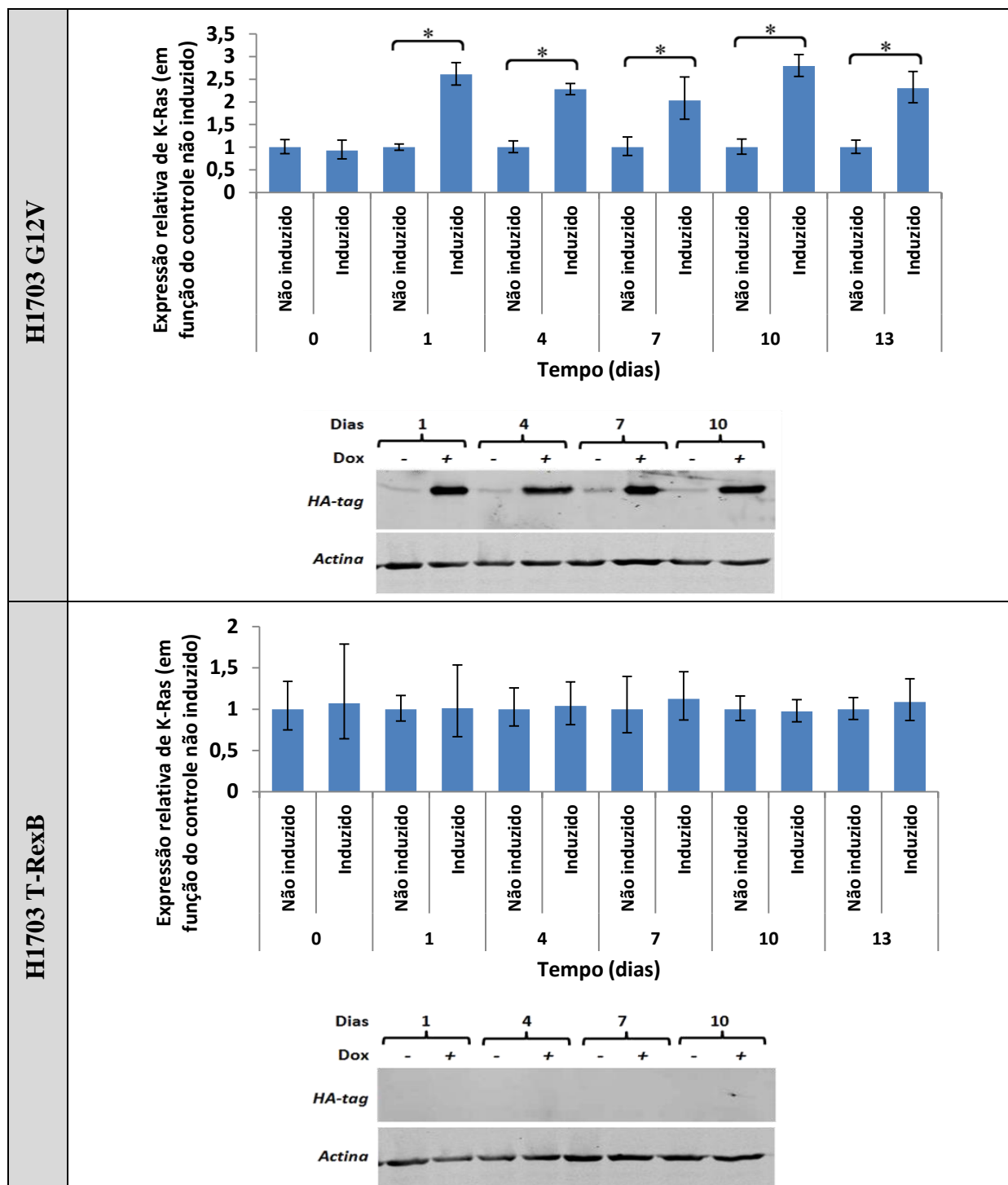


Figura 4.10. Time-course da expressão de KRAS em células H1703 ao longo de 13 dias. Células H1703 G12V e H1703 T-RexB foram tratadas ou não com 2µg/mL de doxiciclina e analisadas quanto a expressão de KRAS total por PCR em tempo real (gráfico de barras) e KRAS oncogênica por *Western blotting*. A partir de 24h de tratamento as diferenças de expressão de KRAS total entre as condições induzidas e não induzidas são significativas em H1703 G12V, porém não o são em H1703 TrexB. Actina foi utilizada como controle endógeno para o *Western blotting*. Análise estatística: (*) $p < 0,05$ com base no teste *Student-t*.

Posteriormente, a análise da expressão das quinases Aurora A e B em função da indução da expressão de KRAS oncogênica em células H1703 mostrou que existe uma forte correlação entre a expressão de KRAS e AURKA e, embora não tão forte, existe também uma correlação entre a expressão de KRAS e AURKB (**Figura 4.11**).

Como visto, a expressão das quinases Aurora não é induzida pela presença de doxiciclina na ausência de expressão da oncoproteína KRAS (células H1703 T-RexB). Por outro lado, células H1703 G12V mostram um aumento significativo da expressão de AURKA e AURKB em função do tratamento com 2µg/mL de doxiciclina a longo de 13 dias. Estes resultados mostram que a indução da expressão destas quinases nestas células depende da presença da forma oncogênica da KRAS.

Estes resultados foram, posteriormente, confirmados por *Western blotting* (**Figura 4.12**), utilizando-se um tempo de indução de 7 dias, nas mesmas condições dos ensaios anteriores. A expressão de AURKA e AURKB é aumentada mediante o tratamento com 2µg/mL de doxiciclina por 7 dias em células H1703 G12V, mas não o faz em células H1703 T-RexB, mostrando que KRAS e Auroras quinases se relacionam se forma causal.

Portanto, a expressão das quinases Aurora A e Aurora B está correlacionada com a expressão de KRAS em linhagens celulares geneticamente manipuladas para a expressão induzível de KRAS oncogênica.

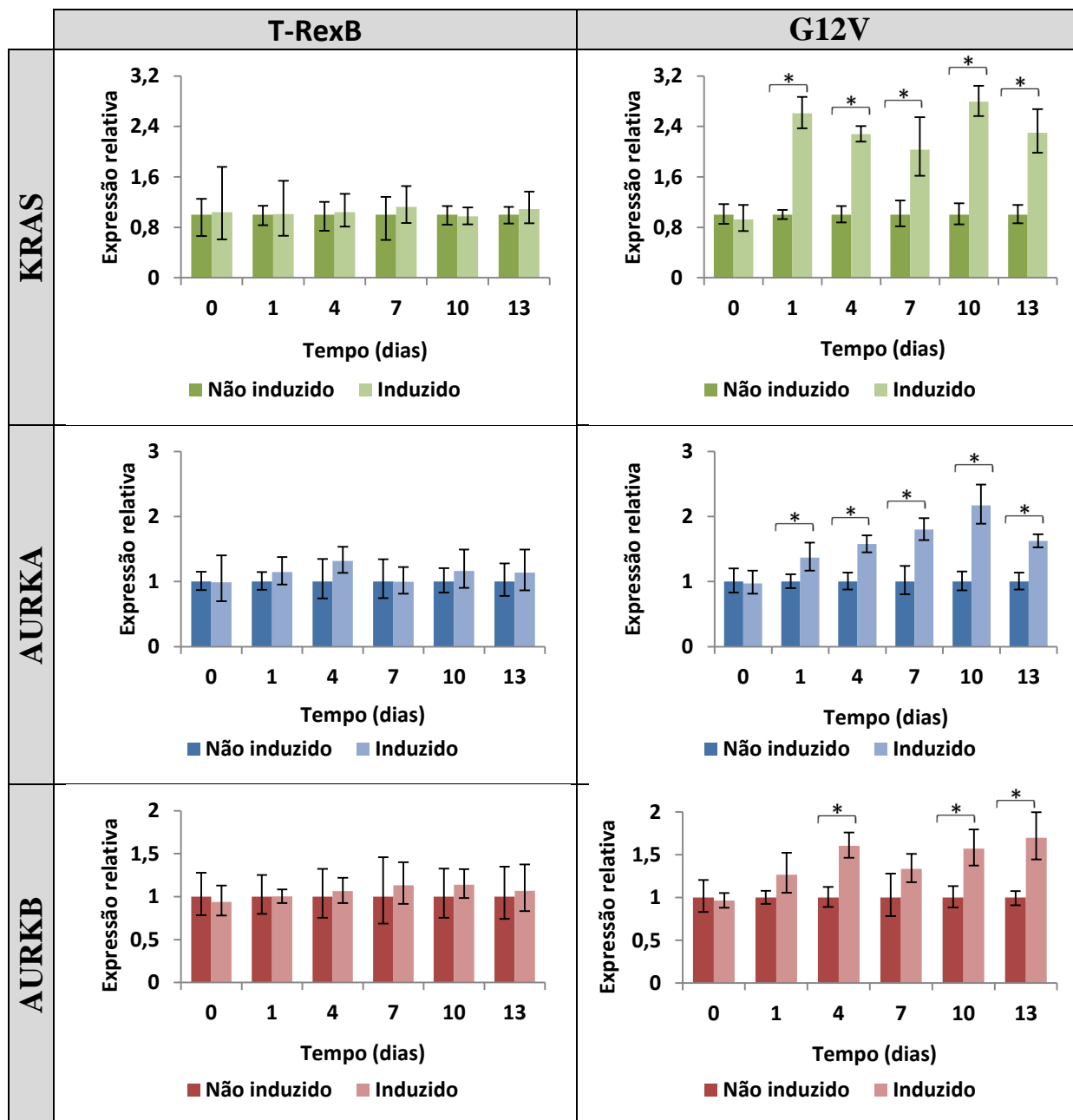


Figura 4.11. Células pulmonares H1703 apresentam variação da expressão do mRNA das quinases Aurora em função da indução da expressão de KRAS oncogênica com doxíciclina. As células H1703 T-RexB ou H1703 G12V foram tratadas com doxíciclina $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pelos tempos indicados e analisadas por PCR em tempo real quanto à expressão dos genes alvos (indicados na figura). Células não induzidas por doxíciclina também foram analisadas como controle. Análise estatística: $*p < 0,05$, com base no teste de *Student-t* para amostras induzidas com doxíciclina comparadas ao seu respectivo controle não tratado.

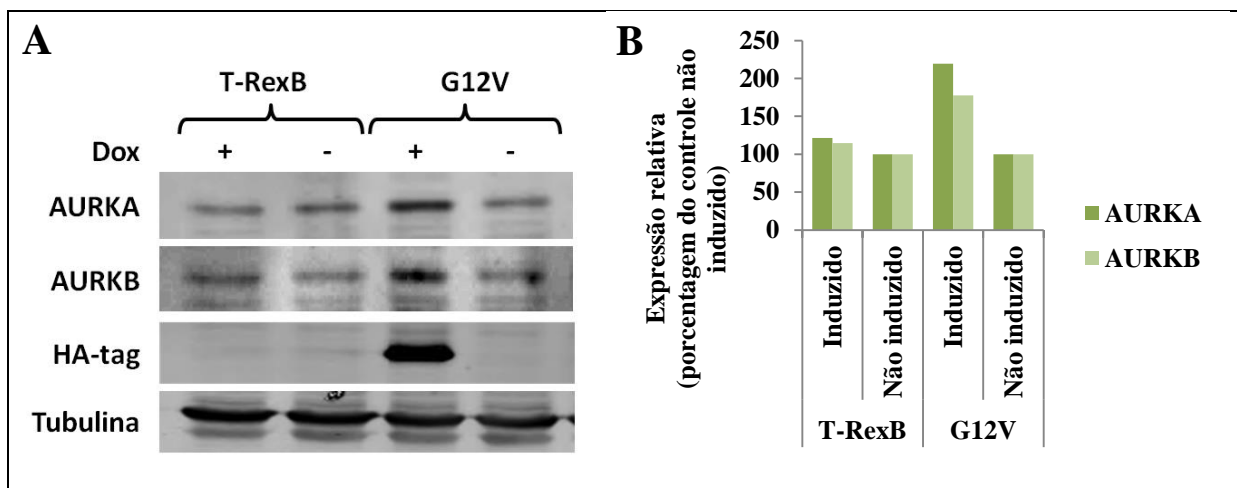


Figura 4.12. Células pulmonares H1703 apresentam variação da expressão proteica das quinases Aurora em função da indução da expressão de KRAS oncogênica com doxiciclina. **(A)** Células H1703 G12V e H1703 T-RexB foram tratadas ou não com 2 μ g/mL de doxiciclina e analisadas quanto a expressão de KRAS oncogênica (HA-tag), AURKA ou AURKB por *Western blotting*. A tubulina foi usada como controle endógeno (*loading control*). **(B)** Quantificação das bandas do *Western blotting* por meio do programa *ImageJ*, com normalização de dados feita a partir do controle endógeno.

4.2.3. A inibição da expressão de KRAS em células tumorais está correlacionada com uma menor expressão de Aurora A e Aurora B.

Além dos experimentos de ganho de função, nós avaliamos como a inibição da expressão da KRAS por interferência de RNA (segundo nosso modelo de perda de função) afeta a expressão das quinases Aurora A e Aurora B.

Utilizando linhagens celulares A549 e H358 *knockdown* para KRAS (cuja obtenção foi descrita anteriormente), nós avaliamos se a inibição da expressão desta oncoproteína afetava a expressão das quinases Aurora A e Aurora B. Os resultados obtidos mostram que a inibição da expressão de KRAS leva a uma diminuição da expressão da Aurora A e Aurora B, tanto em nível de mRNA (**Figura 4.13**), quanto em nível de proteína (**Figura 4.14**), indicando que a expressão destas quinases é regulada por KRAS. Mais interessante, essa regulação ocorre em nível transcricional.

Tomados juntos, os resultados mostrados até agora confirmam que a forma oncogênica da KRAS é capaz de promover a expressão de AURKA e AURKB tanto em células primárias imortalizadas de câncer de pulmão, quanto em linhagem celulares de câncer de pulmão, manipuladas geneticamente para expressar induzivelmente a forma oncogênica da KRAS, ou para expressar um shRNA contra KRAS endógena, indicando que estas quinases são alvos das vias desencadeadas pela presença de atividade oncogênica da GTPase KRAS.

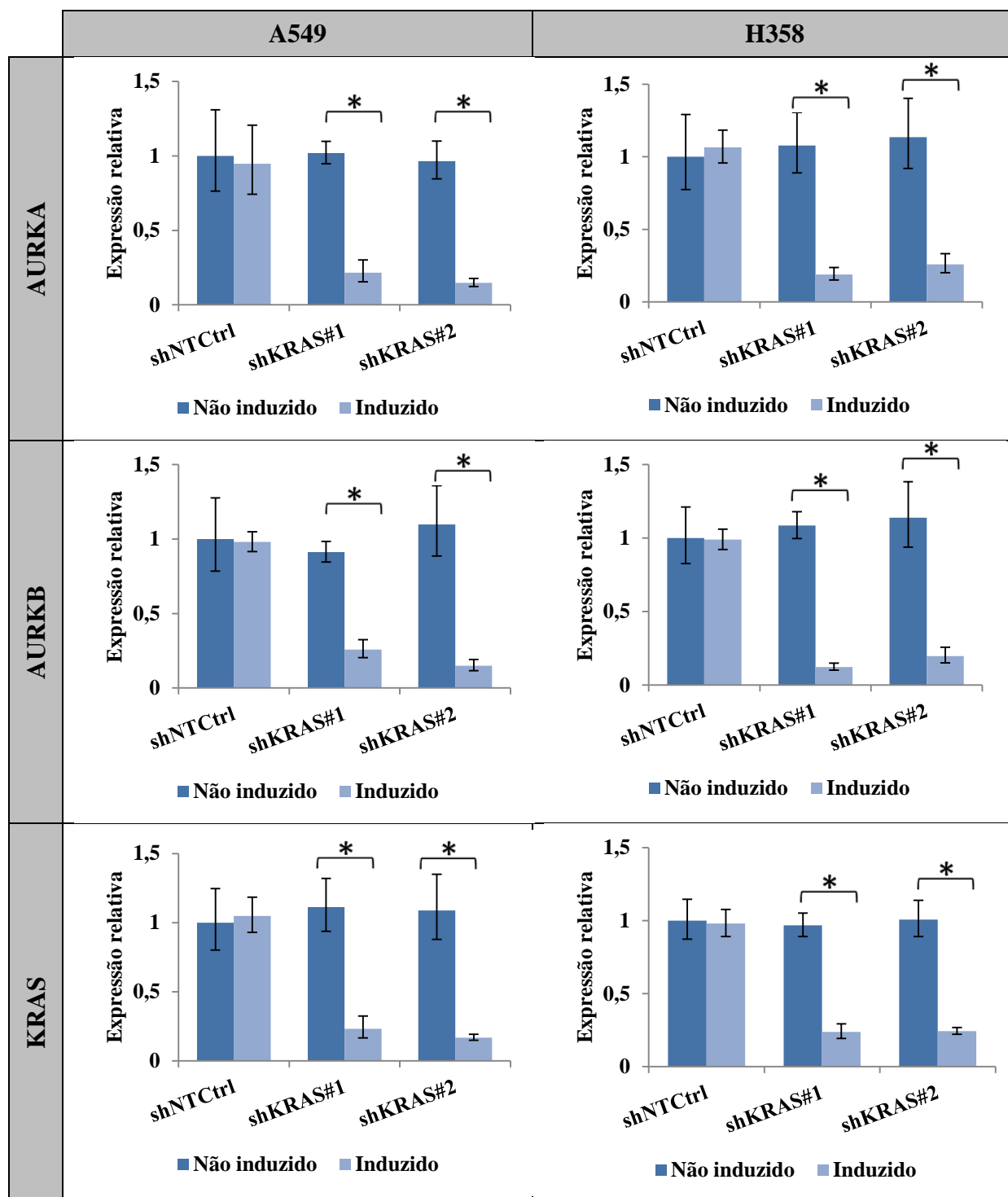


Figura 4.13. A inibição da expressão de KRAS por interferência de RNA reduz a expressão do mRNA das quinases Aurora A e Aurora B. A expressão gênica de KRAS, AURKA e AURKB foi determinada por RT-qPCR para clones *knockdown* gerados a partir de células H358 ou A549 após tratamento ou não com doxiciclina $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 72h. A inibição da expressão de KRAS e seu efeito sobre a expressão das quinases Aurora foram determinados com base em dois shRNAs diferentes para KRAS (#1 e #2). Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste de *Student-t* para amostras tratadas com doxiciclina (induzidas) comparadas às mesmas amostras não tratadas com doxiciclina (não induzidas).

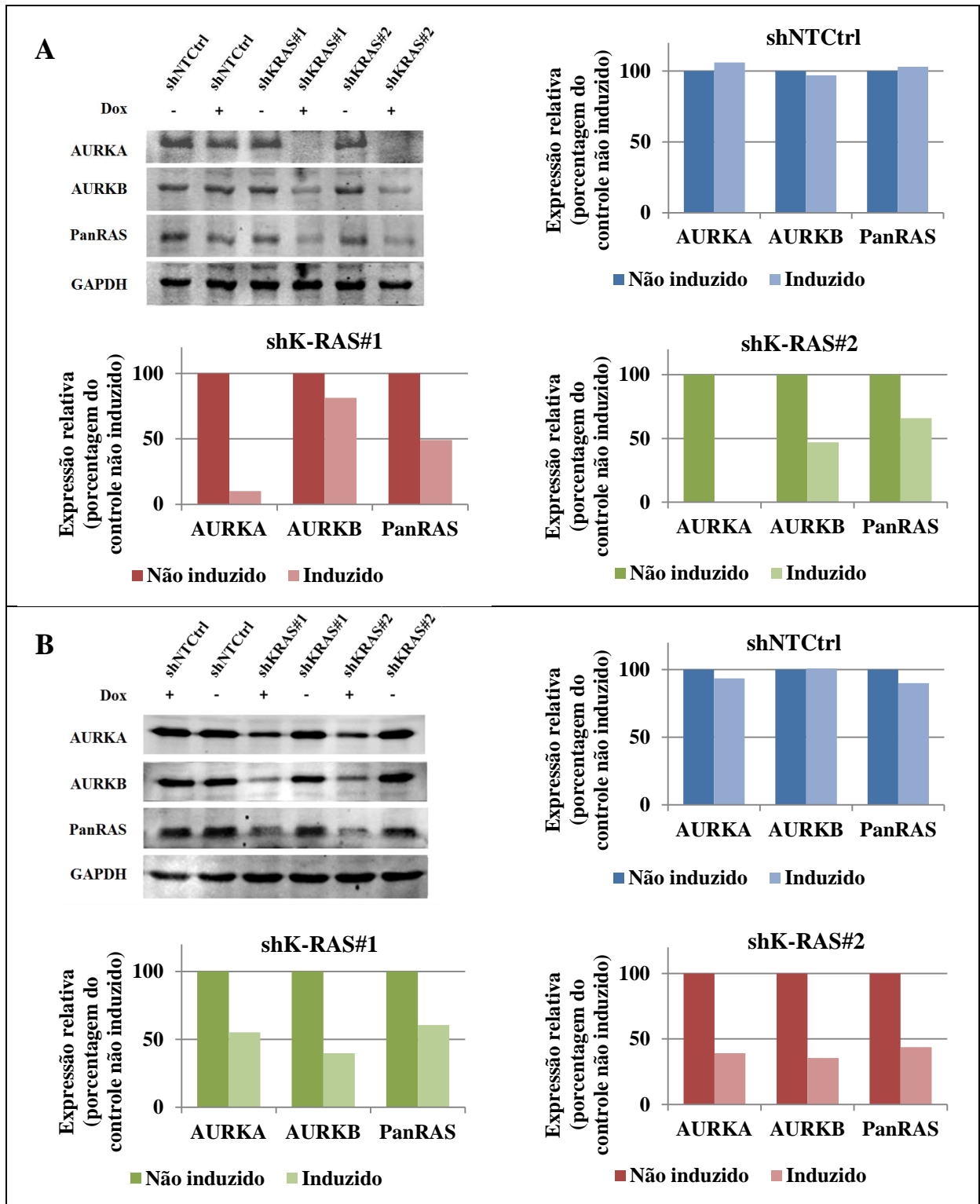


Figura 4.14. A inibição da expressão de KRAS por interferência de RNA reduz a expressão proteica das quinases Aurora A e Aurora B. Células A549 e H358 capazes de expressar de forma induzível os shRNAs indicados foram tratadas ou não com 2µg/mL de doxíciclina por 5 dias e analisadas quanto a expressão de Ras (anticorpo anti-PanRas), AURKA ou AURKB por *Western blotting*. A interferência de RNA para KRAS por meio de dois *hairpins* distintos (shKRAS#1 e shKRAS#2) é capaz de levar a uma redução da expressão proteica das quinases Aurora A e Aurora B tanto em células A549 quanto em células H358. O GAPDH foi usado como controle endógeno (*loading control*). (A, B) *Western blotting* para a expressão de Aurora A e Aurora B em função da inibição estável de KRAS em A549 (A) e H358 (B). Gráficos adjacentes: Quantificação das bandas dos géis por meio do programa *ImageJ*.

4.2.4. A inibição genética das quinases Aurora A e Aurora B em células portadoras de KRAS oncogênica promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem.

O fato das quinases Aurora estarem envolvidas na oncogênese humana (KOLLAREDDY, 2008; ARAKI, K. et al., 2004; MERALDI, P. et al., 2002; FURUKAWA, T. et al., 2006) e terem sua expressão aumentada por KRAS em células pulmonares (ver resultados anteriores), não necessariamente significa que estas quinases desempenham um papel importante na oncogênese induzida por KRAS. Para determinar a relevância da ativação destas quinases por KRAS para o fenótipo maligno, nós decidimos avaliar como a inibição da expressão de AURKA ou AURKB afeta as propriedades oncogênicas de células pulmonares humanas transformadas pelo oncogene KRAS. Para saber se a inibição de AURKA ou AURKB por interferência de RNA poderia ter algum efeito sobre o crescimento de células transformadas por KRAS, nós usamos as células A549 e H358 *knockdown* geradas, cuja inibição da expressão de KRAS, AURKA ou AURKB na presença de doxiciclina foi validada (**Figura 4.2-4.7**). Estas células foram plaqueadas e o seu crescimento monitorado ao longo de 12 dias na presença de doxiciclina. Células *knockdown* para KRAS, AURKA e AURKB mostraram menor crescimento em relação às células controle, que na presença de doxiciclina, expressam um shRNA sem homologia para genes humanos conhecidos (shNTCtrl), evidenciando, desta forma, que o crescimento destas células portadoras de KRAS oncogênica é dependente, mesmo que em parte, da expressão de AURKA ou AURKB (**Figura 4.15**).

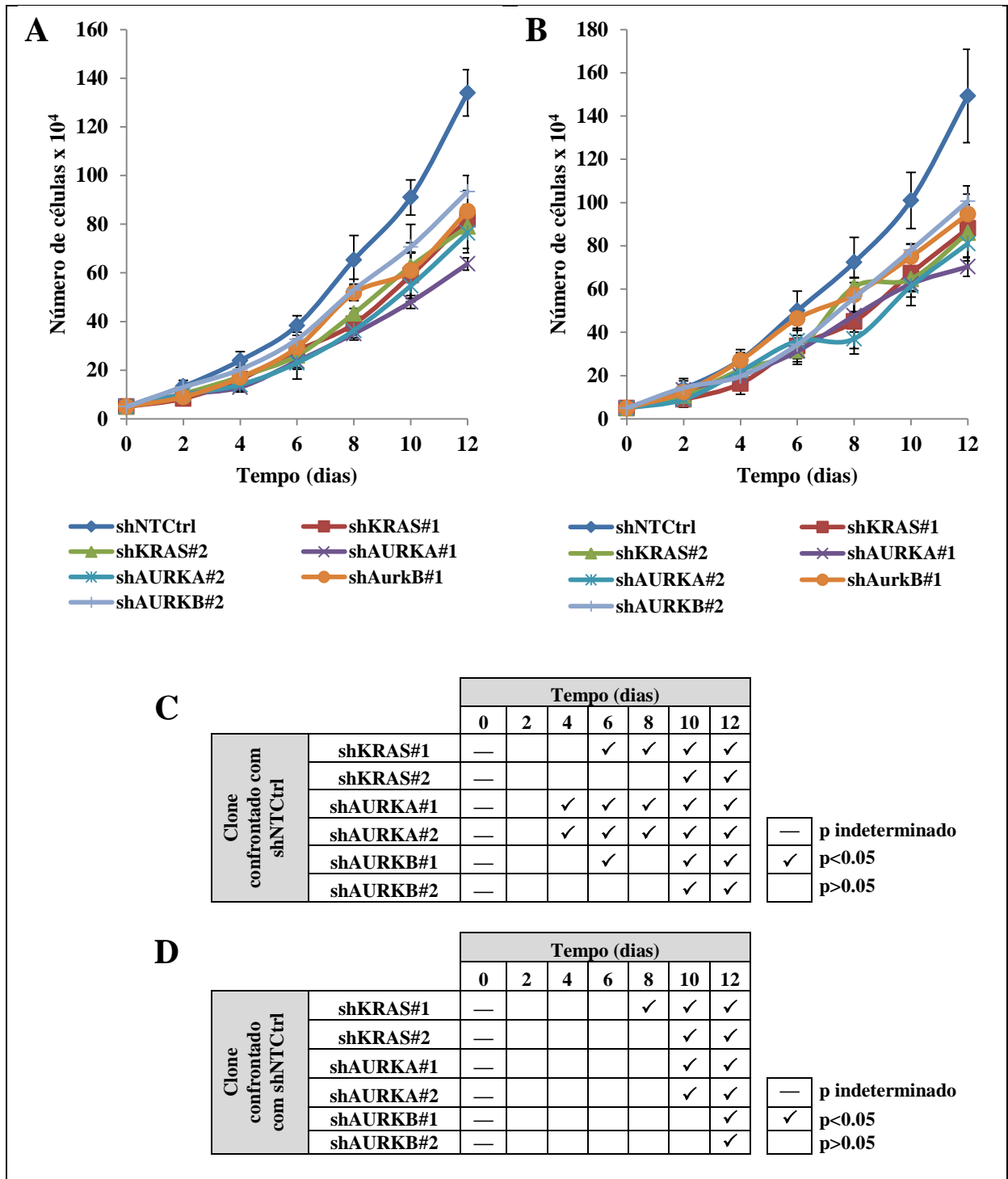


Figura 4.15. A inibição da expressão de KRAS, AURKA e AURKB por interferência de RNA reduz o crescimento celular de linhagens pulmonares portadoras de KRAS oncogênica. (A, B) Curva de crescimento para clones *knockdown* gerados a partir de células A549 (A) ou H358 (B), induzidos com 2 μ g/mL de doxiciclina ao longo de 12 dias; e (C, D) teste *t-student* para cada ponto das curvas em geradas a partir de células A549 (C) ou H358 (D). As áreas assinaladas com (✓) correspondem aos pontos da curva nos quais houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos correspondentes (shNTCtrl contra shAURKA, shAURKB ou shKRAS), com distribuição bicaudal e considerando-se uma variância desigual das duas amostras.

Posteriormente nós investigamos a capacidade dessas células em crescerem em substrato sólido, formando colônias (ensaio clonogênico), como um indicativo da viabilidade celular e observamos que a inibição da expressão de KRAS, AURKA ou AURKB reduz a viabilidade celular, dada sua capacidade reduzida de formarem colônias. (Figura 4.16).

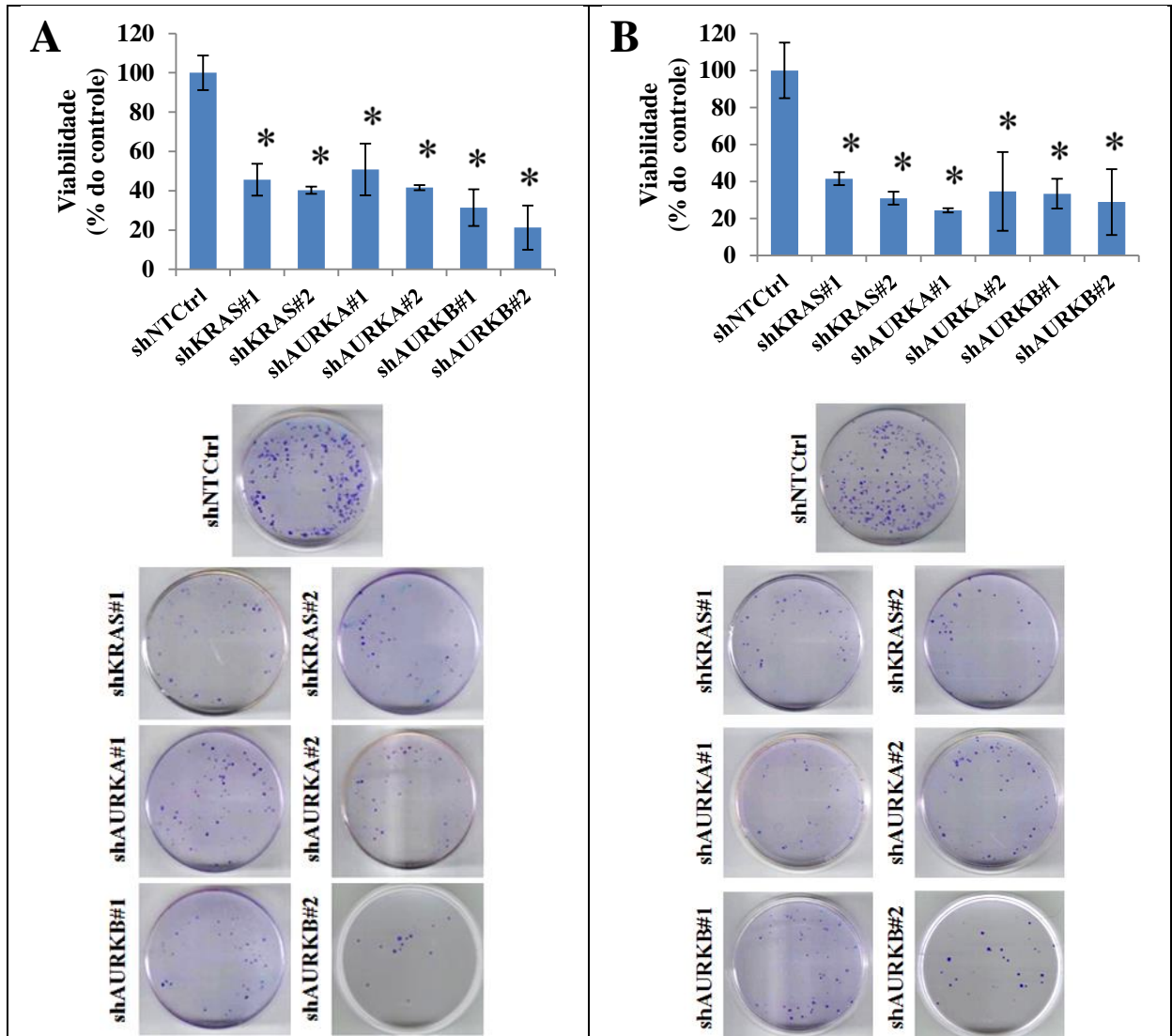


Figura 4.16. A inibição da expressão de KRAS, AURKA e AURKB por interferência de RNA reduz a viabilidade celular de linhagens pulmonares A549 e H358 portadoras de KRAS oncogênica em ensaios de formação de colônia em substrato sólido na presença de doxiciclina. (A) Ensaio clonogênico para células A549. (B) Ensaio clonogênico para células H358. **Painel superior:** gráfico representando a quantificação relativa das colônias formadas usando como referência o controle expressando o *hairpin* controle (shNTCtrl). **Painel inferior:** Imagens representativas são mostradas para cada condição estudada. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *Student-t*, para amostras comparadas ao controle shNTCtrl.

Para corroborar os resultados de viabilidade observados com os ensaios de formação de colônia, nós também decidimos analisar qual a influência da inibição das quinases Aurora A ou Aurora B sobre a viabilidade metabólica de células A549 e H358 pelo ensaio de redução do MTT (ver item 3. MATERIAIS E MÉTODOS). Os resultados mostraram que a viabilidade celular analisada desta forma também é dependente da expressão de KRAS, bem como das quinases Aurora A ou Aurora B (**Figura 4.17**).

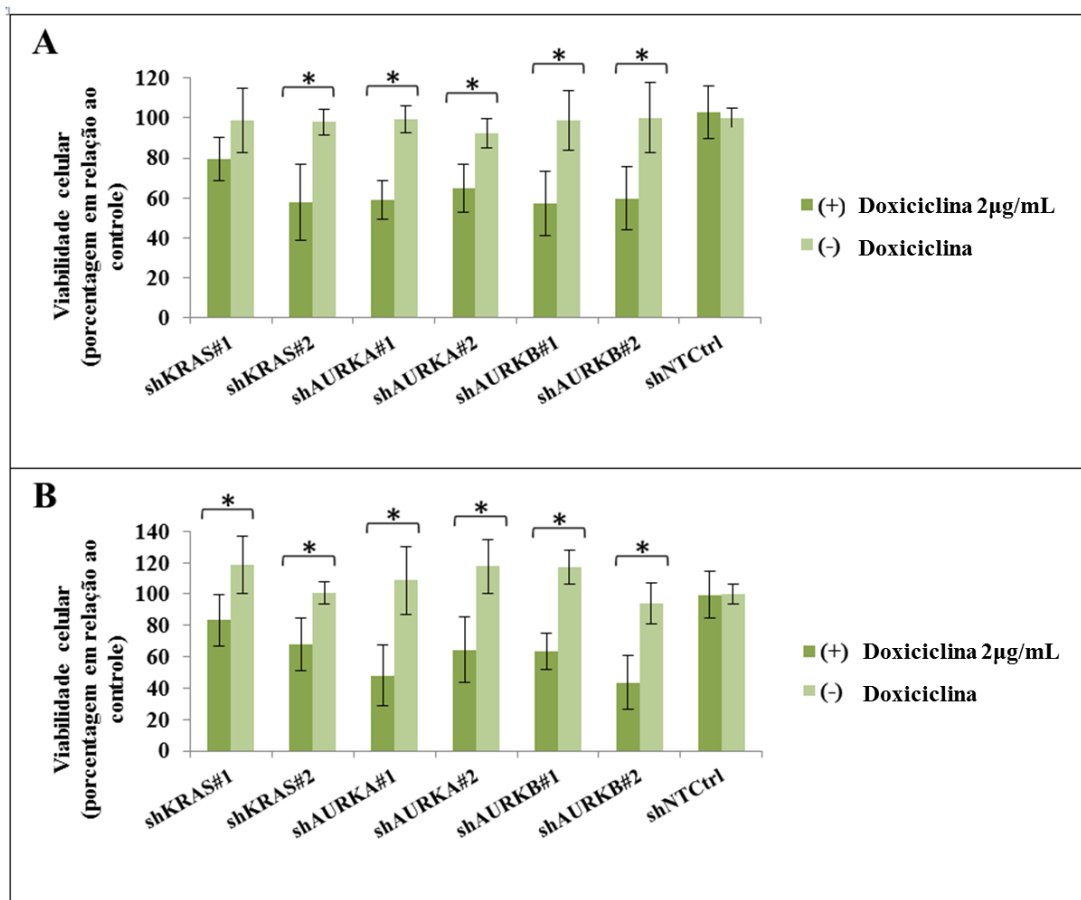


Figura 4.17. A inibição da expressão de KRAS, AURKA e AURKB por interferência de RNA reduz a viabilidade metabólica de linhagens pulmonares A549 e H358. Ensaio de viabilidade para células A549 (A) e H358 (B) portadoras de KRAS oncogênica em ensaio de redução de MTT na presença (+) ou ausência (-) de doxiciclina. O gráfico representa a quantificação por absorbância relativa da redução do MTT a Formazan usando como referência a linhagem expressando o *hairpin* controle (shNTCtrl) na presença de doxiciclina. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *Student-t*, para amostras tratadas com doxiciclina (induzidas) comparadas às mesmas amostras não tratadas com doxiciclina (não induzidas).

Tendo uma vez observado que as quinases Aurora A e Aurora B são importantes para o crescimento e viabilidade de células que apresentam mutações em KRAS (**Figuras 4.15-4.17**) e que a maioria dos tumores de pulmão induzidos por KRAS são altamente tumorigênicos quando observados *in vivo* (**BRAUN, B. S. et al., 2003; BREMBECK, F. H. et al., 2003; CAULIN, C. et al., 2004; CHAN, I. T. et al., 2004; FISHER, G. H. et al., 2001; JACKSON, E. L. et al., 2001; RAIMOND, A. R. et al., 2006; TUVESON, D. A. et al., 2004; VITALE-CROSS, L. et al., 2004**), nós decidimos investigar se as quinases Aurora A e Aurora B são também importantes para a tumorigenicidade induzida por mutações em KRAS *in vitro*, por meio de ensaios de formação de colônias independentemente de ancoragem, em substrato semissólido (ver item 3. MATERIAIS E MÉTODOS).

Nossos resultados mostram que a capacidade de células A549 e H358, que possuem KRAS oncogênica, de formarem colônias independentemente de ancoragem é menor quando da presença de um shRNA para AURKA ou AURKB, quando comparadas a um controle expressando um shRNA sem homologia a genes humanos conhecidos (shNTCtrl). Quando as células expressam um shRNA para KRAS, elas igualmente se tornam menos tumorigênicas, quando comparadas ao controle shNTCtrl (**Figura 4.18**).

Esses dados indicam que a tumorigenicidade *in vitro* de células A549 e H358 possuindo KRAS oncogênica é, em parte, dependente da expressão das quinases Aurora A e Aurora B.

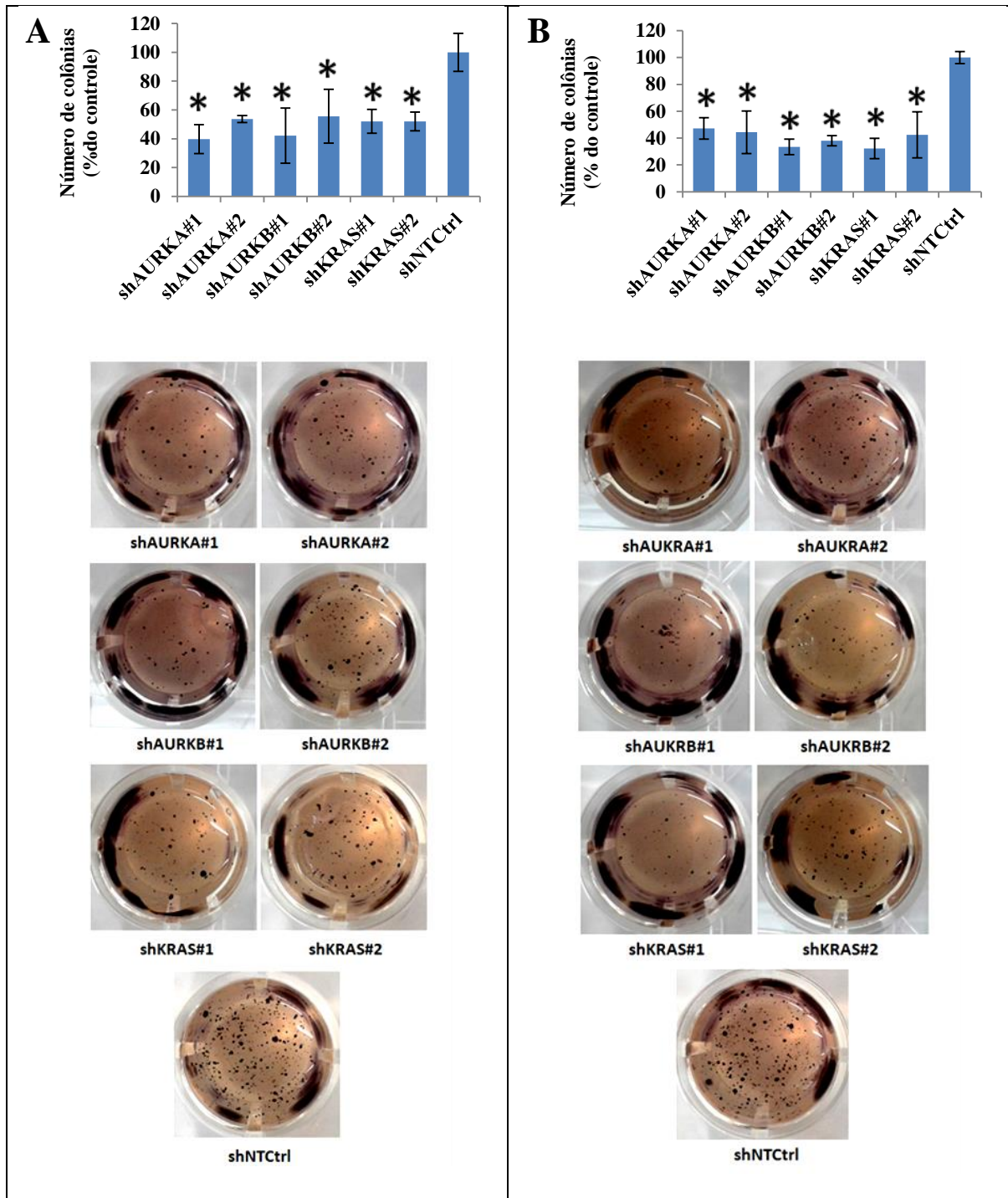


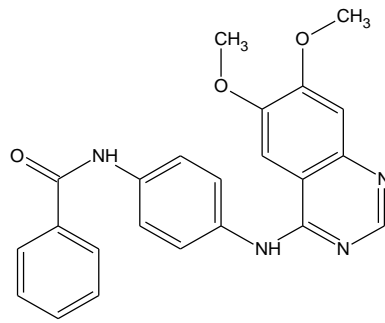
Figura 4.18. A inibição das quinases Aurora A ou Aurora B por RNA de interferência é capaz de levar a uma redução da tumorigenicidade *in vitro* das células A549 e H358. Células A549 (A) ou H358 (B) capazes de expressar diferentes shRNAs conforme indicado na figura foram plaqueadas em suspensão de agarose 0,3% e tratadas com doxiciclina por 21 dias. Ao final do experimento as colônias foram coradas com MTT e contadas. **Painel superior:** Número de colônias contadas, em relação ao controle shNTCtrl para as linhagens A549 e H358. **Painel inferior:** Imagens representativas de cada condição analisada para as linhagens A549 ou H358. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *Student-t*, para amostras comparadas ao controle shNTCtrl.

4.2.5. A inibição farmacológica das quinases Aurora A e Aurora B em linhagens tumorais portadoras de KRAS oncogênica reduz o crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem.

Uma vez tendo identificado que as quinases Aurora A e Aurora B afetam o crescimento e viabilidade de células de câncer de pulmão induzido por KRAS, nós decidimos investigar se estas quinases poderiam constituir alvos terapêuticos relevantes. Para tanto, nós investigamos se a inibição farmacológica simultânea de AURKA e AURKB é também capaz de reduzir as propriedades tumorigênicas das células portadoras de KRAS oncogênica.

Para tanto nós obtivemos um inibidor farmacológico dual, capaz de inibir concomitantemente as quinases Aurora A e Aurora B, quimicamente denominado 4-(4'-benzamidoanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina, ou, por seu nome comercial, *Aurora Kinase Inhibitor II* (Cat# 189404 Calbiochem®). Para facilitar sua nomenclatura, nós chamaremos esse inibidor de AI II. AI II (**Figura 4.19**) é um composto anilinoquinazolínico capaz de permear a membrana celular e agir como um potente e seletivo inibidor de AURKA e AURKB por competição com ATP. Uma vez que as quinases Aurora são dependentes de ATP como fonte de energia e substrato doador de grupos fosfato para a fosforilação de outras proteínas, AI II é capaz de fortemente impedir sua ação enzimática.

Para comprovar a eficácia de inibição das quinases Aurora A e Aurora B por AI II, nós investigamos o perfil de fosforilação de substratos conhecidos de AURKA e AURKB, mediante tratamento com AI II. Tanto AURKA quanto AURKB fosforilam SRC no resíduo T416 (**DO, T. V. et al., 2013**). Utilizando um anticorpo específico para fosfoT419-SRC, nós observamos que AI II leva a uma menor fosforilação de SRC. Portanto, AI II, de fato, inibe AURKA e AURKB (**Figura 4.20**).



4-(4'-benzamidoanilino)-6,7-dimetoiquinazolina

Figura 4.19. Fórmula estrutural de *Aurora Kinase Inhibitor II*.

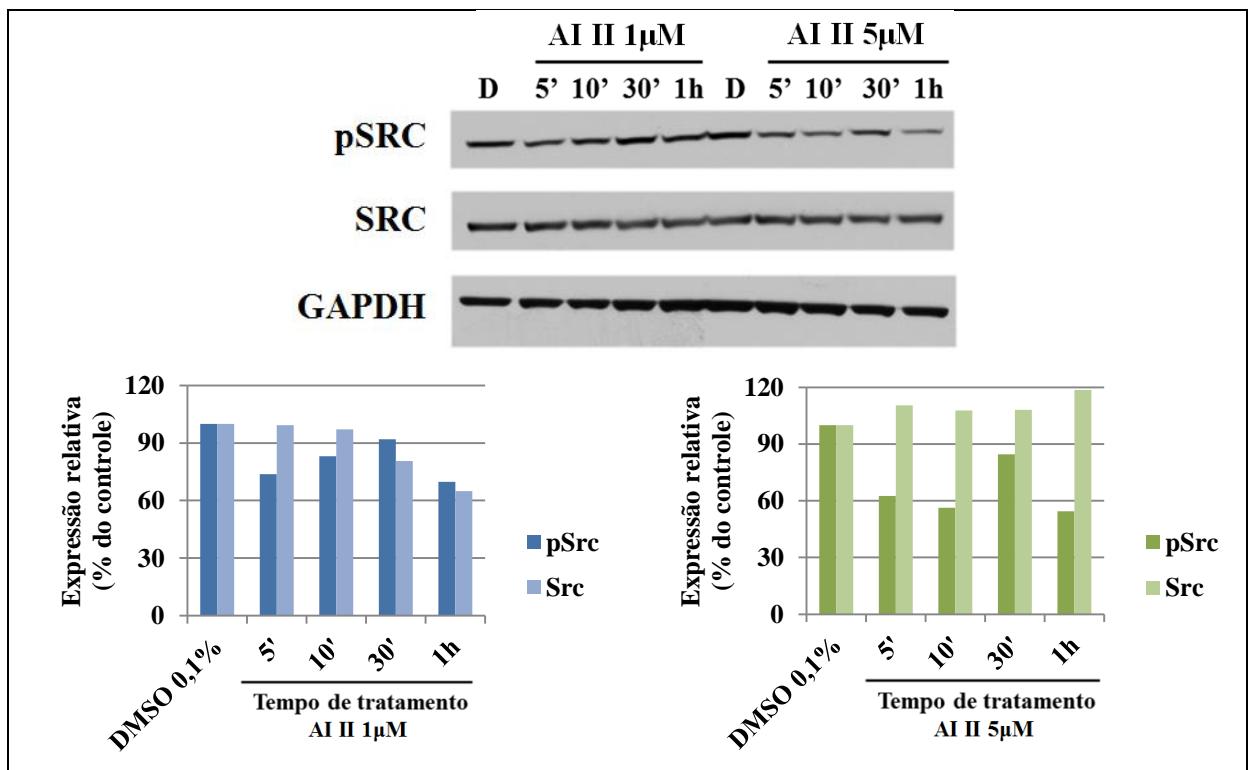


Figura 4.20. Cinética temporal da inibição das quinases Aurora A e Aurora B mediada por AI II em células A549. SRC é um substrato conhecido de ambas quinases Aurora A e Aurora B (DO, T. V. et al., 2013). A presença de AI II leva a uma menor fosforilação de SRC por inativação da atividade das quinases Aurora A e Aurora B em A549. **Painel superior:** *Western blotting* para SRC total e sua forma fosforilada. GAPDH foi utilizado como controle endógeno do experimento (*loading control*). **Painel inferior:** Gráficos da quantificação da expressão proteica de SRC e pSRC normalizada pelo controle endógeno (GAPDH) para amostras tratadas com AI II 1µM ou 5µM ao longo de 1h, ou DMSO 0.1% (D), conforme indicado na figura.

Inicialmente, para avaliar o potencial terapêutico resultante da inibição das quinases Aurora por meio do inibidor dual, específico para as AURKA e AURKB, nós realizamos ensaios de curva de crescimento das linhagens A549 e H358, portadoras de mutação oncogênica em KRAS. Nossos resultados mostram um menor crescimento celular dose-dependente em ambas as linhagens celulares tratadas com AI II (Figura 4.21).

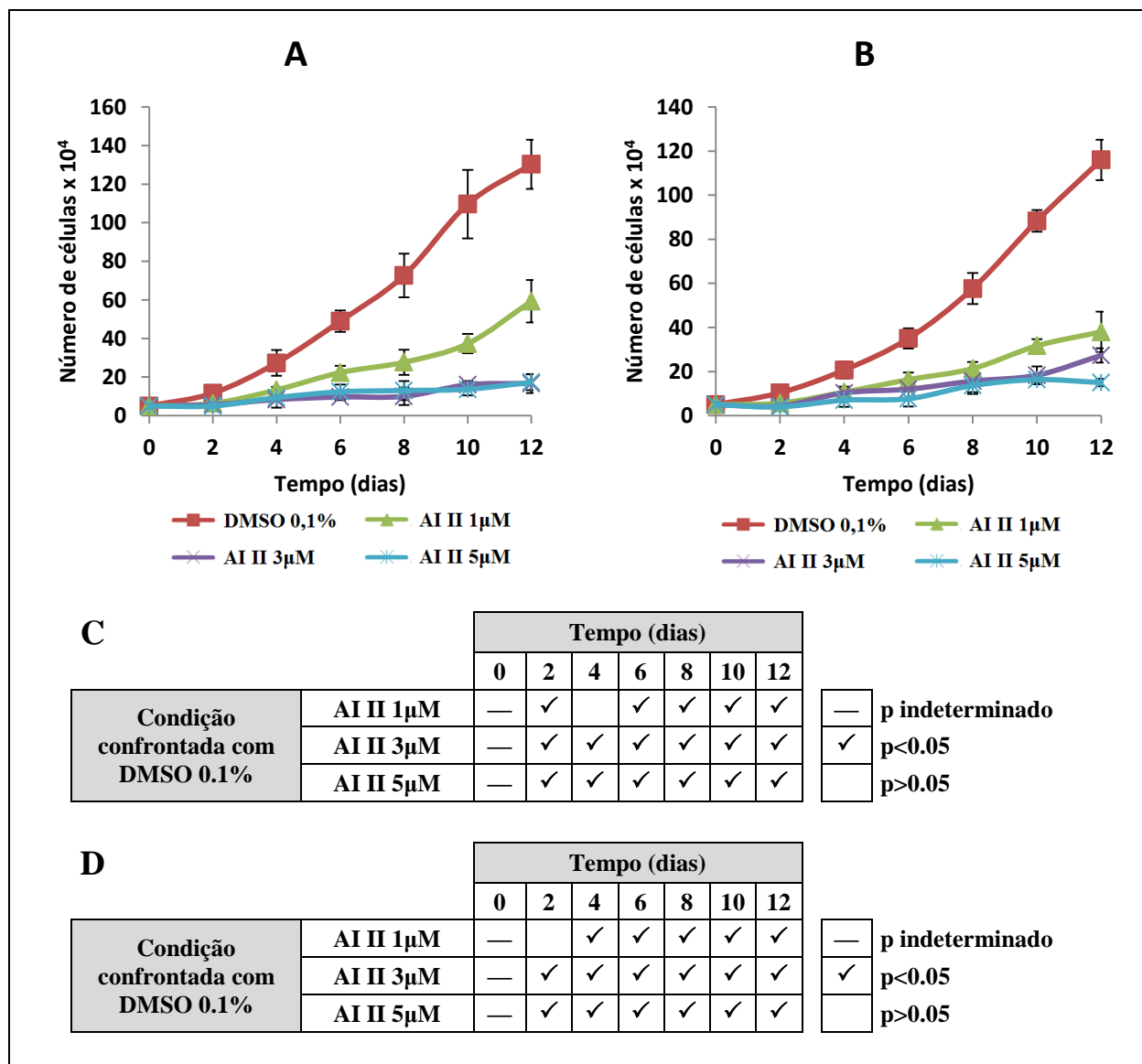


Figura 4.21. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz o crescimento de células A549 e H358. (A, B) Curva de crescimento para células A549 (A) e H358 (B) tratadas com concentrações crescentes de AI II ao longo de 12 dias. DMSO, o solvente do inibidor, foi usado como controle. (C, D) Análise estatística para cada ponto da curva para células A549 (C) e H358 (D), segundo o teste *Student-t* para amostras pareadas com o controle DMSO 0,1%. As áreas assinaladas com (✓) correspondem aos pontos da curva nos quais houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos correspondentes (DMSO 0,1% contra AI II 1, 3 ou 5μM).

Nós também investigamos os efeitos da inibição das quinases Aurora sobre viabilidade destas linhagens por meio de ensaios clonogênicos. Como pode ser visto abaixo, a inibição farmacológica de AURKA e AURKB reduz expressivamente e de maneira dose-dependente a capacidade destas células de formarem colônias em substrato sólido, indicando uma perda de viabilidade celular (**Figura 4.22**).

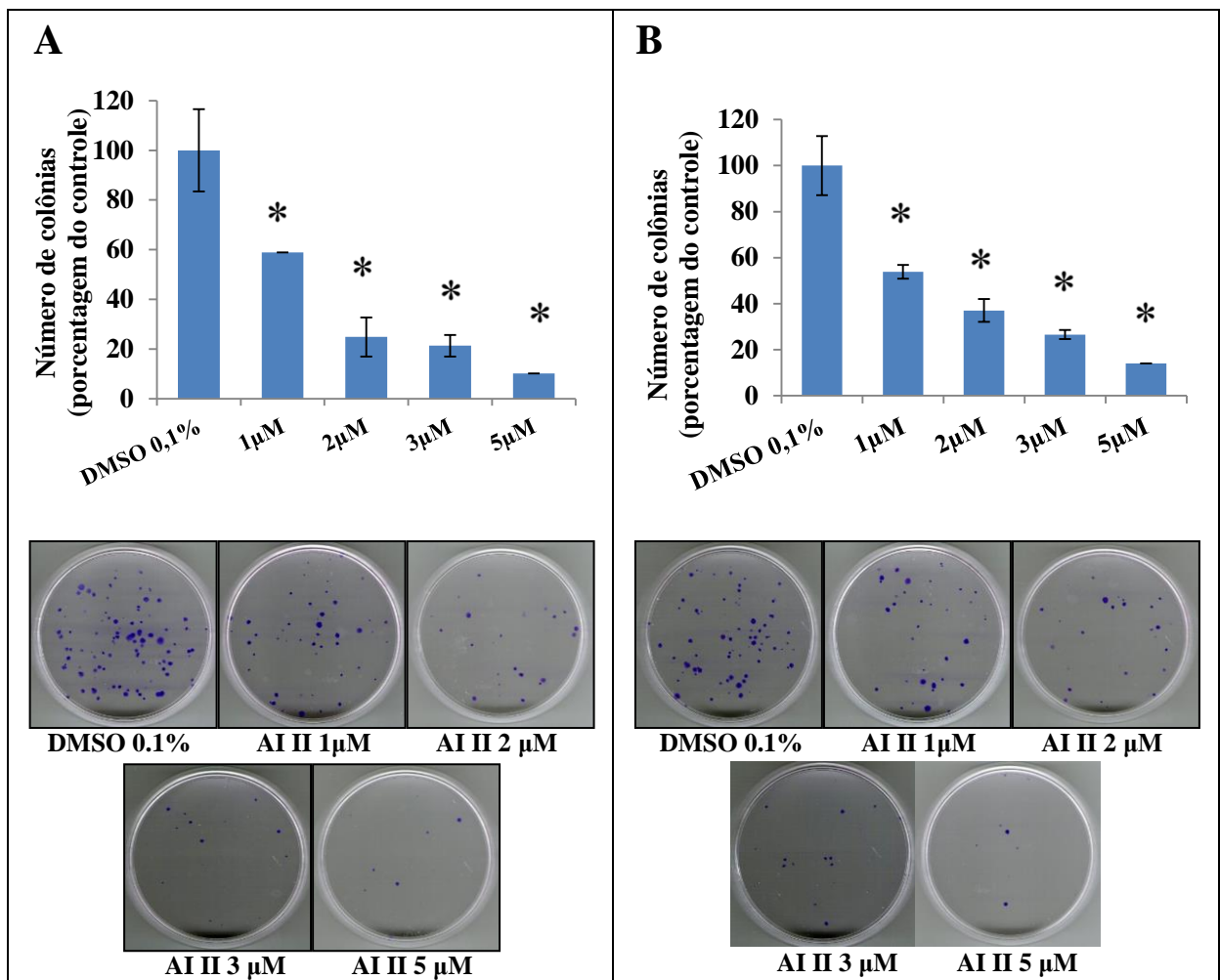


Figura 4.22. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz a capacidade de formação de colônias de células A549 e H358. (A, B) Número de colônias formadas após 12 dias de tratamento com AI II, mostradas em relação ao controle de solvente (DMSO 0.1%) para células A549 (A) e H358 (B). **Painel inferior:** Imagens representativas para cada condição testada para células A549 e H358. Análise estatística: Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *t*-student, para amostras comparadas ao controle DMSO 0,1%.

Para corroborar estes resultados, nós realizamos ensaios de viabilidade metabólica por redução de MTT a Formazan (ver item 3. MATERIAIS E MÉTODOS), e observamos que a inibição farmacológica de AURKA e AURKB também promove um decréscimo na viabilidade metabólica de modo dose-dependente (**Figura 4.23**).

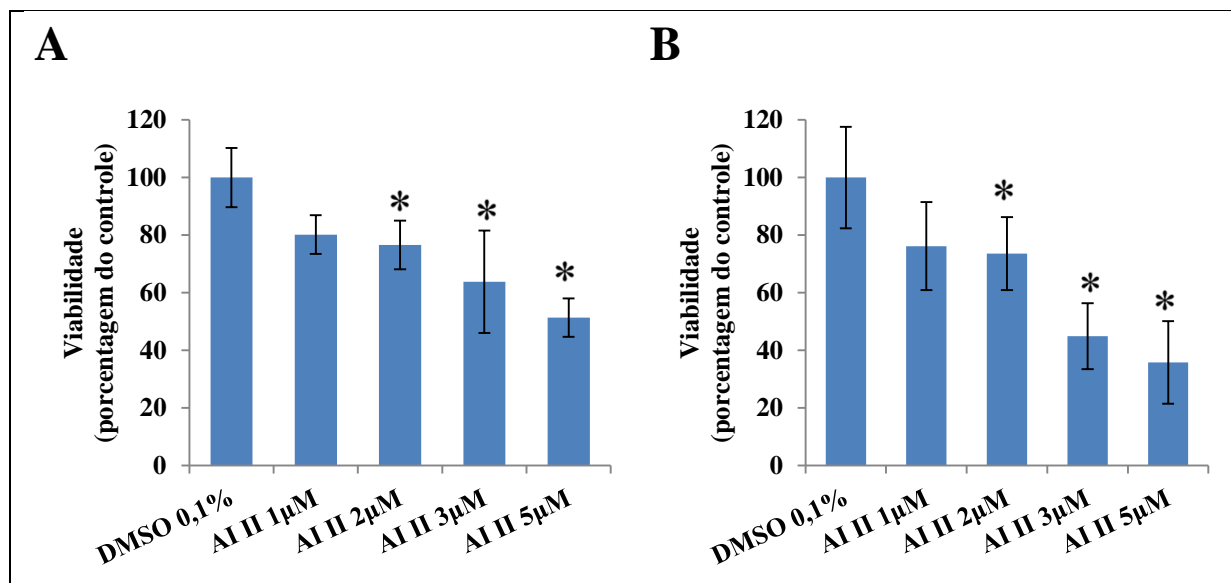


Figura 4.23. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz a viabilidade celular em A549 e H358. Células A549 (A) e H358 (B) foram igualmente tratadas com concentrações crescentes de Aurora Inhibitor II ao longo de 72h e a viabilidade metabólica analisada por redução de MTT a Formazan por meio de análise espectrofotométrica. Os resultados são mostrados em relação ao controle DMSO 0.1%. Análise estatística: (*) $p < 0,05$, de acordo com o teste Student-t, para amostras pareadas com o controle de solvente DMSO 0,1%, em ambas as linhagens.

Finalmente, como havíamos visto que a inibição da expressão de AURKA ou AURKB em A549 e H358 reduz a tumorigenicidade *in vitro* (**Figura 4.18**), nós resolvemos investigar se a inibição farmacológica dual destas quinases teria o mesmo efeito sobre estas células. A análise da tumorigenicidade (analisada por ensaio de crescimento na ausência de ancoragem) mostrou que o tratamento com AI II das linhagens celulares transformadas por KRAS A549 e H358 é capaz de reduzir a tumorigenicidade celular *in vitro* (**Figura 4.24**).

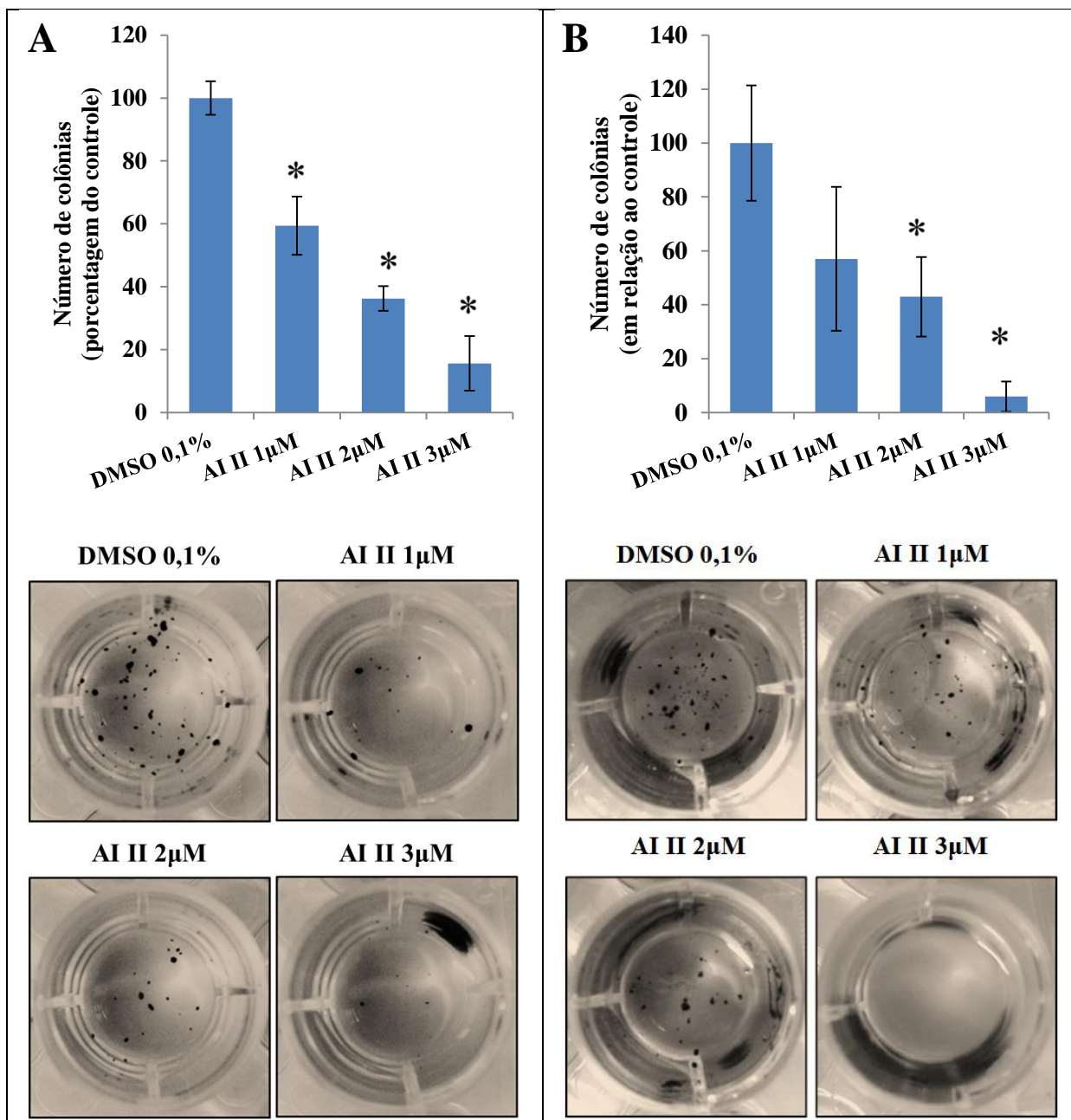


Figura 4.24. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B reduz a tumorigenicidade *in vitro*. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose para células A549 (A) e H358 (B) tratadas com Aurora Inhibitor II. **Painel superior:** Quantificação das colônias observadas. **Painel inferior:** Imagens representativas de cada condição estudada. (*) $p < 0,05$, de acordo com o teste *Student-t*, para amostras pareadas com o controle do solvente DMSO 0,1%.

4.2.6. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B em células primárias imortalizadas manipuladas para expressar constitutivamente a forma oncogênica de KRAS promove uma redução do crescimento, viabilidade, e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.

O fato das propriedades oncogênicas de células tumorais portadoras da forma oncogênica da KRAS serem diminuídas na presença de inibição genética ou farmacológica das quinases Aurora não valida automaticamente o uso destas quinases como alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. Para tal, é preciso demonstrar que a inibição destas quinases afeta preferencialmente células que expressam a forma oncogênica da KRAS, tendo um efeito reduzido ou nulo em células que não expressam esta oncoproteína.

Com o objetivo de investigar se o efeito antitumoral da inibição das quinases Aurora é específico para células transformadas por KRAS, sem afetar células não transformadas, nós usamos células pulmonares epiteliais primárias imortalizadas na ausência (denominadas células Saleb) ou na presença (denominadas células Sakras) da forma oncogênica G12V de KRAS (LUNDBERG, A.S. et al., 2002), que nós já havíamos demonstrado expressar as quinases Aurora diferencialmente em função de KRAS (Figura 4.8). Essas duas linhagens são, portanto, isogênicas, diferindo somente pela presença ou não de KRAS mutante.

Inicialmente, nós investigamos quais eram os efeitos da inibição farmacológica de AURKA e AURKB sobre o crescimento de células Saleb e Sakras. A inibição das quinases Aurora A e Aurora B por meio do inibidor farmacológico AI II não promove nenhum efeito estatisticamente significativo sobre o crescimento de células Saleb. Células Sakras

transformadas por KRAS G12V, apresentam um crescimento maior, em comparação à Saleb, porém o efeito de KRAS sobre o crescimento dessas células é anulado pelo tratamento com AI II, mostrando que as quinases Aurora A e Aurora B parecem desempenhar um papel importante no crescimento de células tumorais de modo dependente da presença de KRAS oncogênica. (Figura 4.25).

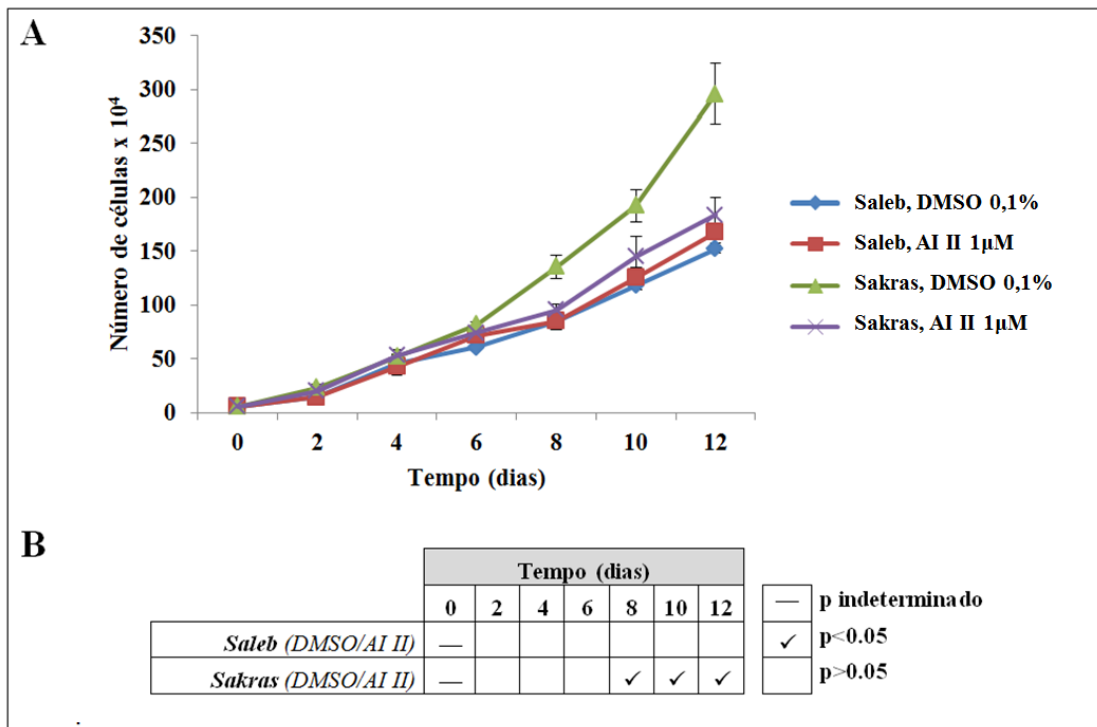


Figura 4.25. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz o crescimento celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. (A) Curva de crescimento para células primárias imortalizadas Sakras (manipuladas geneticamente para expressar constitutivamente a forma oncogênica da KRAS) e Saleb (controle experimental que não expressa a forma oncogênica de KRAS) na presença do inibidor AI II ou na ausência do inibidor (DMSO). O número de células, tempo de crescimento e concentrações do solvente (DMSO) e AI II estão indicados. (B) Análise estatística conforme o teste de *Student-t* para células tratadas com AI II em relação às mesmas células tratadas com solvente apenas (DMSO). As áreas assinaladas com (✓) correspondem aos pontos da curva nos quais houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos correspondentes (DMSO contra AI II).

Quando nós avaliamos a viabilidade dessas mesmas células em função do tratamento com AI II, por meio de ensaios de formação de colônia em substrato sólido, nós observamos que a inibição farmacológica de AURKA e AURKB é capaz de reduzir o número de colônias formadas, de modo dependente da presença de KRAS oncogênica, não afetando células tumorais que possuem somente KRAS selvagem (**Figura 4.26**).

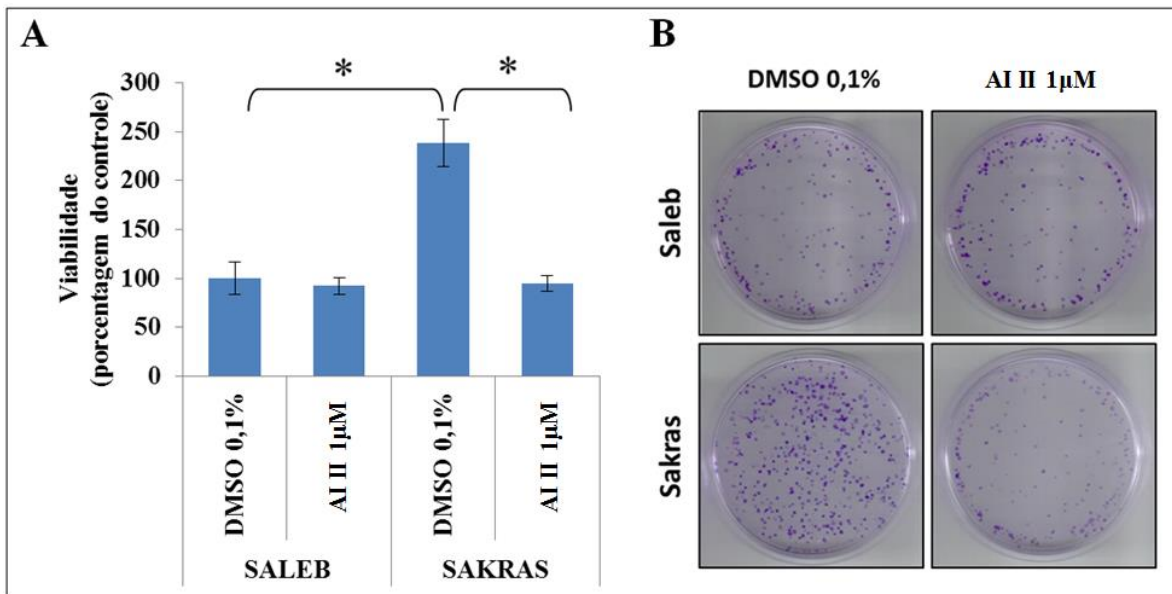


Figura 4.26. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz a capacidade de formar colônias de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. (A) Ensaio de viabilidade por formação de colônia para células primárias imortalizadas geneticamente manipuladas para expressar a forma oncogênica da KRAS (Sakras) e seu par isogênico não transformado (Saleb). (B) Imagens representativas das condições estudadas. (*) Análise estatística com $p < 0,05$, com base no teste *t-student*, para amostras comparadas aos respectivos controles não tratados.

A viabilidade dessas células também foi determinada por meio de ensaios de redução de MTT (**Figura 4.27**), onde nós pudemos observar que o tratamento com AI II é capaz de reduzir a viabilidade metabólica celular somente na presença de KRAS oncogênica (Sakras), não tendo efeitos estatisticamente significativos sobre a viabilidade de células tumorais sem mutações em KRAS (Saleb).

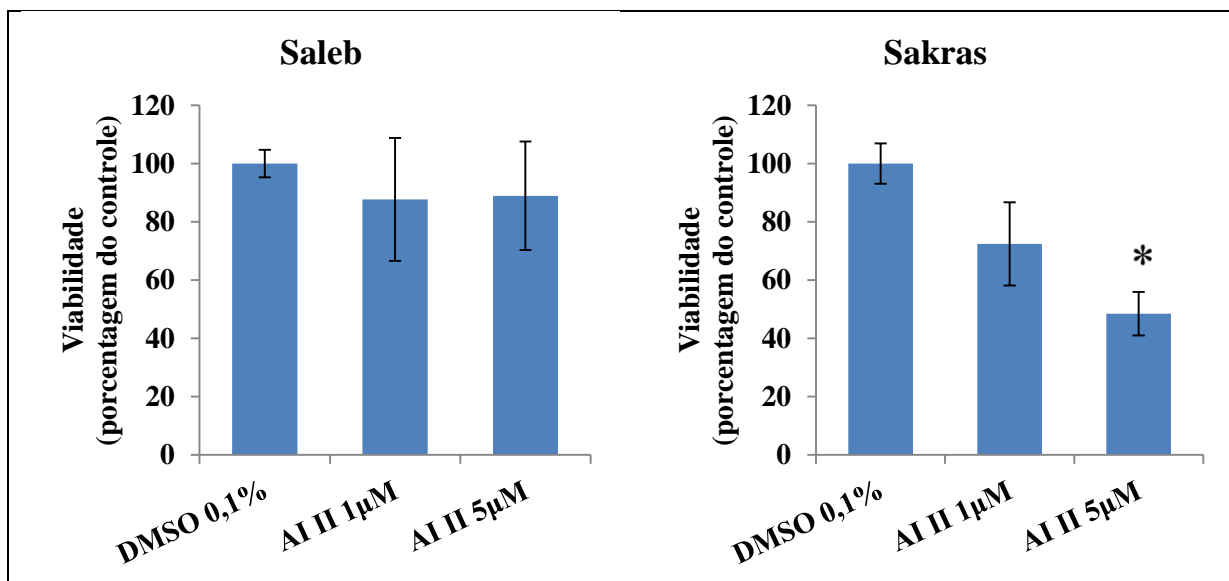


Figura 4.27. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz a viabilidade celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. Células Saleb e Sakras foram tratadas por 72h com concentrações crescentes de AI II, ou DMSO como controle, seguido da realização de ensaio de viabilidade celular por redução de MTT. (*) Análise estatística com $p < 0,05$, com base no teste *t-student*, para amostras comparadas aos respectivos controles não tratados.

Uma vez que células primárias transformadas pelo oncogene KRAS são altamente tumorigênicas, e a inibição genética ou farmacológica das quinases Aurora diminui a tumorigenicidade celular *in vitro* (**Figuras 4.18 e 4.24**), nós decidimos investigar se a redução da tumorigenicidade celular pela inibição das quinases Aurora A e B é dependente da presença da forma oncogênica de KRAS. Nós observamos que na ausência de KRAS mutante (células Saleb), as células primárias não são capazes de crescer em suspensão de agarose, não sendo, portanto consideradas transformadas. Entretanto, na presença da forma oncogênica de KRAS (células Sakras), as células primárias apresentam a capacidade de crescer em substrato semissólido e, mais importante, a inibição farmacológica de AURKA e AURKB reduz a capacidade das células Sakras de formarem colônias em suspensão de agarose (**Figura 4.28**). Estes resultados indicam que a inibição das quinases Aurora A e Aurora B reduz a tumorigenicidade celular *in vitro* de forma dependente de KRAS.

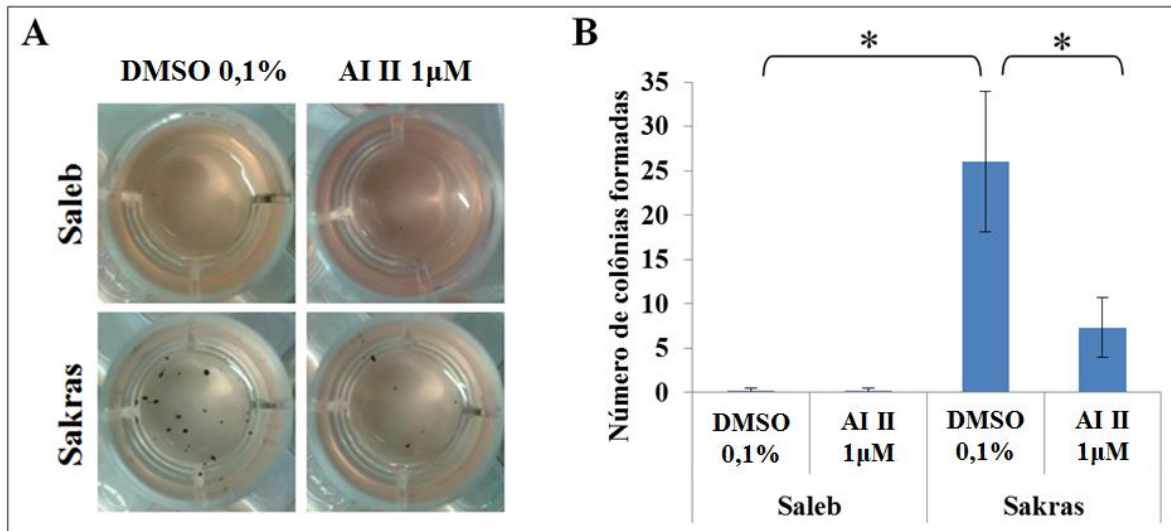


Figura 4.28. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens primárias Saleb e Sakras reduz a tumorigenicidade celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. Células Saleb e Sakras foram cultivadas ao longo de 21 dias uma suspensão de agarose 0.3% mais suplementos, tratadas diariamente com AI II 1 μ M. Como controle, utilizamos DMSO 0.1%. **(A)** Imagens representativas para cada condição testada. **(B)** Quantificação das colônias formadas. (*) Análise estatística com $p < 0,05$, com base no teste *t-student*, para amostras comparadas aos respectivos controles não tratados.

4.2.7. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B em linhagens tumorais manipuladas para expressar induzivelmente a forma oncogênica de KRAS promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui o crescimento independente de ancoragem dessas células de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.

Para que a inibição das quinases Aurora A e Aurora B possa ser uma abordagem relevante na terapia contra o câncer, é importante que os efeitos biológicos observados em decorrência da inibição farmacológica dessas quinases sejam específicos para (ou mais proeminentes em) células portadoras de mutações em KRAS. Nós já demonstramos que os efeitos antitumorais do inibidor AI II se mostraram específicos para células primárias modificadas geneticamente para expressar a forma oncogênica da KRAS, não tendo efeito sobre a linhagem primária isogênica Saleb (**Figuras 4.25-4.28**). Para corroborar estes resultados, nós realizamos uma série de ensaios biológicos em células H1703 tumorais que expressam KRAS oncogênica somente na presença de um efector indutor (doxiciclina). O uso deste modelo, por se tratar de células originalmente derivadas de tumores pulmonares, visa avaliar se o tratamento com inibidor das quinases Aurora também seria específico para células tumorais “reais” portadoras da forma oncogênica da KRAS.

Inicialmente, nós mostramos que a presença de KRAS oncogênica é necessária para a inibição do crescimento celular por AI II. Como pode ser visto na **Figura 4.29**, o tratamento com AI II de células H1703 G12V induzidas ou não a expressar a forma oncogênica de KRAS, mostra que, enquanto a inibição das quinases Aurora A e Aurora B não produz nenhum efeito sobre células que não apresentam indução de KRAS (H1703 G12V não tratadas com doxiciclina), a indução de KRAS oncogênica (H1703 G12V tratadas com doxiciclina) leva a um aumento do crescimento celular, que pode ser revertido pelo

tratamento com AI II, mostrando que os efeitos da inibição das quinases Aurora A e Aurora B sobre o crescimento destas células acontecem de forma dependente da KRAS. Por outro lado, nenhum efeito sobre o crescimento celular foi observado após o tratamento com doxiciclina e/ou AI II de células H1703 T-RexB, que não apresentam indução de KRAS oncogênica mesmo na presença de doxiciclina.

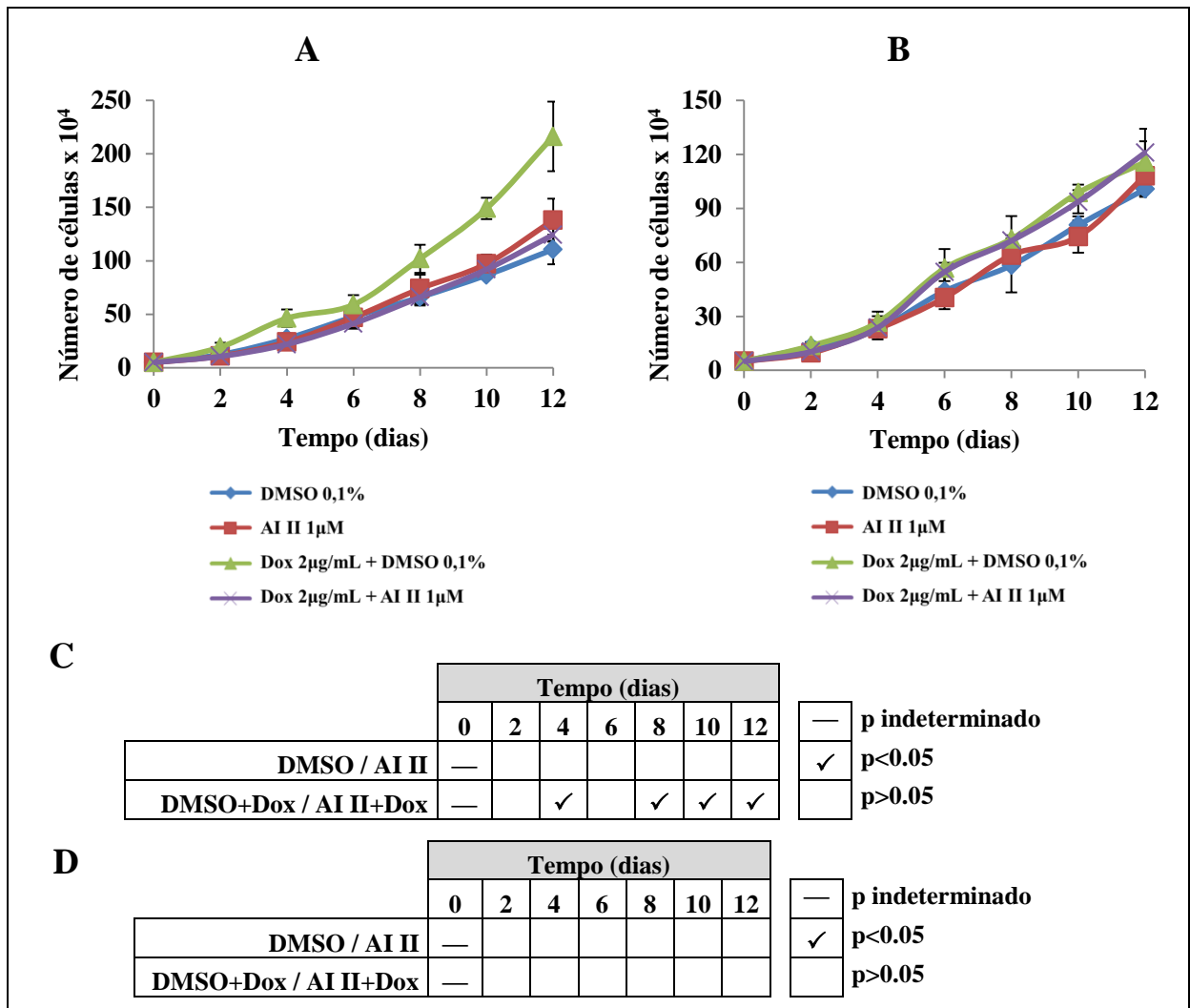


Figura 4.29. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz o crescimento celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. (A, B) Curva de crescimento para células H1703 G12V (A) ou H1703 T-RexB (B) induzidas ou não com doxiciclina (Dox) e tratadas ou não com *Aurora inhibitor II* (AI II). As concentrações usadas estão indicadas. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle de solvente do inibidor. (C, D) Análise estatística para cada ponto da curva de acordo com o teste *Student-t*, comparando-se cada condição tratada com AI II com o seu respectivo controle não marcado para células H1703 G12V (C) ou T-RexB (D).

Para avaliar se o inibidor AI II inibe a viabilidade celular de forma dependente da expressão da forma oncogênica de KRAS, nós avaliamos o efeito do inibidor AI II sobre a viabilidade de células H1703 expressando ou não KRAS oncogênica, por meio da indução com doxiciclina.

Quando células H1703 são induzidas com doxiciclina (e, portanto, expressam KRAS^{G12V}), elas apresentam um aumento de quase 100% na eficiência de plaqueamento (Dox + DMSO) (**Figura 4.30B**). Quando estas células são tratadas com AI II (Dox + AI II), nós observamos uma redução considerável na viabilidade celular, sendo a eficiência de plaqueamento reduzida para os níveis observados nas células não induzidas com doxiciclina (e que, portanto não expressam KRAS^{G12V}).

Entretanto, o efeito da inibição das quinases Aurora em células H1703 G12V que não expressam KRAS G12V (não induzidas com doxiciclina) não apresenta diferença estatisticamente significativa (compare DMSO e AI II). Como controle negativo, nós usamos a linhagem H1703 T-RexB que não expressa KRAS^{G12V} mesmo na presença de doxiciclina. Não foram observadas diferenças de viabilidade celular nesta linhagem em nenhuma das condições testadas (**Figura 4.30A**).

Do mesmo modo, nós corroboramos os resultados observados por meio da demonstração de que a viabilidade metabólica, mensurada por meio de ensaios de redução de MTT, também é diminuída quando nós tratamos células que expressam KRAS oncogênica com inibidores das quinases Aurora A e Aurora B (**Figura 4.31**).

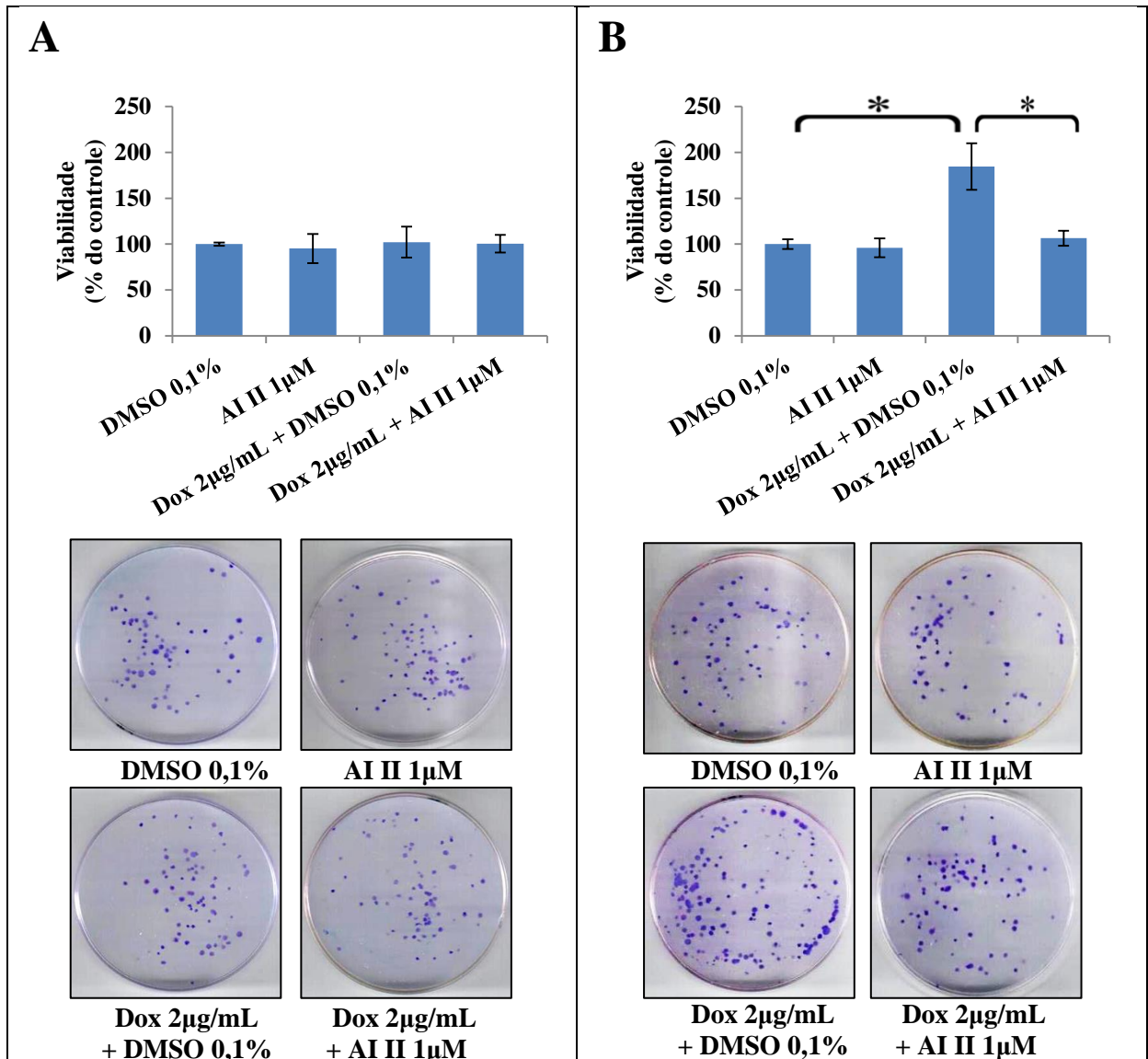


Figura 4.30. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz a capacidade de formação de colônias de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. **Painel superior:** Quantificação das colônias formadas no ensaio de formação de colônia para células H1703 T-RexB (A) ou H1703 G12V (B) tratadas ou não com doxiciclina (Dox) e tratadas ou não com 1 μ M de AI II. DMSO foi usado como controle de solvente do inibidor AI II. **Painel inferior:** Imagens representativas para cada condição testada. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *t-student*, para amostras comparadas ao controle não tratado com AI II.

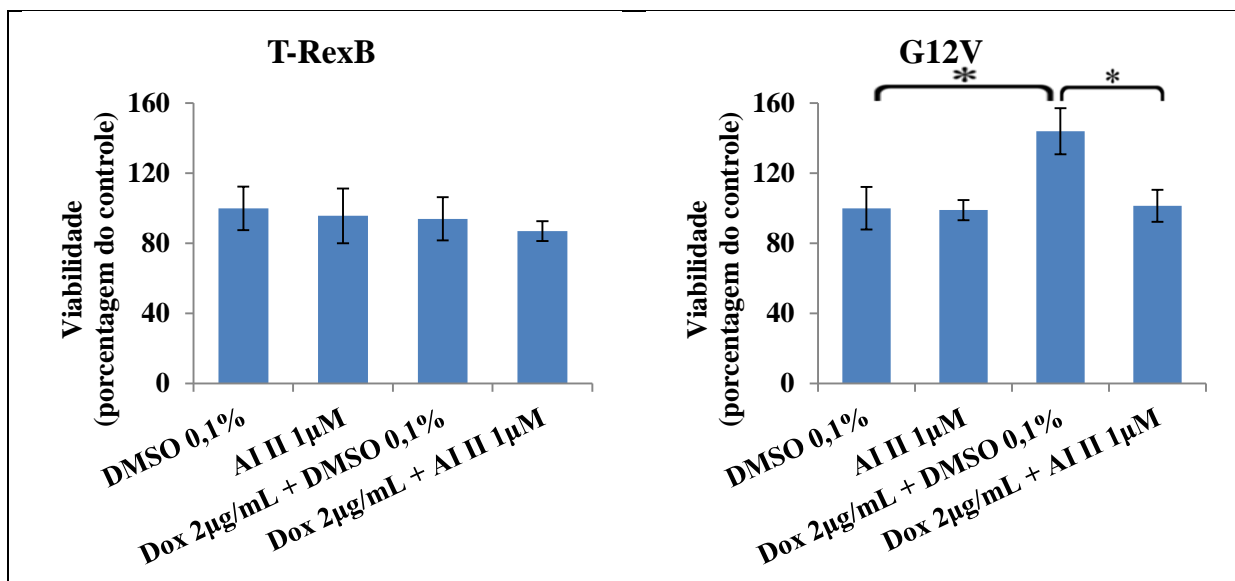


Figura 4.31. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz a viabilidade celular de forma dependente da presença de KRAS oncogênica. Células H1703 G12V e TrexB foram tratadas por 72h com concentrações crescentes de AI II (ou DMSO como controle) na presença ou ausência de doxiciclina (Dox), seguido da realização de ensaio de viabilidade celular por redução de MTT. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *t-student*, para amostras comparadas ao controle não tratado com AI II.

Para saber se a redução da tumorigenicidade de células portadoras de mutações em KRAS em função da inibição farmacológica das quinases Aurora A e B é dependente da expressão de KRAS oncogênica, nós realizamos ensaios de formação de colônias em substratos semissólidos e mostramos que o tratamento com inibidor AI II reduz a formação de colônias em suspensão de agarose de modo dependente da presença de KRAS oncogênica, não tendo nenhum efeito sobre células que expressam somente KRAS selvagem (FIGURA 4.32).

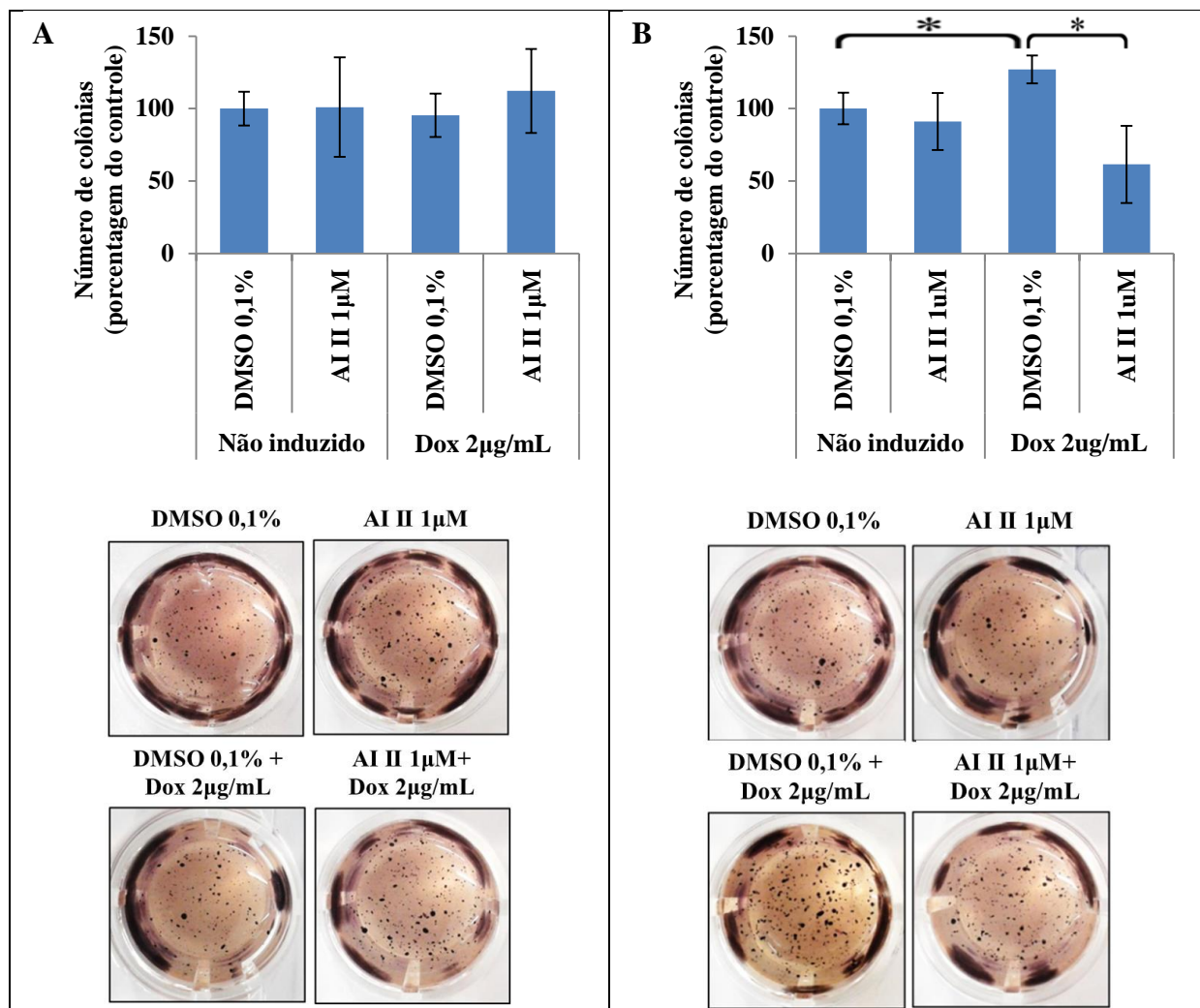


Figura 4.32. A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B nas linhagens tumorais H1703 G12V e TrexB reduz a tumorigenicidade *in vitro* de forma dependente da forma oncogênica da KRAS. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose para células H1703 T-RexB (A) e H1703 G12V (B) tratadas ou não com doxiciclina e com AI II. DMSO foi usado como controle de solvente do inibidor. **Painel superior:** Quantificação das colônias observadas. **Painel inferior:** Imagens representativas de cada condição estudada. Análise estatística: * $p < 0,05$, com base no teste *t-student*, para amostras comparadas ao controle não tratado com AI II.

Tomados juntos todos os resultados obtidos até agora, nós concluímos que as quinases Aurora A e Aurora B são efetores da via de sinalização e participam do processo oncogênico mediado por KRAS, e que sua inibição, tanto genética, quanto farmacológica, é capaz de modificar o fenótipo celular de células transformadas por KRAS, corroborando nossa hipótese de que AURKA e AURKB são potencial alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido pelo oncogene KRAS.

5. DISCUSSÃO

As alterações genéticas mais frequentemente encontradas no câncer de pulmão são mutações pontuais no gene que codifica a GTPase KRAS4B. Essas alterações tornam essa enzima permanentemente ativada biologicamente, transmitindo sinais moleculares aos seus efetores, que culminam com uma maior proliferação e sobrevivência celulares, além de resistência à morte celular. Entretanto, todos os esforços feitos até hoje na tentativa de inibir diretamente a atividade aumentada de KRAS terapeuticamente falharam (**FRIDAY, B. B. et al., 2005**) e a inibição de efetores (inibição indireta) constitui um desafio tendo em vista que a KRAS regula diversas vias que contribuem para o fenótipo maligno. Uma terapia efetiva para neoplasias dependentes de KRAS irá provavelmente envolver inibição combinada de mais de um alvo. Neste sentido, **ENGELMAN, J.A. et al., 2008** demonstraram, em um modelo animal, que a inibição combinada de dois efetores de RAS foram eficientes terapeuticamente. Apesar destes resultados preliminares promissores, faz-se necessária uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares utilizados por RAS na transformação maligna, para a identificação de alvos terapêuticos adicionais que possam contribuir para o desenvolvimento e teste de novas estratégias terapêuticas combinatórias.

Potenciais novos alvos terapêuticos racionais na oncogênese pulmonar mediada por RAS são as quinases mitóticas Aurora A e Aurora B. Conforme detalhado na introdução, estas quinases não só encontram-se superexpressas em diversas neoplasias humanas, onde contribuem para o fenótipo maligno (**WANG, X. et al, 2006; ZHANG, D. et al, 2004; ZHOU, H. et al., 1998; BISCHOFF, J.R., 1998; LITTLEPAGE, L.E., 2002; ZHANG, D. et al, 2004; NORTON, L.; MASSAGUE, J., 2006; ZHOU, H. et al., 1998; SMITH, S.L. et al., 2005; VISCHIONI, B. et al., 2006 ; XU, H.T. et al., 2006; NIKONOVA, A.S. et al.,**

2012), como também são capazes de cooperar com RAS na transformação maligna (FURUKAWA, T. et al., 2006; BOSSÙ, P. et al., 2000; KANDA, A. et al. 2005) e fosforilar componentes das vias efetoras de RAS, como o NF- κ B (BRIASSOULI, P. et al., 2007), que é capaz de potencializar a transformação maligna pulmonar induzida por KRAS (BASSÈRES, D. S. et al., 2010), bem como a GTPase Ral A, um componente da via Ral GEF, fundamental para o processo oncogênico mediado por KRAS (LIM, K.H. et al., 2005). Entretanto, até o presente trabalho não se sabia se estas quinases atuavam na oncogênese de forma dependente ou independente de RAS.

Para testar se as quinases Aurora A e Aurora B são alvos de KRAS na oncogênese pulmonar, nós investigamos em diferentes modelos de células pulmonares se a forma oncogênica da GTPase KRAS era capaz de regular a expressão das quinases Aurora A e Aurora B. Os nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a forma oncogênica da KRAS é capaz de aumentar de forma causal a expressão de ambas as quinases Aurora. Além disso nós demonstramos que este aumento de expressão ocorre ao nível transcricional.

Interessantemente, existem relatos de que os promotores dos genes AURKA e AURKB são regulados pelo fator de transcrição MYC (DEN HOLLANDER, J. et al., 2010). Isto é consistente com uma regulação transcricional por RAS, já que RAS, através das suas vias efetoras, induz a fosforilação e estabilização de MYC (BACHIREDDY, P. et al., 2005). Entretanto o mecanismo de regulação transcricional por RAS não foi investigado neste trabalho e nós não podemos descartar a possibilidade de que outros mecanismos (transcricionais e não transcricionais) possam estar envolvidos. De qualquer forma, nossos resultados confirmam a nossa hipótese de que as quinases Aurora A e Aurora B fazem parte das vias efetoras da forma oncogênica da KRAS na oncogênese pulmonar.

Para investigar se as quinases Aurora A e Aurora B contribuem para o fenótipo maligno induzido por KRAS, nós realizamos, tanto ensaios de inibição da expressão dessas quinases por interferência de RNA, como ensaios farmacológicos com um inibidor dual destas quinases em células tumorais portadoras de KRAS oncogênica e observamos que a inibição farmacológica destas quinases é capaz de reduzir o crescimento, viabilidade e tumorigenicidade *in vitro*. Estes efeitos não podem ser atribuídos inequivocamente a AURKA ou AURKB, já que o *knockdown* de AURKA, bem como de AURKB, provocou também os mesmos efeitos biológicos descritos acima.

Estes resultados não são surpreendentes tendo em vista que outros estudos em diversos modelos celulares já demonstraram que essas quinases são importantes para o crescimento, viabilidade e tumorigenicidade *in vivo* (TANAKA, H. et al., 2013; HARTSINK-SEGGERS, S.A., et al., 2013; HE, W. et al., 2013; MA, Y.X. et al., 2013; KATSHA, A. et al., 2013; ZHOU, N. et al., 2013; LIU, Y. et al., 2013; PATEL, A.V. et al., 2012). Entretanto, nossos estudos mostram que essas quinases são importantes também para o fenótipo maligno de células pulmonares transformadas pelo oncogene KRAS e a análise simultânea destas quinases sugere que elas cooperem no desenvolvimento e/ou manutenção do fenótipo maligno.

O mecanismo de perda de viabilidade e decréscimo no crescimento celular observados após a inibição das quinases Aurora A e Aurora B, embora não tenha sido demonstrado neste estudo, pode envolver tanto fatores que levam a uma diminuição da proliferação, como fatores que estimulam a morte celular. É possível também que os dois processos atuem simultaneamente e até que estejam mecanisticamente interligados. De fato, as quinases Aurora são fundamentais para divisão celular, onde controlam diversos eventos relacionados à mitose (GOTO, H. et al., 2002; HAUF, S. et al., 2003; CLARKE, P. R. et al., 2001; BAYLISS, R. et al., 2003; HSU, J. Y. et al., 2000; GOTO, H. et al., 2002; ZEITLIN, S. G.

et al., 2001; LARA-GONZALEZ, P. et al., 2012) e a inibição de sua expressão por RNA de interferência promove um acúmulo de células em fase G2, que não podem progredir no ciclo celular e acabam entrando em apoptose (**DU, J. et al., 2004; HE, W. et al., 2013; ZHOU, N. et al., 2013; GORGUN, et al., 2010**).

Mais importante do que a diminuição do crescimento e viabilidade celulares, a inibição da expressão ou atividade destas quinases diminui a capacidade de crescimento na ausência de substrato, que constitui um ensaio clássico de tumorigenicidade celular *in vitro*, uma vez que células epiteliais não transformadas não tem capacidade de formar colônias neste ensaio. Este ensaio de avaliação de tumorigenicidade *in vitro* é também o que produz resultados que melhor se correlacionam com a oncogenicidade observada *in vivo*. Um estudo recente em diferentes modelos celulares já demonstrou que a inibição destas quinases reduz a tumorigenicidade celular *in vitro* e *in vivo* (**BALDINI, E. et al., 2011**) e um possível mecanismo que pode explicar esta redução no caso da quinase AURKA é a inibição da fosforilação de LIMK2, um substrato de AURKA fundamental para a tumorigenicidade *in vivo* mediada por AURKA (**JOHNSON, E.O. et al., 2012**). Outra possibilidade é que a perda de expressão de AURKA pode levar a uma redução da farnesilação de KRAS, reduzindo sua atividade oncogênica (**YANG, G. et al., 2013**). No caso da Aurora B, a perda da tumorigenicidade pode ser explicada pelo fato de que a inibição da AURKB impede a fosforilação e ativação de CDCA8, um dos elementos constituintes do *chromosome passenger complex*, juntamente com AURKB (**SAMPATH, S.C. et al., 2004**), e que desempenha um importante papel no crescimento, tumorigenicidade e sobrevivência de células tumorais (**HAYAMA, S. et al., 2007**). Outra possível explicação para os efeitos observados é a de que AURKA e AURKB são importantes para a manutenção de tumores *in vivo* mediados por MYC (**DEN HOLLANDER, J. et al., 2010**) e que RAS induz a fosforilação e estabilização de MYC (**BACHIREDDY, P. et al., 2005**).

Apesar dos efeitos biológicos supramencionados, para que seja possível validar as quinases Aurora como alvos terapêuticos relevantes na oncogênese pulmonar mediada por KRAS, é importante demonstrar que a inibição farmacológica das mesmas afeta preferencialmente células transformadas por KRAS, sem afetar células não transformadas ou células transformadas por outros mecanismos moleculares.

Para avaliar a especificidade dos efeitos biológicos observados, nós realizamos ensaios farmacológicos com o inibidor AI II em dois pares de linhagens isogênicas que diferem apenas pela presença ou ausência da forma oncogênica da KRAS: as linhagens primárias Saleb e Sakras e as linhagens tumorais H1703 T-RexB e H1703 G12V. Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a inibição farmacológica de AURKA e AURKB é capaz de reduzir o crescimento, viabilidade e tumorigenicidade *in vitro* de forma dependente da presença de KRAS oncogênica, não tendo efeitos pronunciáveis sobre células que expressam somente KRAS selvagem endógena.

Estes resultados são condizentes com um modelo no qual as vias efetoras de KRAS levam uma ativação exacerbada de AURKA e AURKB, tornando as células portadoras de KRAS oncogênica muito mais sensíveis à inibição das quinases Aurora do que células sem mutações em KRAS. Estes resultados são importantes, não só porque eles identificam uma potencial vulnerabilidade específica de células tumorais portadoras de mutações em KRAS, mas também porque eles fornecem informações importantes para o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas para o câncer de pulmão induzido por KRAS.

Entretanto, outros estudos ainda são necessários para a caracterização das quinases Aurora A e Aurora B como potenciais alvos terapêuticos para o câncer de pulmão induzido por KRAS. Dentre eles, o estudo do mecanismo de perda de viabilidade celular (que pode ser

devido a uma menor proliferação ou maior morte celular), e a investigação dos efeitos da inibição de AURKA e AURKB sobre a migração, invasão e tumorigenicidade *in vivo*.

Um potencial problema na utilização das quinases Aurora como alvos terapêuticos é que estudos recentes têm demonstrado que o *knockdown* de AURKA e AURKB resulta em poliploidia (GIET, R. et al., 2001; CHAN, F. et al., 2007; CHEFETZ, I. et al., 2011; MANFREDI, M.G. et al., 2007; MANFREDI, M.G. et al., 2011) e que a poliploidia induz instabilidade genética (STORCHOVA, Z. et al., 2004; STORCHOVA, Z. et al., 2008; DITCHFIELD, C. et al., 2003). Por outro lado, a atividade exacerbada destas quinases também está associada à instabilidade genética, podendo contribuir para o estabelecimento do fenótipo maligno (YANG, G. et al., 2013; ARAKI, K. et al., 2004; TATSUKA, M. et al., 1998; MERALDI, P. et al., 2002). Embora nós não tenhamos aqui estudado os efeitos da inibição de AURKA e AURKB sobre a estabilidade genética de células portadoras de KRAS oncogênica, essa abordagem é importante para a caracterização das quinases Aurora como alvos terapêuticos na clínica.

Apesar deste potencial problema, inibidores farmacológicos das quinases Aurora têm sido desenvolvidos e muitos deles encontram-se já nas fases I e II da pesquisa clínica. A toxicidade desses inibidores, entretanto, é um desafio, uma vez que a maioria dos pacientes testados desenvolve neutropenia e alterações gastrointestinais, em decorrência da inibição das quinases Aurora em células normais, sobretudo em tecidos que se renovam rapidamente, como o epitélio gastrointestinal e o tecido hematopoiético (COHEN, R.B. et al., 2009). Entretanto, até o momento não existem indícios de que muitos destes inibidores possam levar a instabilidade genética, sendo que alguns já estão em fase II da pesquisa clínica e a segurança e toxicidade são avaliadas na fase I.

Além disso, alguns destes inibidores têm demonstrado, em ensaios clínicos, eficácia no tratamento de tumores sólidos que apresentam uma alta proporção de células em mitose e, portanto, proliferam rapidamente. De fato, as melhores respostas ao uso de inibidores das quinases Aurora têm sido observadas em NSCLC, que estão associados com rápido *turnover* celular (ARKENAU, H.T. et al., 2012; COHEN, R.B. et al., 2009). Portanto, até o presente momento a inibição farmacológica das quinases Aurora constitui uma abordagem terapêutica potencial, que pode vir a beneficiar pacientes portadores de tumores induzidos por KRAS.

A necessidade da inibição dual das quinases Aurora A e Aurora B é outra questão que precisa ser mais bem estudada, uma vez que alguns estudos mostram que não existem vantagens em se inibir ambas as quinases Aurora A e Aurora B e que a inibição específica da quinase Aurora A parece ser mais vantajosa, uma vez que induz mais rapidamente a parada do ciclo celular em G2/M, levando, assim, à morte celular por apoptose (WARNER, S.L. et al., 2006). Outros estudos, porém, mostram que certos tipos de tumores são mais sensíveis à inibição da quinase Aurora B (GAUTSCHI, O. et al., 2008). Por esse motivo, talvez a inibição seletiva de AURKA ou AURKB seja uma estratégia mais adequada para o tratamento de tumores.

Em conclusão, nossos resultados fornecem forte evidência de que as quinases Aurora A e Aurora B são efetores da via de sinalização de KRAS, importantes para a oncogênese mediada por mutações nesta GTPase, e que a inibição de AURKA e AURKB é uma estratégia terapêutica potencialmente relevante no câncer de pulmão induzido por KRAS.

6. CONCLUSÕES

Sumarizando todos os resultados obtidos neste trabalho, nós observamos que:

a) a presença de KRAS oncogênica em células primárias imortalizadas derivadas de epitélio pulmonar (Sakras) está correlacionada com uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B.

b) a expressão induzível da KRAS oncogênica em linhagens tumorais pulmonares (H1703 G12V) leva a uma maior expressão das quinases Aurora A e Aurora B.

c) a inibição da expressão de KRAS em células tumorais (A549 e H358) está correlacionada com uma menor expressão de Aurora A e Aurora B.

d) a inibição genética das quinases Aurora A e Aurora B em células portadoras de KRAS oncogênica (A549 e H358) promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem.

e) a inibição farmacológica das quinases Aurora A e Aurora B em linhagens tumorais portadoras de KRAS oncogênica (A549 e H358) reduz o crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem.

f) a inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B em células primárias imortalizadas manipuladas para expressar constitutivamente a forma oncogênica de KRAS (Sakras) promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui a capacidade de crescimento independente de ancoragem de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.

g) a inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B em linhagens tumorais manipuladas para expressar induzivelmente a forma oncogênica de KRAS (H1703 G12V) promove uma redução do crescimento, viabilidade e diminui as propriedades tumorigênicas dessas células de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.

BIBLIOGRAFIA

- ADDARIO, G.D.; FRUH, M. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2010; 21: 5: 116-119.
- ADJEL, A.A. Farnesyltransferase inhibitors, *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 21 (2003) 127– 144.
- ADJEL, A.A. K-ras as a target for lung cancer therapy. *J Thorac Oncol.* 2008 Jun;3(6 Suppl 2):S160-3.
- ADJEL, A.A.; DY, G.K.; ERLICHMAN, C.; REID, J.M.; SLOAN, J.A.; PITOT, H.C.; ALBERTS, S. R.; GOLDBERG, R.M.; HANSON, L.J.; ATHERTON, P.J.; WATANABE, T.; GEARY, R.S.; HOLMLUND, J.; DORR, F.A. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Jan;9(1):115-23.
- ALMOGUERA, C.; SHIBATA, D.; FORRESTER, K.; MARTIN, J.; ARNHEIM, N.; PERUCHO, M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988;53:549-54.
- ALVARADO, Y.; GILES, F.J. Ras as a therapeutic target in hematologic malignancies. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2007 May;12(2):271-84.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2012. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Detailed Guide: Lung Cancer (Non-Small Cell). Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003115-pdf.pdf>.
- ANAND, S.; PENRHYN-LOWE, S.; VENKITARAMAN, A.R.; Aurora-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 2003;3:51 – 62.
- ANDREWS, P.D.; OVECHKINA, Y.; MORRICE, N. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* 2004;6:253 – 68.
- APPELS, N.M.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *Oncologist.* 2005 Sep;10(8):565-78.

- ARAKI, K.; NOZAKI, K.; UEBA, T.; TATSUKA, M.; HASHIMOTO, N. High expression of Aurora-B/Aurora and Ipl1-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas. *J Neurooncol* 2004;67:53 – 64.
- ARKENAU, H.T.; PLUMMER, R.; MOLIFE, L.R.; OLMOS, D.; YAP, T.A.; SQUIRES, M.; LEWIS, S.; LOCK, V.; YULE, M.; LYONS, J.; CALVERT, H.; JUDSON, I. A phase I dose escalation study of AT9283, a small molecule inhibitor of aurora kinases, in patients with advanced solid malignancies. *Ann Oncol.* 2012 May;23(5):1307-13.
- ARVANITAKIS, M. Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation. *Endoscopy.* 2004 Jun;36(6):535-42.
- AVIEL-RONEN, S.; BLACKHALL, F.H.; SHEPHERD, F.A.; TSAO, M.S. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer.* 2006 Jul;8(1):30-8.
- AVRUCH, J.; KHOKHLATCHEV, A.; KYRIAKIS, J.M.; LUO, Z.; TZIVION, G.; VAVVAS, D.; ZHANG, X.F. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade, *Recent Prog. Horm. Res.* 56 (2001) 127–155.
- BACHIREDDY, P.; BENDAPUDI, P.K.; FELSHER, D.W. Getting at MYC through RAS. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4278-81.
- BAINES, A.T. ; XU, D. ; DER, C.J. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem.* 2011 Oct;3(14):1787-808.
- BALDINI, E.; ARLOT-BONNEMAINS, Y.; SORRENTI, S.; MIAN, C.; PELIZZO, M.R.; DE ANTONI, E.; PALERMO, S.; MORRONE, S.; BAROLLO, S.; NESCA, A.; MORETTI, C.G.; D'ARMIENTO, M.; ULISSE, S. Aurora kinases are expressed in medullary thyroid carcinoma (MTC) and their inhibition suppresses in vitro growth and tumorigenicity of the MTC derived cell line TT. *BMC Cancer.* 2011 Sep 26;11:411.
- BALLESTER, R.; MARCHUK, D.; BOGUSKI, M.; SAULINO, A.; LETCHER, R.; WIGLER, M.; COLLINS, F. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell.* 1990 Nov 16;63(4):851-9.
- BARBACID, M. ras genes, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 779–827.
- BARBACID, M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
- BARROS, T.P.; KINOSHITA, K.; HYMAN, A.A.; RAFF, J.W. Aurora A activates D-TACCMsps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *J Cell Biol* 2005;170:1039 – 46.
- BASSÈRES, D. S. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 2010 May 1;70(9):3537-46. Epub 2010.

- BAYLISS, R.; SARDON, T.; VERNOS, I.; CONTI, E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell* 2003;12:851–62.
- BENTIREN-ALJ, M.; KONTARIDIS, M.I.; NEEL, B.G. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med.* 2006;12:283-5.
- BERDNIK, D.; KNOBLICH, J.A. *Drosophila* Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol* 2002;12:640 – 7.
- 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 (2002) 171– 181.
- BERNARD, M.; SANSEAU, P.; HENRY, C.; COUTURIER, A.; PRIGENT, C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* Aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics.* 1998;53:406–409.
- 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.* 1998; 17:3052-65.
- BOLTON, M.A.; LAN, W.; POWERS, S.E.; MCCLELAND, M.L.; KUANG, J.; STUKENBERG, P.T. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2002;13:3064–77.
- BONNER, T.I.; KERBY, S.B.; SUTRAVE, P.; GUNNELL, M.A.; MARK, G.; RAPP, U.R. Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene, *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 1400– 1407.
- BOONSTRA, J.; RIJKEN, P.; HUMBEL, B.; CREMERS, F.; VERKLEIJ, A.; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. The epidermal growth factor, *Cell Biol. Int.* 19 (1995) 413– 430.
- BORIACK-SJODIN, P.A.; MARGARIT, S.M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature.* 1998 Jul 23;394(6691):337-43.
- BORIACK-SJODIN, P.A.; MARGARIT, S.M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos, *Nature* 394 (1998) 337– 343.
- BOS, J.L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989 Sep 1;49(17):4682-9.
- BOS, J.L.; FEARON, E.R.; HAMILTON, S.R.; VERLAAN-DE VRIES, M.; VAN BOOM, J.H.; VAN DER EB, A.J.; VOGELSTEIN, B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers, *Nature* 327 (1987) 293–297.

- BOSSÙ, P. et al. 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.
- BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE / INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. - Vigilância de tabagismo em escolares. Dados e fatos de 12 capitais brasileiras. Vol 1, Rio de Janeiro, 2004.
- BRAUN, B.S. Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 13;101(2):597-602. Epub 2003 Dec 29.
- BREMBECK, F.H. The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2005-9.
- BRIASSOULI, P. Aurora-A Regulation of NF- κ B Signaling by Phosphorylation of NF- κ B *Cancer Res.*, 67: 1689-1695, 2007.
- BRITTEN, C.D.; ROWINSKY, E.K.; SOIGNET, S.; PATNAIK, A.; YAO, S.L.; DEUTSCH, P.; LEE, Y.; LOBELL, R.B.; MAZINA, K.E.; MCCREERY, H.; PEZZULI, S.; SPRIGGS, D. A phase I and pharmacological study of the farnesyl protein transferase inhibitor L-778,123 in patients with solid malignancies, *Clin. Cancer Res*. 7 (2001) 3894– 3903.
- BROGNARD, J.; CLARK, A.S.; NI, Y.; DENNIS, P.A. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation, *Cancer Res*. 61 (2001) 3986– 3997.
- BRUMMELKAMP, T.R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference, *Cancer Cell* 2 (2002) 243– 247.
- BURGERING, B.M.; COFFER, P.J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995 Aug 17;376(6541):599-602.
- BYRNE, J.L.; PATERSON, H.F.; MARSHALL, C.J. p21Ras activation by the guanine nucleotide exchange factor Sos, requires the Sos/Grb2 interaction and a second ligand-dependent signal involving the Sos N-terminus. *Oncogene*. 1996 Nov 21;13(10):2055-65.
- CANTRELL, D.A. GTPases and T cell activation, *Immunol. Rev*. 192 (2003) 122– 130.
- CARPINO, N.; WISNIEWSKI, D.; STRIFE, A.; MARSHAK, D.; KOBAYASHI, R.; STILLMAN, B.; CLARKSON, B. p62 (dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell*. 1997 Jan 24;88(2):197-204.
- CARY, L.A.; HAN, D.C.; GUAN, J.L. Integrin-mediated signal transduction pathways, *Histol. Histopathol*. 14 (1999) 1001–1009.

- CASTELLANO, E.; SANTOS, E. Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but So Different. *Genes & Cancer*. 2011, 2(3) 216–231
- CASTRO, A.; ARLOT-BONNEMAINS, Y.; VIGNERON, S.; LABBE, J.C.; PRIGENT, C.; LORCA, T. APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* 2002;3: 457 – 62.
- CASTRO, A.; VIGNERON, S.; BERNIS, C.; LABBE, J.C, PRIGENT, C.; LORCA, T. The D-Boxactivating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent DBox sequence of Aurora-A. *EMBO Rep* 2002;3:1209 – 14.
- CAULIN, C. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5054-8.
- 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 (2004) 5054–5058.
- CAVALCANTE, T.M. O controle do tabagismo no Brasil: avanços e desafios. *Rev. Psiqu. Clín.* 32 (5); 283-300, 2005.
- CAZALES, M.; SCHMITT, E.; MONTEBAULT, E.; DOZIER, C.; PRIGENT, C.; DUCOMMUN, B. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 2005;4:1233 – 8.
- CHAN, F.; SUN, C.; PERUMAL, M.; NGUYEN, Q.D.; BAVETSIAS, V.; MCDONALD, E.; MARTINS, V.; WILSHER, N.E.; RAYNAUD, F.I.; VALENTI, M. Mechanism of action of the aurora kinase inhibitor CCT129202 and in vivo quantification of biological activity. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:3147–3157.
- CHAN, I.T. et al. Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(4):528-38.
- 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 (2004) 528–538.
- CHANG, E.H.; GONDA, M.A.; ELLIS, R.W.; SCOLNICK, E.M.; LOWY, D.R. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 August; 79(16): 4848–4852.
- CHEETHAM, G.M.; KNEGTEL, R.M.; COLL, J.T. Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 2002;277:42419 – 22.
- 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 NFkB pathway. *Cell Cycle*. 2011;10:2206–2214.

- CHEN, G.; OH, S.; MONIA, B.P.; STACEY, D.W. Antisense oligonucleotides demonstrate a dominant role of c-Ki-RAS proteins in regulating the proliferation of diploid human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28259–28265.
- CHIEFFI, P.; COZZOLINO, L.; KISSLINGER, A.; LIBERTINI, S.; STAIBANO, S.; MANSUETO, G.; DE ROSA, G.; VILLACCI, A.; VITALE, M.; LINARDOPOULOS, S.; PORTELLA, G.; TRAMONTANO, D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation, *Prostate*, 66: 326-333, 2006.
- CICHOWSKI, K.; JACKS, T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*. 2001;104:593-604.
- CLARKE, P.R.; ZHANG, C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? *Trends Cell Biol* 2001;11:366 – 71.
- CLARKE, S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues, *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1992) 355– 386.
- COHEN, R.B.; JONES, S.F.; AGGARWAL, C. A phase I dose-escalation study of Danusertib (PHA-739358) administered as a 24-hour infusion with and without granulocyte colony-stimulating factor in a 14-day cycle in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15(21): 6694-701.
- COLEMAN, W.B.; THRONEBURG, D.B.; GRISHAM, J.W.; SMITH, G.J. Overexpression of c-K-ras, c-N-ras and transforming growth factor beta co-segregate with tumorigenicity in morphologically transformed C3H 10T1/2 cell lines, *Carcinogenesis* 15 (1994) 1005– 1012.
- CORRAL, T.; JIMENEZ, M.; HERNANDEZ-MUNOZ, I.; PEREZ DE CASTRO, I.; PELLICER, A. NF1 modulates the effects of Ras oncogenes: evidence of other NF1 function besides its GAP activity, *J. Cell. Physiol.* 197 (2003) 214– 224.
- COWLEY, S.; PATERSON, H.; KEMP, P.; MARSHALL, C.J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, *Cell* 77 (1994) 841–852.
- CRANE, R.; KLOEPFER, A.; RUDERMAN, J.V. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci* 2004;117:5975 – 83.
- CRANE, R.; KLOEPFER, A.; RUDERMAN, J.V. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci* 2004;117:5975 – 83.
- CUNNINGHAM, C.C. A Phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma. *Cancer* 2001;92:1265-71.

- D'ADAMO, D.R.; NOVICK, S.; KAHN, J.M.; LEONARDI, P.; PELLICER, A. rsc: a novel oncogene with structural and functional homology with the gene family of exchange factors for Ral, *Oncogene* 14 (1997) 1295– 1305.
- DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN, H.; GARNETT, M.J.; BOTTOMLEY, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; HAWES, R.; HUGHES, J.; KOSMIDOU, V.; MENZIES, A.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAYATILAKE, H.; GUSTERSON, B.A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRITCHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX-TRENCH, G.; RIGGINS, G.J.; BIGNER, D.D.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICHOLSON, A.; HO, J.W.; LEUNG, S.Y.; YUEN, S.T.; WEBER, B.L.; SEIGLER, H.F.; DARROW, T.L.; PATERSON, H.; MARAIS, R.; MARSHALL, C.J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (2002) 949– 954.
- DE BRUYN, K.M.; DE ROOIJ, J.; WOLTHUIS, R.M.; REHMANN, H.; WESENBEEK, J.; COOL, R.H.; WITTINGHOFER, A.H.; BOS, J.L. RalGEF2, a pleckstrin homology domain containing guanine nucleotide exchange factor for Ral, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29761– 29766.
- DELAVAL, B. ; FERRAND, A. ; CONTE, N. Aurora B -TACC1 protein complex in cytokinesis. *Oncogene* 2004;23:4516 – 22.
- DEN HOLLANDER, J.; RIMPI, S.; DOHERTY, J.R.; RUDELIUS, M.; BUCK, A.; HOELLEIN, A.; KREMER, M.; GRAF, N.; SCHEERER, M.; HALL, M.A.; GOGA, A.; VON BUBNOFF, N.; DUYSER, J.; PESCHEL, C.; CLEVELAND, J.L.; NILSSON, J.A.; KELLER, U. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood*. 2010 Sep 2;116(9):1498-505.
- DER, C.J. The ras family of oncogenes. *Cancer Treat Res.* 1989;47:73-119.
- 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 (1982) 3637–3640.
- DERGHAM, S.T.; DUGAN, M.C.; KUCWAY, R.; DU, W.; KAMARAUSKIENE, D.S.; VAITKEVICIUS, V.K.; CRISSMAN, J.D.; SARKAR, F.H. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma, *Int. J. Pancreatol.* 21 (1997) 127–143.
- DI MAGLIANO, M.P.; LOGSDON, C.D. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(6):1220-9.
- DITCHFIELD, C.; JOHNSON, V.L.; TIGHE, A. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 2003;161:267 – 80.

- DO, T.V.; XIAO, F.; BICKEL, L.E.; KLEIN-SZANTO, A.J.; PATHAK, H.B.; HUA, X.; HOWE, C.; O'BRIEN, S.W.; MAGLATY, M.; ECSEDY, J.A.; LITWIN, S.; GOLEMIS, E.A.; SCHILDER, R.J.; GODWIN, A.K.; CONNOLLY, D.C. Aurora kinase A mediates epithelial ovarian cancer cell migration and adhesion. *Oncogene*. 2013 Jan 21.
- DOWNWARD, J. PI 3-kinase, Akt and cell survival, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 177–182.
- DOWNWARD, J.; GRAVES, J.D.; WARNE, P.H.; RAYTER, S.; CANTRELL, D.A. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature*. 1990 Aug 23;346(6286):719–23.
- DU, J.; HANNON, G.J. Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8975 – 80.
- DUDEK, H.; DATTA, S.R.; FRANKE, T.F.; BIRNBAUM, M.J.; YAO, R.; COOPER, G.M.; SEGAL, R.A.; KAPLAN, D.R.; GREENBERG, M.E. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997 Jan 31;275(5300):661-5.
- DUURSMA, A.M.; AGAMI, R. Ras interference as cancer therapy, *Semin. Cancer Biol.* 13 (2003) 267– 273.
- DYKES, D.C.; BRANDT-RAUF, P.; LUSTER, S.M.; CHUNG, D.; FRIEDMAN, F.K.; PINCUS, M.R. Activated conformations of the ras-gene-encoded p21 protein: I. An energy-refined structure for the normal p21 protein complexed with GDP, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9 (1992) 1025– 1044.
- DYKES, D.C.; BRANDT-RAUF, P.; LUSTER, S.M.; FRIEDMAN, F.K.; PINCUS, M.R. Activated conformations of the ras-gene-encoded p21 protein: II. Comparison of the computed and high-resolution X-ray crystallographic structures of Gly-12 p21, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 10 (1993) 905–918.
- EBINU, J.O.; BOTTORFF, D.A.; CHAN, E.Y.; STANG, S.L.; DUNN, R.J.; STONE, J.C. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*. 1998 May 15;280(5366):1082-6.
- ELLIS, C.A.; CLARK, G. The importance of being K-Ras. *Cell Signal.* 12, 425-434 (2000).
- 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 (2001) 131– 137.
- ENGELMAN, J.A.; CHEN, L.; TAN, X.; CROSBY, K.; GUIMARAES, A.R.; UPADHYAY, R. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008;14:1351-6

- EYERS, P.A.; ERIKSON, E.; CHEN, L.G.; MALLER, J.L. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol.* 2003 Apr 15;13(8):691-7.
- FARNSWORTH, C.L.; FRESHNEY, N.W.; ROSEN, L.B.; GHOSH, A.; GREENBERG, M.E.; FEIG, L.A. Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature.* 1995 Aug 10;376(6540):524-7.
- FINNEY, R.; HERRERA, D. Ras-Raf complexes: analyses of complexes formed in vivo, *Methods Enzymol.* 255 (1995) 310– 323.
- FISCHLE, W.; TSENG, B.S.; DORMANN, H.L. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 2005;438: 1116 – 22.
- FISHER, G.H. 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.* 2001 Dec 15;15(24):3249-62.
- FLEMING, J.B. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K- ras-directed therapy. *Mol Cancer Res.* 2005 Jul;3(7):413-23.
- FRANKE, T.F.; YANG, S.I.; CHAN, T.O.; DATTA, K.; KAZLAUSKAS, A.; MORRISON, D.K.; KAPLAN, D.R.; TSICHLIS, P.N. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* 1995 Jun 2;81(5):727-36.
- FRIDAY, B.B.; ADJEI, A.A. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1756 (2005) 127 – 144
- FRIDAY, B.B.; ADJEI, A.A. K-ras as a target for cancer therapy. *BiochimBiophysActa* 2005;1756:127-44.
- FURUKAWA, T.; SUNAMURA, M.; HORII, A. Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2006 Jan;97(1):1-7.
- GALIANA, C.; LOZANO, J.C.; BANCEL, B.; NAKAZAWA, H.; YAMASAKI, H. High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus, *Mol. Carcinog.* 14 (1995) 286– 293.
- GAUTSCHI, O.; HEIGHWAY, J.; MACK, P.C.; PURNELL, P.R.; LARA, P.N.; GANDARA, D.R. Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer Res* 2008; 14(6): 1639-48.
- GEORGES, R.N.; MUKHOPADHYAY, T.; ZHANG, Y.; YEN, N.; ROTH, J.A. Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct, *Cancer Res.* 53 (1993) 1743– 1746.
- GERBER, D.E.; MINNA, J.D. ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 2010;18:548-51.

- GHOBRAL, I.M.; ADJEL, A.A. Inhibitors of the ras oncogene as therapeutic targets, *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 16 (2002) 1065–1088.
- GHOSH, S.; MOORE, S.; BELL, R.M.; DUSH, M. Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45690– 45696.
- GIET, R.; GLOVER, D.M. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 2001;152:669 – 82.
- GIET, R.; MCLEAN, D.; DESCAMPS, S. Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol* 2002;156:437 – 51.
- GOEPFERT, T.M.; ADIGUN, Y.E.; ZHONG, L.; GAY, J.; MEDINA, D.; BRINKLEY, W.R. Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 2002;62:4115 – 22.
- GONZALEZ-GARCIA, A.; PRITCHARD, C.A.; PATERSON, H.F.; MAVRIA, G.; STAMP, G.; MARSHALL, C.J. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis, *Cancer Cell* 7 (2005) 219–226.
- GOTO, H.; YASUI, Y.; KAWAJIRI, A. Aurora-B regulates the cleavage furrowspecific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* 2003; 278:8526 – 30.
- GOTO, H.; YASUI, Y.; NIGG, E.A.; INAGAKI, M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine-28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells.* 2002;7:11–17.
- GOYDOS, J.S.; MANN, B.; KIM, H.J.; GABRIEL, E.M.; ALSINA, J.; GERMINO, F.J.; SHIH, W.; GORSKI, D.H. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma, *J. Am. Coll. Surg.* 200 (2005) 362– 370.
- GRADY, W.M.; MARKOWITZ, S.D. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:101-28.
- GRAY, G.D.; HERNANDEZ, O.M.; HEBEL, D.; ROOT, M.; POW-SANG, J.M.; WICKSTROM, E. Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice, *Cancer Res.* 53 (1993) 577–580.
- GRITSKO, T.M.; COPPOLA, D.; PACIGA, J.E.; YANG, L.; SUN, M.; SHELLEY, S.A.; FIORICA, J.V.; NICOSIA, S.V.; CHENG, J.Q. Activation and Overexpression of Centrosome Kinase BTAK/Aurora-A in Human Ovarian Cancer, *Clin.Cancer Res.*, 9: 1420-1426, 2003.

- GUSE, A.; MISHIMA, M.; GLOTZER, M. Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol* 2005;15:778 – 86.
- HALL, A. The ras gene family. *Oxf Surv Eukaryot Genes*. 1984;1:111-44.
- HALUSKA, P.; DY, G.K.; ADJEI, A.A. Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents, *Eur. J. Cancer* 38 (2002) 1685– 1700.
- HANNAK, E.; KIRKHAM, M.; HYMAN, A.A.; OEGEMA, K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2001;155:1109 – 16.
- HANNON, G.J. RNA interference. *Nature* 418 (2002) 244–251.
- HARTSINK-SEGGERS, S.A.; ZWAAN, C.M.; EXALTO, C.; LUIJENDIJK, M.W.; CALVERT, V.S.; PETRICOIN, E.F.; EVANS, W.E.; REINHARDT, D.; DE HAAS, V.; HEDTJÄRN, M.; HANSEN, B.R.; KOCH, T.; CARON, H.N.; PIETERS, R.; DEN BOER, M.L. Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target. *Leukemia*. 2013 Mar;27(3):560-8.
- HARVEY. J.J. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* 204, 1104 - 1105 (12 December 1964)
- HAUF, S.; COLE, R.W.; LATERRA, S.; ZIMMER, C.; SCHNAPP, G. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 2003;161:281–294.
- HAWKINS, P.T.; EGUINO, A.; QIU, R.G.; STOKOE, D.; COOKE, F.T.; WALTERS, R.; WENNSTRÖM, S.; CLAESON-WELSH, L.; EVANS, T.; SYMONS, M. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*. 1995 Apr 1;5(4):393-403.
- HAYAMA, S.; DAIGO, Y.; YAMABUKI, T.; HIRATA, D.; KATO, T.; MIYAMOTO, M.; ITO, T.; TSUCHIYA, E.; KONDO, S.; NAKAMURA, Y. Phosphorylation and Activation of Cell Division Cycle Associated 8 by Aurora Kinase B Plays a Significant Role in Human Lung Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 67: 4113-4122, 2007.
- HE, W.; ZHANG, M.G.; WANG, X.J.; ZHONG, S.; SHAO, Y.; ZHU, Y.; SHEN, Z.J. AURKA suppression induces DU145 apoptosis and sensitizes DU145 to docetaxel treatment. *Am J Transl Res*. 2013 Apr 19;5(3):359-67.
- HEINICKE, T.; RADZIWILL, G.; NAWRATH, M.; ROMMEL, C.; PAVLOVIC, J.; MOELLING, K. Retroviral gene transfer of dominant negative raf-1 mutants suppresses ha-ras-induced transformation and delays tumor formation, *Cancer Gene Ther*. 7 (2000) 697–706.
- HELDIN, C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction, *Cell* 80 (1995) 213– 223.

- HENNING, S.W.; CANTRELL, D.A. GTPases in antigen receptor signalling, *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1998) 322– 339.
- HIROTA, T. ; KUNITOKU, N. ; SASAYAMA, T. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 2003;114:585 – 98.
- HIROTA, T.; LIPP, J.J.; TOH, B.H.; PETERS, J.M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 2005;438: 1176 – 80.
- HOLMLUND, J.T.; MONIA, B.P.; KWOH, T.J.; DORR, F.A. Toward antisense oligonucleotide therapy for cancer: ISIS compounds in clinical development, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1 (1999) 372– 385.
- HOLSTEIN, S.A.; HOHL, R.J. Is there a future for prenyltransferase inhibitors in cancer therapy? *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Dec;12(6):704-9.
- HSU, J.Y. ; SUN, Z.W. ; LI, X. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 2000;102:279 – 91.
- HUANG, J.W.; CHEN, C.L.; CHUANG, N.N. P120-GAP associated with syndecan-2 to function as an active switch signal for Src upon transformation with oncogenic ras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2005) 855– 862.
- HUANG, J.W.; CHEN, C.L.; CHUANG, N.N. Trap RACK1 with Ras to mobilize Src signaling at syndecan-2/p120-GAP upon transformation with oncogenic ras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 1087– 1094.
- HUTTERER, A.; BERDNIK, D.; WIRTZ-PEITZ, F.; ZIGMAN, M.; SCHLEIFFER, A.; KNOBLICH, J.A. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev Cell* 2006;11:147 – 57.
- JACKSON, E. L. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 2001 Dec 15;15(24):3243-8.
- 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. U. S. A.* 91 (1994) 12730–12734.
- JAFFEE, E.M.; HRUBAN, R.H.; CANTO, M.; KERN, S.E. Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell.* 2002;2:25-8.
- JINGYAN, F.U.; MINGLEI, B.; QING JIANG, Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:1-10.
- JOHNSON, E.O.; CHANG, K.H.; GHOSH, S.; VENKATESH, C.; GIGER, K.; LOW, P.S.; SHAH, K. LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. *J Cell Sci.* 2012 Mar 1;125(Pt 5):1204-16.

- JOHNSON, L.M.; JAMES, K.M.; CHAMBERLAIN, M.D.; ANDERSON, D.H. Identification of key residues in the A-Raf kinase important for phosphoinositide lipid binding specificity, *Biochemistry* 44 (2005) 3432–3440.
- KANDA, A.; KAWAI, H.; SUTO, S.; KITAJIMA, S.; SATO, S.; TAKATA, T.; TATSUKA, M. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene*. 2005 Nov 10;24(49):7266-72.
- KATAYAMA, H. ; OTA, T. ; JISAKI, F. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1160 – 2.
- KATAYAMA, R.; SHAW, A.T.; KHAN, T.M.; MINO-KENUDSON, M.; SOLOMON, B.J.; HALMOS, B.; JESSOP, N.A.; WAIN, J.C.; YEO, A.T.; BENES, C.; DREW, L.; SAEH, J.C.; CROSBY, K.; SEQUIST, L.V.; IAFRATE, A.J.; ENGELMAN, J.A. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med*. 2012 Feb 8;4(120):120ra17. doi: 10.1126/scitranslmed.3003316. Epub 2012 Jan 25.
- KATO, K.; COX, A.D.; HISAKA, M.M.; GRAHAM, S.M.; BUSS, J.E.; DER, C.J. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 6403– 6407.
- KATSHA, A.; SOUTTO, M.; SEHDEV, V.; PENG, D.; WASHINGTON, M.K.; PIAZUELO, M.B.; TANTAWY, M.N.; MANNING, H.C.; LU, P.; SHYR, Y.; ECSEDY, J.; BELKHIRI, A.; EL-RIFAI, W. Aurora Kinase A Promotes Inflammation and Tumorigenesis in Mice and Human Gastric Neoplasia. *Gastroenterology*. 2013 Aug 29. pii: S0016-5085(13)01270-5.
- KAUFFMANN-ZEH, A.; RODRIGUEZ-VICIANA, P.; ULRICH, E.; GILBERT, C.; COFFER, P.; DOWNWARD, J.; EVAN, G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*. 1997 Feb 6;385(6616):544-8.
- KAWAJIRI, A.; YASUI, Y.; GOTO, H. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol Biol Cell* 2003;14:1489 – 500.
- KIM, I.M.; ACKERSON, T.; RAMAKRISHNA, S.; TRETIAKOVA, M.; WANG, I.C.; KALIN, T.V.; MAJOR, M.L.; GUSAROVA, G.A.; YODER, H.M.; COSTA, R.H.; KALINICHENKO, V.V. The Forkhead Box m1 Transcription Factor Stimulates the Proliferation of Tumor Cells during Development of Lung Cancer, *Cancer Res.*, 66: 2153-2161, 2006.
- KIMURA, M.; MATSUDA, Y.; YOSHIOKA, T.; OKANO, Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human Aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem*. 1999;274:7334–7340.

- KINBARA, K.; GOLDFINGER, L.E.; HANSEN, M.; CHOU, F.L.; GINSBERG, M.H. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 767– 776.
- KINOSHITA, K.; NOETZEL, T.L.; PELLETIER, L. Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J Cell Biol* 2005;170:1047 – 55.
- KIRSTEN, W.H.; SCHAUF, V.; MCCOY, J. Properties of a murine sarcoma virus. *Bibl Haematol.* 1970;(36):246-9.
- KOLLAREDDY, M.; DZUBAK, P.; ZHELEVA, D.; HAJDUCH, M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008 Jun;152(1):27-33.
- KRANENBURG, O.; GEBBINK, M.F.; VOEST, E.E. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1654 (2004) 23– 37.
- KRESSNER, U.; BJORHEIM, J.; WESTRING, S.; WAHLBERG, S.S.; PAHLMAN, L.; GLIMELIUS, B.; LINDMARK, G.; LINDBLOM, A.; BORRESEN-DALE, A.L. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 518– 521.
- KUNITOKU, N. ; SASAYAMA, T. ; MARUMOTO, T. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* 2003;5:853 – 64.
- LANDEN, C.N.; LIN, Y.G.; IMMANENI, A.; DEAVERS, M.T.; MERRITT, W.M.; SPANNUTH, W.A.; BODURKA, D.C.; GERSHENSON, D.M.; BRINKLEY, W.R.; SOOD, A.K. Overexpression of the Centrosomal Protein Aurora-A Kinase is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer Patients, *Clin.Cancer Res.*, 13: 4098-4104, 2007.
- LARA-GONZALEZ, P.; WESTHORPE, F.G.; TAYLOR, S.S. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol.* 2012 Nov 20;22(22):R966-80.
- LEDWITH, B.J.; MANAM, S.; KRAYNAK, A.R.; NICHOLS, W.W.; BRADLEY, M.O. Antisense-fos RNA causes partial reversion of the transformed phenotypes induced by the c-Ha-ras oncogene, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 1545– 1555.
- LEE, E.; KEAM, B.; KIM, D.W.; KIM, T.M.; LEE, S.H.; CHUNG, D.H.; HEO, D.S. Erlotinib Versus Gefitinib for Control of Leptomeningeal Carcinomatosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2013 Jun 25.
- LEE, M.J.; GERGELY, F.; JEFFERS, K.; PEAK-CHEW, S.Y.; RAFF, J.W. Msp/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat Cell Biol* 2001;3:643 – 9.
- LI, D.; ZHU, J.; FIROZI, P.F.; ABBRUZZESE, J.L.; EVANS, D.B.; CLEARY, K.; FRIESS, H.; SEN, S. Overexpression of Oncogenic STK15/BTAK/Aurora A Kinase in Human Pancreatic Cancer, *Clin.Cancer Res.*, 9: 991-997, 2003.

- LIEBMANN, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity, *Cell. Signal.* 13 (2001) 777–785.
- LIM, K.H.; BAINES, A.T.; FIORDALISI, J.J.; SHIPITSIN, M.; FEIG, L.A.; COX, A.D.; DER, C.J.; COUNTER, C.M. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell.* 2005 Jun;7(6):533-45.
- LIN, Y.S.; SU, L.J.; YU, C.T.; WONG, F.H.; YEH, H.H. Gene expression profiles of the Aurora family kinases. *Gene Expr.* 2006;13:15–26.
- LIU, Y.; HAWKINS, O.E.; SU, Y.; VILGELM, A.E.; SOBOLIK, T.; THU, Y.M.; KANTROW, S.; SPLITTGERBER, R.C.; SHORT, S.; AMIRI, K.I.; ECSEDY, J.A.; SOSMAN, J.A.; KELLEY, M.C.; RICHMOND, A. Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF- κ B impairs this drug-induced senescence. *EMBO Mol Med.* 2013 Jan;5(1):149-66.
- 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 (2002) 747–758.
- LUNDBERG, A.S.; RANDELL, S.H. ; STEWART, S.A. ; ELENBAAS, B. ; HARTWELL, K.A. ; BROOKS, M.W. ; FLEMING, M.D. ; OLSEN, J.C. ; MILLER, S.W. ; WEINBERG, R.A. ; HAHN, W.C. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene.* 2002 Jul 4;21(29):4577-86.
- MA, Y.; LIN, D.; SUN, W.; XIAO, T.; YUAN, J.; HAN, N.; GUO, S.; FENG, X.; SU, K.; MAO, Y.; CHENG, S.; GAO, Y. Expression of Targeting Protein for Xklp2 Associated with Both Malignant Transformation of Respiratory Epithelium and Progression of Squamous Cell Lung Cancer, *Clin.Cancer Res.*, 12: 1121-1127, 2006.
- MA, Y.X.; LI, X.Z. Effect of aurora kinase B inhibitor AZD1152 in the treatment of cisplatin-resistant ovarian carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2013 Jan;48(1):46-50.
- MAEKAWA, M.; NISHIDA, E.; TANOUE, T. Identification of the Antiproliferative protein Tob as a MAPK substrate, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37783– 37787.
- MAJEM, M.; PALLARÈS, C. An update on molecularly targeted therapies in second- and third-line treatment in non-small cell lung cancer: focus on EGFR inhibitors and anti-angiogenic agents. *Clin Transl Oncol.* 2013 May;15(5):343-57.
- MANFREDI, M.G.; ECSEDY, J.A.; CHAKRAVARTY, A.; SILVERMAN, L.; ZHANG, M.; HOAR, K.M.; STROUD, S.G.; CHEN, W.; SHINDE, V.; HUCK, J.J. Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel in vivo pharmacodynamic assays. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7614–7624.

- MANFREDI, M.G.; ECSEDY, J.A.; MEETZE, K.A.; BALANI, S.K.; BURENKOVA, O.; CHEN, W.; GALVIN, K.M.; HOAR, K.M.; HUCK, J.J.; LEROY, P.J. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of aurora A kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:4106–4111.
- MARAIS, R.; LIGHT, Y.; PATERSON, H.F.; MARSHALL, C.J. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation, *EMBO J*. 14 (1995) 3136– 3145.
- MARGARIT, S.M.; SONDERMANN, H.; HALL, B.E.; NAGAR, B.; HOELZ, A.; PIRRUCCELLO, M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. Structural evidence for feedback activation by Ras. GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS, *Cell* 112 (2003) 685– 695.
- MARUMOTO, T.; HONDA, S.; HARA, T. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 2003;278:51786 – 95.
- MASCAUX, C.; IANNINO, N.; MARTIN, B.; PAESMANS, M.; BERGHMANS, T.; DUSART, M.; HALLER, A.; LOTHAIRE, P.; MEERT, A.P.; NOEL, S.; LAFITTE, J.J.; SCULIER, J.P. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis, *Br. J. Cancer* 92 (2005) 131– 139.
- MATTINGLY, R.R.; SORISKY, A.; BRANN, M.R.; MACARA, I.G. Muscarinic receptors transform NIH 3T3 cells through a Ras-dependent signalling pathway inhibited by the Ras-GTPase-activating protein SH3 domain. *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):7943-52.
- MERALDI, P.; HONDA, R.; NIGG, E.A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53/cells. *EMBO J* 002;21:483 – 92.
- MERALDI, P.; NIGG, E.A. The centrosome cycle. *FEBS Lett* 2002;521:9 – 13.
- MINOSHIMA, Y. ; KAWASHIMA, T. ; HIROSE, K. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* 2003;4: 549 – 60.
- MITSUUCHI, Y.; TESTA, J.R. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet*. 2002;115:183-8.
- MIURA, Y.; OHNAMI, S.; YOSHIDA, K.; OHASHI, M.; NAKANO, M.; FUKUHARA, M.; YANAGI, K.; MATSUSHITA, A.; UCHIDA, E.; ASAKA, M.; YOSHIDA, T.; AOKI, K. Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity, *Cancer Lett*. 218 (2005) 53– 62.
- MOERKERK, P.; ARENDS, J.; VAN DRIEL, M.; DE BRUINE, A.; DE GOEIJ, A.; TEN KATE, J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer, *Cancer Res*. 54 (1994) 3376– 3378.

- 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 (1991) 14603–14610.
- MORABITO, A.; COSTANZO, R.; RACHIGLIO, A.M.; PASQUALE, R.; SANDOMENICO, C.; FRANCO, R.; MONTANINO, A.; DE LUTIO, E.; ROCCO, G.; NORMANNO, N. Activity of Gefitinib in a Non-Small-Cell Lung Cancer Patient with Both Activating and Resistance EGFR Mutations. *J Thorac Oncol.* 2013 Jul;8(7):e59-60.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. General Information About Non-Small Cell Lung Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.gov/CANCERTOPICS/PDQ/TREATMENT/NON-SMALL-CELL-LUNG/PATIENT>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Lung Cancer. 2009. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/lung>.
- NGUYEN, H.G.; CHINNAPPAN, D.; URANO, T.; RAVID, K. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol* 2005;25:4977 – 92.
- NIGG, E.A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:21–32.
- NIKONOVA, A.S. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012.
- NOWAKOWSKI, J.; CRONIN, C.N.; MCREE, D.E.; KNUTH, M.W.; NELSON, C.G.; PAVLETICH, N.P.; ROGERS, J.; SANG, B.C.; SCHEIBE, D.N.; SWANSON, R.V.; THOMPSON, D.A. Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure.* 2002 Dec;10(12):1659-67.
- OHBA, T.; TOYOKAWA, G.; KOMETANI, T.; NOSAKI, K.; HIRAI, F.; YAMAGUCHI, M.; HAMATAKE, M.; SETO, T.; ICHINOSE, Y.; SUGIO, K. The mutations of the EGFR and K-ras genes in resected stage I lung adenocarcinoma and their clinical significance. *Surg Today.* 2013 Apr 23.
- OTA, T.; SUTO, S.; KATAYAMA, H. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 2002;62:5168 – 77.
- OTA, T.; SUTO, S.; KATAYAMA, H.; HAN, Z.B.; SUZUKI, F.; MAEDA, M.; TANINO, M.; TERADA, Y.; TATSUKA, M. Increased Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Attributable to AIM-1/Aurora-B Overexpression Contributes to Chromosome Number Instability, *Cancer Res.*, 62: 5168-5177, 2002.)
- PAEZ, J.G.; JÄNNE, P.A.; LEE, J.C.; TRACY, S.; GREULICH, H.; GABRIEL, S.; HERMAN, P.; KAYE, F.J.; LINDEMAN, N.; BOGGON, T.J.; NAOKI, K.;

- SASAKI, H.; FUJII, Y.; ECK, M.J.; SELLERS, W.R.; JOHNSON, B.E.; MEYERSON, M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500. Epub 2004 Apr 29.
- PAI, E.F.; KABSCH, W.; KRENGEL, U.; HOLMES, K.C.; JOHN, J.; WITTINGHOFER, A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation, *Nature* 341 (1989) 209–214.
- PAI, E.F.; KRENGEL, U.; PETSKO, G.A.; GOODY, R.S.; KABSCH, W.; WITTINGHOFER, A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis, *EMBO J.* 9 (1990) 2351– 2359.
- PARADA, L.F.; TABIN, C.J.; SHIH, C.; WEINBERG, R.A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*. 1982 Jun 10;297(5866):474-8.
- PARISE, L.V.; LEE, J.; JULIANO, R.L. New aspects of integrin signaling in cancer, *Semin. Cancer Biol.* 10 (2000) 407–414.
- PATEL, A.V.; EAVES, D.; JESSEN, W.J.; RIZVI, T.A.; ECSEDY, J.A.; QIAN, M.G.; ARONOW, B.J.; PERENTESIS, J.P.; SERRA, E.; CRIFE, T.P.; MILLER, S.J.; RATNER, N. Ras-driven transcriptome analysis identifies aurora kinase A as a potential malignant peripheral nerve sheath tumor therapeutic target. *Clin Cancer Res.* 2012 Sep 15;18(18):5020-30.
- PRENDERGAST, G.C.; DAVIDE, J.P.; DESOLMS, S.J.; GIULIANI, E.A.; GRAHAM, S.L.; GIBBS, J.B.; OLIFF, A.; KOHL, N.E. Farnesyltransferase inhibition causes morphological reversion of ras-transformed cells by a complex mechanism that involves regulation of the actin cytoskeleton, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 4193–4202.
- PUIG, P.T. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *Int J Cancer.* 2000 Jan 1;85(1):73-7.
- PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011 Oct 13;11(11):761-74.
- QUILLIAM, L.A.; HUFF, S.Y.; RABUN, K.M.; WEI, K.; PARK, W.; BROEK, D.; DER, C.J. Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8512–8516.
- RAIMOND, A.R. Rapid development of salivary gland carcinomas upon conditional expression of K-ras driven by the cytokeratin 5 promoter. *Am J Pathol.* 2006 May;168(5):1654-65.
- RAO, S.; CUNNINGHAM, D.; DE GRAMONT, A.; SCHEITHAUER, W.; SMAKAL, M.; HUMBLET, Y.; KOURTEVA, G.; IVESON, T.; ANDRE, T.; DOSTALOVA, J.; ILLES, A.; BELLY, R.; PEREZ-RUIXO, J.J.; PARK, Y.C.; PALMER, P.A. Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777

in patients with refractory advanced colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 3950–3957.

RAUEN, K.A. HRAS and the Costello syndrome. *Clin Genet.* 2007 Feb;71(2):101-8.

REIFENBERGER, J.; KNOBBE, C.B.; STERZINGER, A.A.; BLASCHKE, B.; SCHULTE, K.W.; RUZICKA, T.; REIFENBERGER, G. Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas, *Int. J. Cancer* 109 (2004) 377–384.

RESH, M.D. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins, *Sub-cell. Biochem.* 37 (2004) 217–232.

ROCHLITZ, C.F.; SCOTT, G.K.; DODSON, J.M. Incidence of activating ras oncogene mutations associated with primary and metastatic human breast cancer. *Cancer Res.* 1989;49:357-60.

RODENHUIS, S.; SLEBOS, R.J. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res.* 1992;52:2665s-9s.

RODRIGUEZ-VICIANA, P.; MARTE, B.M.; WARNE, P.H.; DOWNWARD, J. Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Feb 29;351(1336):225-31; discussion 231-2.

ROUX, P.P.; BALLIF, B.A.; ANJUM, R.; GYGI, S.P.; BLENIS, J. Tumorpromoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13489–13494.

RUCHAUD, S.; CARMENA, M.; EARNSHAW, W.C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):798-812.

RUSSELL, M.; LANGE-CARTER, C.A.; JOHNSON, G.L. Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1), *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11757–11760.

SAMPATH, S.C.; OHI, R.; LEISMANN, O.; SALIC, A.; PONZNIAKOVSKI, A.; FUNABIKI, H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* 2004;118:187–202.

SASAI, K.; KATAYAMA, H.; STENOIEN, D.L.; FUJI, S.; HONDA, R. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004;59:249–263.

SATO, T.; ENDO, M.; NAKAFUKU, M.; NAKAMURA, S.; KAZIRO, Y. Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 August; 87(15): 5993–5997.

SCHABER, M.D.; O'HARA, M.B.; GARSKY, V.M.; MOSSER, S.C.; BERGSTROM, J.D.; MOORES, S.L.; MARSHALL, M.S.; FRIEDMAN, P.A.; DIXON, R.A.; GIBBS,

- J.B. Polyisoprenylation of Ras in vitro by a farnesyl-protein transferase, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14701– 14704.
- SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M.R.; KABSCH, W.; WIESMÜLLER, L.; LAUTWEIN, A.; SCHMITZ, F.; WITTINGHOFER, A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 1997 Jul 18;277(5324):333-8.
- SCHLESINGER, T.K.; FANGER, G.R.; YUJIRI, T.; JOHNSON, G.L. The TAO of MEKK, *Front. Biosci.* 3 (1998) D1181–D1186.
- SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103 (2000) 211 –225.
- SEBTI, S.M. Blocked pathways: FTIs shut down oncogene signals, *Oncologist* 8 (Suppl. 3) (2003) 30– 38.
- SEN, S.; ZHOU, H.; WHITE, R.A. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1997;14:2195–200.
- SEPP-LORENZINO, L.; MA, Z.; RANDS, E.; KOHL, N.E.; GIBBS, J.B.; OLIFF, A.; ROSEN, N. A peptidomimetic inhibitor of farnesyl:protein transferase blocks the anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cell lines, *Cancer Res.* 55 (1995) 5302–5309.
- SESSA, F.; MAPELLI, M.; CIFERRI, C. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* 2005;18:379 – 91.
- SESSA, F.; MAPELLI, M.; CIFERRI, C.; TARRICONE, C.; ARECES, L.B.; SCHNEIDER, T.R.; STUKENBERG, P.T.; MUSACCHIO, A. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell*. 2005 Apr 29;18(3):379-91.
- SETTLEMAN, J.; ALBRIGHT, C.F.; FOSTER, L.C.; WEINBERG, R.A. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature*. 1992 Sep 10;359(6391):153-4.
- SETTLEMAN, J.; NARASIMHAN, V.; FOSTER, L.C.; WEINBERG, R.A. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell*. 1992 May 1;69(3):539-49.
- SHIBATA, D.; ALMOGUERA, C.; FORRESTER, K.; DUNITZ, J.; MARTIN, S.E.; COSGROVE, M.M.; PERUCHO, M.; ARNHEIM, N. Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinomas, *Cancer Res.* 50 (1990) 1279– 1283.
- SHIH, T.Y.; PAPAGEORGE, A.G.; STOKES, P.E.; WEEKS, M.O.; SCOLNICK, E.M. Guanine nucleotide-binding and autophosphorylation activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature (Lond.)*, 287: 686-691, 1980.

- SHIRASAWA, S. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated K-ras. *Science*. 1993 Apr 2;260(5104):85-8.
- SIMON, M.A.; DODSON, G.S.; RUBIN, G.M. An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell*. 1993 Apr 9;73(1):169-77.
- SMITH, M.R.; DEGUDICIBUS, S.J.; STACEY, D.W. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature*. 1986 Apr 10-16;320(6062):540-3.
- SMITH, S.L.; BOWERS, N.L.; BETTICHER, D.C.; GAUTSCHI, O.; RATSCHILLER, D.; HOBAN, P.R.; BOOTON, R.; SANTIBANEZ-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: 719-729, 2005;
- SONDERMANN, H.; SOISSON, S.M.; BOYKEVISCH, S.; YANG, S.S.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless, *Cell* 119 (2004) 393–405.
- SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 59– 71.
- SORRENTINO, R.; LIBERTINI, S.; PALLANTE, P.L.; TRONCONE, G.; PALOMBINI, L.; BAVETSIAS, V.; SPALLETTI-CERNIA, D.; LACCETTI, P.; LINARDOPOULOS, S.; CHIEFFI, P.; FUSCO, A.; PORTELLA, G. Aurora B Overexpression Associates with the Thyroid Carcinoma Undifferentiated Phenotype and Is Required for Thyroid Carcinoma Cell Proliferation, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 90: 928-935, 2005.
- SREENATH, V.; SHARMA, D.A.; SETTLEMAN, H. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* 10, 241-253 (April 2010)
- STACEY, D.W. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 158– 163.
- STORCHOVA, Z.; KUFFER, C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci.* 2008;121:3859–3866.
- STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:45–54.
- SUN, J.; QIAN, Y.; HAMILTON, A.D.; SEBTI, S.M. Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts, *Oncogene* 16 (1998) 1467– 1473.
- SUN, J.; QIAN, Y.; HAMILTON, A.D.; SEBTI, S.M. Ras CAAX peptidomimético FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of human lung carcinoma with K-Ras mutation and p53 deletion, *Cancer Res.* 55 (1995) 4243–4247.

- TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins, *Physiol Rev.* 81 (2001) 153– 208.
- TAN, N.; WONG, M.; NANNINI, M.A.; HONG, R.; LEE, L.B.; PRICE, S.; WILLIAMS, K.; SAVY, P.P.; YUE, P.; SAMPATH, D.; SETTLEMAN, J.; FAIRBROTHER, W.J.; BELMONT, L.D. Bcl-2/Bcl-xL inhibition increases the efficacy of MEK inhibition alone and in combination with PI3 kinase inhibition in lung and pancreatic tumor models. *Mol Cancer Ther.* 2013 Jun;12(6):853-64. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0949. Epub 2013 Mar 8.
- 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.* 2003 Jun;40(3):237-46.
- TANAKA, H.; NAKASHIRO, K.; IWAMOTO, K.; TOKUZEN, N.; FUJITA, Y.; SHIRAKAWA, R.; OKA, R.; GODA, H.; HAMAKAWA, H. Targeting Aurora kinase A suppresses the growth of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oral Oncol.* 2013 Jun;49(6):551-9.
- TARTAGLIA, M.; GELB, B.D. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:45-68.
- TATSUKA, M. Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis, *Oncogene*, 24: 1122-1127, 2005.
- TATSUKA, M.; KATAYAMA, H.; OTA, T.; TANAKA, T.; ODASHIMA, S. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the Aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:4811–4816.
- 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* 2003;162:757 – 63.
- TONON, G.; WONG, K.K.; MAULIK, G.; BRENNAN, C.; FENG, B.; ZHANG, Y.; KHATRY, D.B.; PROTOPOPOV, A.; YOU, M.J.; AGUIRRE ,A.J.; MARTIN, E.S.; YANG, Z.; JI, H.; CHIN, L. DEPINHO, R.A. High-resolution genomic profiles of human lung cancer, *PNAS*, 102: 9625-9630, 2005;
- TRUEBLOOD, C.E.; BOYARTCHUK, V.L.; PICOLOGLOU, E.A.; ROZEMA, D.; POULTER, C.D.; RINE, J. The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 4381– 4392.
- TSAI, M.Y.; WIESE, C.; CAO, K. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* 2003;5:242 – 8.
- TSENG, T.C.; CHEN, S.H.; HSU, Y.P.; TANG, T.K. Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1,

AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol.* 1998;17:823–833.

TSOU, J.H.; CHANG, K.C.; CHANG-LIAO, P.Y.; YANG, S.T.; LEE, C.T.; CHEN, Y.P.; LEE, Y.C.; LIN, B.W.; LEE, J.C.; SHEN, M.R.; CHUANG, C.K.; CHANG, W.C.; WANG, J.M.; HUNG, L.Y. Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumorigenicity of epithelial cells. *J Pathol.* 2011 Oct;225(2):243-54. doi: 10.1002/path.2934. Epub 2011 Jun 27.

TUVESON, D.A. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell.* 2004 Apr;5(4):375-87.

TUVESON, D.A.; SHAW, A.T.; WILLIS, N.A.; SILVER, D.P.; JACKSON, E.L.; CHANG, S.; MERCER, K.L.; GROCHOW, R.; HOCK, H.; CROWLEY, D.; HINGORANI, S.R.; ZAKS, T.; KING, C.; JACOBETZ, M.A.; WANG, L.; BRONSON, R.T.; ORKIN, S.H.; DEPINHO, R.A.; JACKS, T. Endogenous oncogenic Kras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects, *Cancer Cell* 5 (2004) 375– 387.

URANO, T.; EMKEY, R.; FEIG, L.A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J.* 1996 February 15; 15(4): 810–816.

VADER, G.; LENS, S.M. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1786(1):60-72. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.07.003. Epub 2008 Jul 23.

VAN BIESEN, T.; HAWES, B.E.; LUTTRELL, D.K.; KRUEGER, K.M.; TOUHARA, K.; PORFIRI, E.; SAKAUE, M.; LUTTRELL, L.M.; LEFKOWITZ, R.J. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature.* 1995 Aug 31;376(6543):781-4.

VAN CUTSEM, E.; VAN DE VELDE, H.; KARASEK, P.; OETTL, H.; VERVENNE, W.L.; SZAWLOWSKI, A.; SCHOFFSKI, P.; POST, S.; VERSLYPE, C.; NEUMANN, H.; SAFRAN, H.; HUMBLET, Y.; PEREZ RUIXO, J.; MA, Y.; VON HOFF, D. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 1430– 1438.

VAN WEEREN, P.C.; DE BRUYN, K.M.; DE VRIES-SMITS, A.M.; VAN LINT, J.; BURGERING, B.M. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):13150-6.

VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.J.; AHMADI, K.; TIMMS, J.; KATSO, R.; DRISCOLL, P.C.; WOSCHOLSKI, R.; PARKER, P.J.; WATERFIELD, M.D. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 535– 602.

- VIGNERON, S.; PRIETO, S.; BERNIS, C.; LABBE, J.C.; CASTRO, A.; LORCA, T. Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* 2004;15:4584 – 96.
- VISCHIONI, B.; OUDEJANS, J.J.; VOS, W.; RODRIGUEZ, J.A.; GIACCONE, G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients, *Mol.Cancer Ther.*, 5: 2905-2913, 2006;
- VITALE-CROSS, L. Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):8804-7.
- 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 (2004) 8804–8807.
- VOICE, J.K.; KLEMKE, R.L.; LE, A.; JACKSON, J.H. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17164–17170.
- WANG, J.Y.; LIAN, S.T.; CHEN, Y.F.; YANG, Y.C.; CHEN, L.T.; LEE, K.T.; HUANG, T.J.; LIN, S.R. Unique K-ras mutational pattern in pancreatic adenocarcinoma from Taiwanese patients, *Cancer Lett.* 180 (2002) 153– 158.
- WAQAR, S.N.; GOPALAN, P.K.; WILLIAMS, K.; DEVARAKONDA, S.; GOVINDAN, R. A Phase I Trial of Sunitinib and Rapamycin in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Chemotherapy.* 2013 Apr 26;59(1):8-13.
- WARNER, S.L.; MUNOZ, R.M.; STAFFORD, P. Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(10): 2450-8.
- WATZINGER, F.; LION, T. Ras family. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 1999. Available at: <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/Ras.html>.
- WEI, Y.; MIZZEN, C.A.; COOK, R.G.; GOROVSKY, M.A.; ALLIS, C.D. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7480 – 4.
- WEI, Y.; YU, L.; BOWEN, J.; GOROVSKY, M.A.; ALLIS, C.D. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 1999; 97:99 – 109.
- WEISS, F.U.; DAUB, H.; ULLRICH, A. Novel mechanisms of RTK signal generation, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7 (1997) 80– 86.
- 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 (1997) 14459–14464.

WILKINSON, R.W.; ODEDRA, R.; HEATON, S.P.; WEDGE, S.R.; KEEN, N.J.; CRAFTER, C.; FOSTER, J.R.; BRADY, M.C.; BIGLEY, A.; BROWN, E.; BYTH, K.F.; BARRASS, N.C.; MUNDT, K.E.; FOOTE, K.M.; HERON, N.M.; JUNG, F.H.; MORTLOCK, A.A.; BOYLE, F.T.; GREEN, S. AZD1152, a Selective Inhibitor of Aurora B Kinase, Inhibits Human Tumor Xenograft Growth by Inducing Apoptosis, *Clin.Cancer Res.*, 13: 3682-3688, 2007.

WINTER-VANN, A.M.; BARON, R.A.; WONG, W.; DELA CRUZ, J.; YORK, J.D.; GOODEN, D.M.; BERGO, M.O.; YOUNG, S.G.; TOONE, E.J.; CASEY, P.J. A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 4336–4341.

WISLEZ, M.; SPENCER, M.L.; IZZO, J.G.; JUROSKE, D.M.; BALHARA, K.; CODY, D.D.; PRICE, R.E.; HITTELMAN, W.N.; WISTUBA, I.I.; KURIE, J.M. Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras, *Cancer Res.* 65 (2005) 3226– 3235.

WORLD BANK. *Curbing the Epidemic. Governments and the Economics of Tobacco Control*, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer statistics 2008*. Disponível em http://globocan.iarc.fr/bar_pop_sel.asp. M.A. Lemmon, J. Schlessinger, Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization, *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994) 459– 463.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Confronting the Tobacco Epidemic in an Era of Trade Liberalization*. WHO/NMH/TFI/01.4, 2001.

XU, H.T.; MA, L.; QI, F.J.; LIU, Y.; YU, J.H.; DAI, S.D.; ZHU, J.J.; WANG, E.H. Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, *Pathol Int*, 56: 375-380, 2006.

XU, Y.; LIU, H.; CHEN, J.; ZHOU, Q. Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. *Cancer Biol Ther.* 2010 Apr 15;9(8):572-82. Epub 2010 Apr 26. Review.

YAMANASHI, Y.; BALTIMORE, D. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, *Dok. Cell.* 1997 Jan 24;88(2):205-11.

YANG, G.; MERCADO-URIBE, I.; MULTANI, A.S.; SEN, S.; SHIH, I.E.M.; WONG, K.K.; GERSHENSON, D.M.; LIU, J. RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis. *Int J Cancer.* 2013 Jul 15;133(2):275-85.

- YANG, H.; HE, L.; KRUK, P.A.; NICOSIA, S.V.; CHENG, J.Q. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. 2006 Nov 15;119(10):2304-12.
- ZEITLIN, S.G.; SHELBY, R.D.; SULLIVAN, K.F. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol* 2001;155:1147 – 57.
- ZENG, W.F.; NAVARATNE, K.; PRAYSON, R.A.; WEIL, R.J. Aurora B expression correlates with aggressive behaviour in glioblastoma multiforme, *J.Clin.Pathol.*, 60: 218-221, 2007.
- ZHANG, Y.; MUKHOPADHYAY, T.; DONEHOWER, L.A.; GEORGES, R.N.; ROTH, J.A. Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype, *Hum. Gene Ther.* 4 (1993) 451– 460.
- 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.* 1998; 20:189-93.
- ZHOU, N.; SINGH, K.; MIR, M.C.; PARKER, Y.; LINDNER, D.; DREICER, R.; ECSIEDY, J.A.; ZHANG, Z.; THE, B.T.; ALMASAN, A.; HANSEL, D.E. The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 1;19(7):1717-28.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Edmilson Ozorio dos Santos

Local e data de nascimento: São Paulo, SP, Brasil. Aos 30 de janeiro de 1987.

Contatos: e.ozorio@outlook.com / edmilson.ozorio@usp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), São Paulo, Brasil. Ano de titulação: 2013.

Bacharel em Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas pelas Faculdades Oswaldo Cruz (FOC), São Paulo, Brasil. Ano de titulação: 2010.

PUBLICAÇÕES

OZORIO, E.; AOKI, M.N.; SALVIATTO, A.C.P.; BASSÈRES, D.S. Aurora Kinases: Potential therapeutic targets in KRAS-induced lung cancer. Manuscript in preparation (2013).

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

AACR - AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. Apresentação de poster: *Aurora Kinases: Potential Therapeutic Targets in K-Ras-Induced Lung Cancer*. 2013. (Congresso)

SBBq - BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Apresentação de poster: *Aurora Kinases: Potential Therapeutic Targets in K-Ras-Induced Lung Cancer*. 2012. (Congresso).

DEMAIS ATIVIDADES

2013. Monitoria no VI Curso de Inverno do Departamento de Bioquímica do IQ-USP

2013. Monitoria em Bioquímica Experimental Avançada.

2012. Monitoria no VI Curso de Inverno do Departamento de Bioquímica do IQ-USP

2012. Monitoria em Biologia Molecular.

2012. Monitoria em Bioquímica Experimental.

IDIOMAS

Inglês (fluido), Italiano (avançado).