UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FELIPE SILVA RODRIGUES

Explorando a quinase IKKβ como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene *KRAS*

Versão Original

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

31/07/2018

FELIPE SILVA RODRIGUES

Explorando a quinase IKKβ como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene *KRAS*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP) para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Re

Rodrigues, Felipe Silva
Explorando a quinase IKKbeta como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene KRAS / Felipe Silva Rodrigues. - São Paulo, 2018.
133 p.

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

1. Câncer de pulmão. 2. KRAS. 3. Células iniciadoras de tumor. 4. Quinase IKKbeta. I. T. II. Basseres, Daniela Sanchez, orientador.

Somewhere, something incredible is waiting to be known.

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

É um desafio avaliar a contribuição de cada um, direta ou indiretamente, durante uma trajetória como esta que aqui se materializa. Ao longo dos últimos anos eu contei com o apoio de amigos incríveis e da minha família, que foi fundamental. Criei e fortaleci laços que, sem dúvidas, marcaram minha vida pessoal e acadêmica. Conheci e fui aluno de cientistas apaixonados pela profissão, que tanto fazem apesar de, muitas vezes, faltarem-lhe recursos e reconhecimento; e que não falharam em me motivar a fazer ciência. Ainda, tive o privilégio de fazer pesquisa em duas instituições de excelência, cujo trabalho aqui não teria sido possível sem a constante dedicação de seus funcionários. A todos vocês, deixo aqui meus agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Profa. Dra. *Daniela Bassères* por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto e em seu laboratório. Por toda orientação, ensinamentos e apoio durante este percurso. Por incentivar meu crescimento acadêmico e pelas conquistas que me ajudou a realizar.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer (LBMC), que me acolheram de braços abertos. À *Luiza*, sobretudo pela amizade, ajuda no planejamento dos experimentos e porto-seguro nos momentos em que eu achava que tudo estava perdido. À *Vanessa*, pela superconvivência prazerosa, por ter dividido comigo não só o mesmo alvo terapêutico, a bancada, os RNAs, mas também a casa, o marido e o nosso *baby* desde quando era só uma sementinha incubando. Ao *Sandro*, pelas risadas, a gula compartilhada e por tudo que me ensinou dentro do laboratório. À *Thalita*, pela empatia, paciência e leveza de espírito. Ao *Lutero*, pelos momentos de descontração e por sempre estar disposto a ajudar. Ao *Edmilson*, que mesmo em pouco tempo de convivência conseguiu me ensinar tanto. À *Tatiana*, por ter iniciado este projeto.

I would also like to express my sincere gratitude to the members of the Oncogene-Induced Vulnerabilities Laboratory (M10) at the Beatson Institute for Cancer Research in Glasgow. To Dr Daniel Murphy for the opportunity and privilege of working in his lab. For the academic guidance, life lessons, and concern about the future of my career – I genuinely admire you as a person and as a scientist. To Björn, for everything he has taught me, for the help with the experiment design, data analysis, and for being extremely patient. To Declan, Katarina, Nathiya and Sarah, for making me feel part of the group and for creating such a great atmosphere in the lab, which gave me the motivation to get up every morning despite the cold and bad weather.

Aos membros do Laboratório de Pesquisas Integradas em Câncer (LAPIC). Ao Prof. Dr. *Eduardo Reis* e à Profa. Dra. *Deborah Schechtman* pelas discussões enriquecedoras que tanto acrescentaram para esta dissertação e para minha visão crítica como cientista. Também aos demais membros do LAPIC, que criaram um ambiente leve e de interação positiva. Em especial à *Bianca*, *Arthur*, *Ester*, *Diogo Pessoa*, *Diogo Pellegrina, Allan, Beatriz, Julio Sosa* e *Julio Cesar* (*in memoriam*), por ter deixado lembranças que apenas nos fazem sorrir.

Às Profas. Dras. *Regina Baldini*, *Claudiana Lameu*, *Daniela Bassères* e *Nadja Pinto*, pelos ensinamentos e pela supervisão durante meus dois semestres como monitor.

Aos professores que tanto me ensinaram na USP Ribeirão Preto, obrigado pela dedicação de vocês à minha formação.

À Dra. *Maria Arruda*, que sempre manteve as portas abertas para mim e, sobretudo, pelas outras portas que me ajudou a abrir. Obrigado por ser esse exemplo de cientista guerreira, força e determinação.

To Dr Sally Wheatley, for teaching and guiding me during my first independent research project. This amazing experience is what gave me the motivation to follow an academic career

and was responsible for opening other doors in my life. Thank you for being such a great and inspiring supervisor.

À minha mãe, *Niderci*, pelo amor incondicional. Por me apoiar independente de qualquer coisa, mesmo que isso signifique morar em outro continente. Pelo exemplo de mulher, de mãe e de amiga. Por ser responsável pelo que sou e onde estou hoje. Por ser a pessoa que mais torce e se preocupa com a minha felicidade.

Ao meu pai, *Laerte*, por nunca hesitar em oferecer ajuda. Por sempre querer o melhor para mim e por fazer eu me sentir amado.

Ao meu irmão, *Luís*, cuja contribuição foi fundamental para eu chegar até aqui.

Ao *Edmar*, *flatmate* e melhor amigo, que sabe de mim tanto quanto eu mesmo. Por celebrar comigo os momentos de felicidade e por ser meu porto-seguro quando os momentos são de desesperança. Pelos desabafos e *audiobooks*. Por dividir a mesma casa e por ter sempre se mantido presente quando havia distância.

À minha grande amiga, prima e irmã de coração, *Maria Cláudia (Kaká)*, por ter estado ao meu lado em toda e qualquer situação. Pelo exemplo de amizade, empatia e dedicação. Pela admiração que sinto por você como pessoa e profissional. Por lutar contra as marcas de uma sociedade capitalista injusta, elitista e preconceituosa. Por deixar marcas suas em mim, das quais sinto extremo orgulho. A vida não está fácil para ninguém, mas, sem dúvidas, seria muito mais difícil sem você.

À *Marcela*, pelos 20 anos de companheirismo, cumplicidade, risadas e suporte nos momentos difíceis. Pela leveza e paz que me traz todos os finais de semana quando volto a Limeira. É acolhedor saber que posso sempre contar com você.

À *Gabi*, por acreditar em mim mais do que eu mesmo. Por me dar forças a continuar, sempre, mesmo que o caminho seja novo e assustador. Obrigado por fazer parte da minha vida.

À *Fernanda*, *Ana Maria*, *Ana Carol* e *Nikon*, por todo afeto, carinho, preocupação e compreensão em meus momentos de ausência. A vida é, sem dúvidas, mais simples e mais leve com vocês ao meu lado.

To Steven, for giving me the most enjoyable time I could have asked for in Scotland. Thank you for becoming part of my life and for our moments together – I will treasure them forever in my mind.

À vó *Cida* (*in memoriam*), pelo exemplo de afeto, por ter compartilhado sua cama comigo durante toda minha infância, pelos cafezinhos de domingo e por, em seus últimos momentos de lucidez, ter me incentivado a jamais desistir de lutar pelo que realmente me faz feliz. Sinto muito a sua falta.

Ao Cursinho Aprimorando, pela oportunidade e experiência enriquecedora, apesar de curta, de ter sido professor neste projeto voluntário incrível. Obrigado por lutar por uma sociedade mais justa, socializada, menos individualista e de maior representatividade dentro da universidade.

To Dr Ilaria Malanchi, who recently gave me the opportunity to do a PhD in her laboratory at the Francis Crick Institute in London.

Aos demais funcionários do Instituto de Química da USP e do *Beatson Institute for Cancer Research*.

Finalmente, às agências de fomento. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa (Processo n. 2016/22520-4) e pela oportunidade da realização do estágio na Escócia (Processo n. 2017/22125-0), cuja experiência foi extremamente enriquecedora para esta dissertação e para o meu crescimento acadêmico. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante o início do mestrado.

RESUMO

Rodrigues, F. S. **Explorando a quinase IKKβ como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene *KRAS***. 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As alterações genéticas mais frequentes em câncer de pulmão são mutações pontuais que ativam o oncogene *KRAS*. Embora estas mutações estejam causalmente relacionadas à oncogênese, até hoje diferentes abordagens para inibir as proteínas RAS diretamente não obtiveram sucesso. Portanto, para que melhores alvos terapêuticos para o câncer de pulmão se tornem disponíveis é necessário identificar os mecanismos moleculares ativados por KRAS que estão diretamente envolvidos com a aquisição de propriedades malignas importantes, como o desenvolvimento e a manutenção de um fenótipo tronco-tumoral pelas células iniciadoras de tumor (CITs). CITs, também conhecidas como células tronco-tumorais, são definidas como uma subpopulação de células tumorais capazes de se autorrenovar, iniciar a formação de tumores e sustentar o crescimento tumoral. O desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas a estas células é imprescindível para melhorar a eficácia da terapia antitumoral. Uma vez que KRAS está associada a manutenção de um fenótipo tronco-tumoral e ativa o fator de transcrição NF-κB através da quinase IKKβ para promover a tumorigênese pulmonar, nós hipotetizamos que a quinase IKKβ contribui para o fenótipo tronco-tumoral induzido por KRAS em câncer de pulmão. Nós utilizamos ensaios de formação de tumoresferas para enriquecer e avaliar a função de CITs das linhagens pulmonares positivas para KRAS A549 e H358. As células A549 e H358 formaram tumoresferas em cultura de baixa aderência e, quando comparadas às células derivadas da cultura aderente, as células oriundas da cultura de tumoresferas apresentaram maior crescimento clonogênico, maior expressão de genes associados ao fenótipo tronco por qPCR e maior atividade da quinase IKKβ. A inibição da atividade de IKKβ através de um inibidor farmacológico altamente específico (Composto A) diminuiu levemente a proliferação de células A549 e H358, sem resultar em morte celular significativa. Entretanto, a inibição da atividade ou da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduziu a expressão de genes associados ao fenótipo tronco e diminuiu a formação de tumoresferas. A inibição da expressão de IKKβ em células A549 reduziu também a capacidade de autorrenovação de CITs. Estes resultados sugerem que IKKβ desempenha um papel importante na manutenção do fenótipo tronco-tumoral de CITs pulmonares induzidas por KRAS. Em seguida, nós demonstramos que a inibição da atividade de IKKβ afetou preferencialmente a proliferação celular e o crescimento clonogênico de células oriundas da cultura de tumoresfera, sugerindo que IKKβ desempenha um papel mais importante em CITs do que em células derivadas da cultura aderente. A análise por citometria de fluxo identificou que células derivadas da cultura de tumoresfera apresentam um enriquecimento para células $CD24^+$ na linhagem A549 e células $CD44^+$ na linhagem H358, sugerindo que estes possam ser marcadores promissores para purificação de CITs nestas linhagens. Adicionalmente, demonstramos, por ensaios de *wound-healing* de células A549 e H358, que a inibição da atividade de IKKβ reduziu a migração celular, uma outra uma propriedade aumentada em CITs. Além disso, mostramos que a atividade da quinase IKKβ em células A549 e H358 não depende das vias da MAPK ou PI3K/Akt. Interessantemente, a inibição combinada de IKKβ (um efetor *downstream* de KRAS) e de EGFR/ERRB2 (reguladores *upstream* de KRAS que ativam as vias MAPK e PI3K/Akt) reduziu de forma aditiva a formação de tumoresferas, proliferação e migração celular. Quando avaliados em conjunto, nossos resultados sugerem que a quinase IKKβ desempenha um papel importante na biologia de CITs pulmonares portadoras de KRAS oncogênica e que a inibição desta quinase sozinha ou em combinação com a inibição de outras vias pode representar uma estratégia terapêutica promissora a ser explorada para reduzir a recidiva e metástase no câncer de pulmão induzido por KRAS.

Palavras-chave: câncer de pulmão, KRAS, células iniciadoras de tumor, quinase IKKβ.

ABSTRACT

Rodrigues, F. S. **Exploring IKKβ kinase as a therapeutic target for KRAS-driven lung tumour-initiating cells**. 2018. Master's Degree Dissertation – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The most frequent genetic alterations in lung cancer are point mutations that activate the *KRAS* oncogene. Although these mutations are causally related to oncogenesis, different approaches to inhibit RAS proteins directly have not been successful to date. Therefore, for better therapeutic targets for lung cancer to become available, it is necessary to identify the molecular mechanisms activated by KRAS that are directly involved with important malignant features, such as the development and maintenance of a cancer stem-like phenotype by the tumour-initiating cells (TICs). TICs, also known as cancer stem cells, are defined as a subpopulation of tumour cells able to self-renew, promote tumour initiation, and sustain tumour growth. The development of therapeutic strategies to target these cells is imperative to improve the efficacy of antitumor therapy. Since KRAS is associated with the maintenance of a cancer stem-like phenotype and activates the transcription factor NF-κB through the IKKβ kinase to promote lung tumourigenesis, we hypothesised that IKKβ kinase contributes to the cancer stem-like phenotype induced by KRAS in lung cancer. We used tumoursphere formation assays to enrich and evaluate the function of TICs of KRAS-mutant cell lines A549 and H358. A549 and H358 cells formed tumourspheres in low adhesion culture and, when compared to cells grown in adherent culture, sphere-derived cells displayed increased clonogenic growth, higher expression of stemness genes by qPCR, and increased IKKβ kinase activity . Inhibition of IKKβ activity through a highly specific pharmacological inhibitor (Compound A) slightly decreased proliferation of A549 and H358 cells without inducing significant cell death. On the other hand, inhibition of IKKβ activity or expression by RNA interference reduced the expression of stemness genes and decreased tumoursphere formation. Inhibition of IKKβ expression in A549 cells also reduced TICs self-renewal . These results suggest that IKKβ plays an important role in maintaining the cancer stem-like phenotype of KRAS-driven lung TICs. Next, we demonstrated that IKKβ inhibition preferentially reduced cell proliferation and clonogenic growth of sphere-derived cells, suggesting that IKKβ plays a more important role in TICs than in adherent culture-derived cells. Flow cytometry analysis identified that sphere-derived cells display an enrichment for the surface marker CD24 in A549 cells and CD44 in H358 cells, indicating that these could be promising markers for the purification of TICs in these cell lines. Furthermore, we have shown by wound-healing assays of A549 and H358 cells that IKKβ inhibition reduced cell migration , another feature increased in TICs. In addition, we have shown that IKKβ activity in A549 and H358 cells does not depend on the MAPK or PI3K/Akt pathways. Interestingly, combined inhibition of IKKβ (a downstream effector of KRAS) and EGFR/ERBB2 (upstream regulators of KRAS that activate the MAPK and PI3K/Akt pathways) additively reduced tumoursphere formation, cell proliferation and migration. Taken together, our results suggest that IKKβ kinase plays an important role in the biology of KRAS-driven lung TICs, and that inhibition of this kinase alone or in combination with inhibition of other signalling pathways may represent a promising therapeutic strategy to be explored in order to reduce tumour recurrence and metastasis in KRAS-driven lung cancer.

Key-words: lung cancer, KRAS, tumour-initiating cells, IKKβ kinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Neoplasias de maior incidência em homens e em mulheres no Brasil 17
Figura 1.2. Sobrevida relativa em 5 anos comparando-se diferentes estágios do desenvolvimento tumoral pulmonar 18
Figura 1.3. Distribuição das alterações genéticas mais frequentes em NSCLC..... 20
Figura 1.4. Estrutura tridimensional de KRAS 24
Figura 1.5. Modificações pós-traducionais das proteínas RAS..... 26
Figura 1.6. Regulação da atividade de KRAS através da ativação de um receptor tirosina-quinase 28
Figura 1.7. Regulação da atividade de KRAS selvagem e KRAS mutada 32
Figura 1.8. Os domínios das quinases IKK..... 40
Figura 1.9. Via canônica e não-canônica de ativação do NF-κB 42
Figura 1.10. O modelo das células iniciadoras de tumor 48
Figura 1.11. Terapias convencionais e terapias direcionadas às células iniciadoras de tumor 51
Figura 5.1. Formação de tumoresferas a partir de células de adenocarcinoma pulmonar humano 68
Figura 5.2. Células oriundas da cultura de tumoresferas apresentam maior expressão de genes marcadores de CITs 70
Figura 5.3. Células oriundas da cultura de tumoresferas apresentam maior crescimento clonogênico 71
Figura 5.4. A quinase IKKβ está mais ativa em células oriundas da cultura de tumoresferas. 72
Figura 5.5. Inibição farmacológica de IKKβ em células A549 e H358 reduz a expressão de genes marcadores de CITs 74
Figura 5.6. Inibição de IKKβ por interferência de RNA em células A549 reduz a expressão de genes marcadores de CITs 75
Figura 5.7. Inibição da atividade de IKKβ reduz o crescimento clonogênico de células oriundas da cultura de tumoresferas 77
Figura 5.8. Inibição da atividade de IKKβ diminui preferencialmente a proliferação de células oriundas da cultura de tumoresferas 78
Figura 5.9. Validação da inibição farmacológica de IKKβ por Composto A e de EGFR/ERBB2 por Neratinib..... 80

Figura 5.10. Inibição farmacológica da quinase IKKβ diminui a proliferação de células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS 81
Figura 5.11. Inibição farmacológica da quinase IKKβ causa pouca morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS 81
Figura 5.12. Inibição farmacológica da quinase IKKβ diminui a formação de tumoresferas por células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. 82
Figura 5.13. Inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 diminui a proliferação celular de células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS..... 84
Figura 5.14. Inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 causa pouca morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS 85
Figura 5.15. Inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 diminui a formação de tumoresferas por células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS... 85
Figura 5.16. Inibição combinada de IKKβ e EGFR/ERBB2 possui efeito aditivo na proliferação celular de células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS 87
Figura 5.17. Inibição combinada da atividade de IKKβ e de EGFR/ERBB2 tem efeito na morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS.... 88
Figura 5.18. Inibição combinada da atividade de IKKβ e de EGFR/ERBB2 diminui a formação de tumoresferas por células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS 89
Figura 5.19. Inibição genética de IKKβ e KRAS por interferência de RNA em células da linhagem A549 diminui a formação e autorrenovação de tumoresferas 92
Figura 5.20. Inibição genética de IKKβ e KRAS por interferência de RNA em células da linhagem H358 diminui a formação de tumoresferas..... 93
Figura 5.21. Células A549 oriundas da cultura de tumoresferas apresentam enriquecimento de células positivas para o marcador CD24 e células H358 oriundas da cultura de tumoresferas apresentam enriquecimento de células positivas para o marcador CD44..... 95
Figura 5.22. Inibição da atividade de IKKβ reduz a migração de células A549 e H358 por experimento de wound-healing 97
Figura 5.23. Inibição combinada da atividade de IKKβ e EGFR/ERBB2 reduz a migração de células A549 e H358 por experimento de wound-healing..... 98
Figura 5.24. Atividade de IKKβ independe das vias da MAPK e PI3K em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Inibidores farmacológicos.....56

Tabela 4.2. Sequências dos pares de primers *forward* (Fw) e *reverse* (Rv) utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....62

Tabela 4.3. Anticorpos primários utilizados nos experimentos de Western Blot.....63

Tabela 4.4. Anticorpos secundários utilizados nos experimentos de Western Blot.....63

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG2: proteína de transporte da membrana celular dependente de ATP
ADP: adenosina difosfato
ALDH: enzima responsável pela oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos
ATP: adenosina trifosfato
BAFF: fator de ativação de células B
Bcl-2: proteína envolvida na regulação de apoptose
BMI-1: proteína do complexo polycomb
c-Rel: fator de transcrição membro da família NF-κB
CA: Composto A
CD133: glicoproteína transmembrana também conhecida como prominina-1
CD24: sialoglicoproteína envolvida em adesão celular
CD40: proteína transmembrana envolvida no desenvolvimento
CD44: glicoproteína envolvida em interações célula-célula, adesão e migração celular
CDK2: quinase dependente de ciclina 2
cDNA: DNA complementar
CHUK: gene que codifica IKKα
CITs: células iniciadoras de tumor
CSCs: células-tronco tumorais (*cancer stem cells*)
CXCR4: receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4
DMEM/F12: proporção 1/1 do meio Dulbecco modificado com o meio de Ham F12
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF: fator de crescimento epidermal
EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal
EMT: transição epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*)
ERBB: grupo de receptores tirosina-quinase
ERK: quinase reguladora de sinais extracelulares
FGF: fator de crescimento fibroblástico
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GAP: proteína ativadora de GTPase (*GTPase-activating protein*)
GDP: difosfato de guanosina
GEFs: fatores de troca de nucleotídeos de guanina (*guanine nucleotide exchange factors*)
GRB2: proteína adaptadora envolvida na transdução de sinal
GTP: trifosfato de guanosina
HRAS: pequena GTPase da família RAS (*Harvey rat sarcoma vírus*)
IκB: proteína inibidora do fator nuclear kappa-B
IKBKB: gene que codifica para a quinase IKKβ
IKKα: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade alfa.
IKKβ: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta.

IKKγ: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade gama (NEMO).
IKKKs: quinases capazes de fosforilar as quinases do complexo IKK
IL-1: citocina pró-inflamatória
KRAS: pequena GTPase da família RAS (*Kirsten rat sarcoma vírus*)
LPS: lipossacarídeos
MEK: quinase ativadora da MAP quinase
mRNA: RNA mensageiro
Myc: fator de transcrição envolvido na progressão do ciclo celular e apoptose
N-2: meio quimicamente definido baseado na formulação de Bottenstein
NANOG: fator de transcrição capaz de regular autorrenovação
NBD: domínio de ligação a NEMO (*NEMO-binding domain*)
NEMO: modulador essencial de NF-κB
NF-κB: fator nuclear kappa-B
NIK: quinase indutora do NF-κB
NRAS: pequena GTPase da família RAS
NSCLC: câncer de pulmão de não-pequenas células (*non-small cell lung cancer*)
OCT4: fator de transcrição capaz de regular autorrenovação
OMS: Organização Mundial de Saúde
p100: fator que atua como um inibidor do fator nuclear kappa-B antes de ser clivado em p52
p105: fator de transcrição membro da família NF-κB
p50: fator de transcrição membro da família NF-κB
p52: fator de transcrição membro da família NF-κB
PBS: tampão fosfato-salino
PCR: reação em cadeia da polimerase
PE: ficoeritrina
PI3K: fosfatidilinisitol 3-quinases
RAF: serina-treonina quinases (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)
RelA: fator de transcrição p65 (membro da família NF-κB)
RelB: fator de transcrição membro da família NF-κB
RHD: domínio de homologia a REL
SCLC: câncer de pulmão de pequenas células (*small cell lung cancer*)
SFB: soro fetal bovino
siRNA: pequeno RNA de interferência (*small interference RNA*)
SOS: fator de troca de nucleotídeo de guanina
SOX2: fator de transcrição capaz de regular autorrenovação e pluripotência
TBS: solução salina tris-tamponada
TBST: solução de TBS contendo 0,1% Tween
TNF: citocina pró-inflamatória
TRAF: fator associado ao receptor de TNF
ULD: domínio análogo a da ubiquitina (*ubiquitin-like domain*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

1.1. Câncer de pulmão 17

1.2. A pequena GTPase KRAS 21

1.2.1. Estrutura, função e regulação 22

1.2.2. KRAS e câncer 29

1.2.3. KRAS como alvo terapêutico 31

1.3. A quinase IKKβ 38

1.3.1. Estrutura, função e regulação 39

1.3.2. IKKβ e câncer 43

1.3.3. IKKβ e KRAS 45

1.4. As células iniciadoras de tumor 46

1.4.1. O papel de KRAS na biologia das células iniciadoras de tumor 52

1.4.2. O papel de IKKβ na biologia das células iniciadoras de tumor 53

2. HIPÓTESE 55

3. OBJETIVOS 55

3.1. OBJETIVO GERAL 55

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 55

4. MATERIAIS E PROCEDIMENTOS 56

4.1. Linhagens celulares e condições de cultura aderente 56

4.2. Inibidores farmacológicos 56

4.3. Ensaio de formação de tumoresferas 57

4.4. Ensaio de formação de tumoresferas *single-cell* 58

4.5. Ensaio de formação de colônias 58

4.6. Silenciamento da expressão gênica mediado por transfecção com siRNA 58

4.7. Extração e quantificação de RNA 59

4.8. Síntese de cDNA 60

4.9. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR) 61

4.10. Western Blot 62

4.11. Citometria de fluxo 64

4.12. Ensaio de proliferação e morte celular por imageamento ao vivo 64

4.13. Ensaio de migração celular por *wound-healing* acompanhado por imageamento ao vivo 65

4.14. Análise estatística 66

5. RESULTADOS 67

5.1. A cultura de tumoresferas enriquece para células com o fenótipo tronco-tumoral e com maior atividade da quinase IKKβ 67

5.2. Inibição farmacológica ou por interferência de RNA de IKKβ reduz a expressão de marcadores de CITs 72

5.3. Inibição da atividade de IKKβ afeta seletivamente o crescimento clonogênico e a proliferação de células derivadas da cultura de tumoresferas 75

5.4. Inibição da atividade de IKKβ e a inibição dual de EGFR/ERBB2 reduz proliferação celular e formação de tumoresferas pelas linhagens A549 e H358 79

5.5. Inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduz a formação de tumoresferas e autorrenovação 90

5.6. Identificação de marcadores para purificação de CITs nas linhagens A549 e H35893

5.7. Inibição da atividade de IKKβ e EGFR/ERBB2 reduz a migração celular de células de adenocarcinoma pulmonar com mutação em *KRAS* 96

5.8. Inibição das vias da MAPK e da PI3K não afeta a atividade da quinase IKKβ em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS* 99

6. DISCUSSÃO 101

7. CONCLUSÕES 111

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112

SÚMULA CURRICULAR 132

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de pulmão

O câncer de pulmão representa a principal causa de morte relacionada ao câncer no mundo, sendo responsável por mais de 1,4 milhão de mortes anualmente **(Jemal et al., 2011)**. Das 8,8 milhões de mortes relacionadas ao câncer em 2015, 1,69 milhão foram causadas pelo câncer de pulmão; ou seja, esta neoplasia representa, por si só, quase 20% do número de mortes totais causadas pelo câncer **(OMS, 2018)**. No Brasil, o câncer de pulmão está entre os 5 tipos de câncer com maior incidência, sendo o segundo tipo mais comum em homens e o quarto em mulheres, onde foram estimados, respectivamente, 20.235 e 14.045 casos para o ano de 2014 **(OMS, 2014) (Figura 1.1)**. Assim como no resto do mundo, o câncer de pulmão é o câncer que de longe apresenta a maior taxa de mortalidade **(OMS, 2014)**.

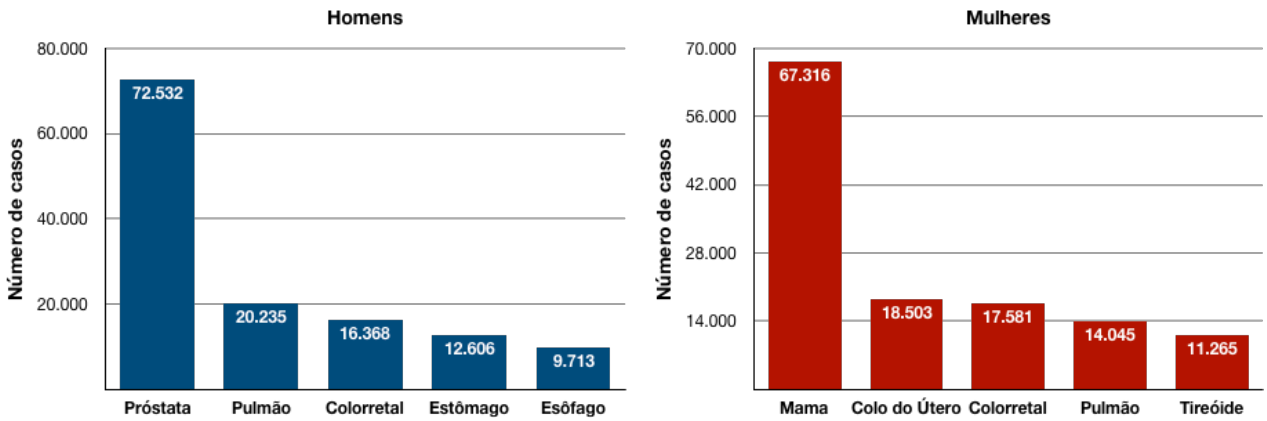


Figura 1.1. Neoplasias de maior incidência em homens e em mulheres no Brasil. Os gráficos mostram o número de casos das cinco neoplasias de maior incidência no Brasil no ano de 2014 segundo a Organização Mundial de Saúde. Em homens (esquerda), o câncer de próstata é o mais comum, enquanto que em mulheres (direita) é o câncer de mama. O câncer de pulmão é o segundo mais comum em homens e o quarto mais comum em mulheres. Figura adaptada de OMS, 2014.

Apesar dos inúmeros avanços terapêuticos das últimas décadas, a sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão continua sendo uma das menores, com apenas 14% dos pacientes sobrevivendo após cinco anos do diagnóstico e podendo chegar a menos de 5% para os estágios

mais avançados **(Tan et al., 2003) (Figura 1.2)**. Se não bastasse isto, de 1971 até 2011 praticamente não houve melhora na sobrevida de pacientes com câncer de pulmão quando comparado a outros tumores. Isto se deve, principalmente, à ausência de terapias-alvo eficazes e ao fato de os primeiros estágios da doença serem assintomáticos ou com sintomas comuns a outras doenças menos letais, comprometendo as chances de um diagnóstico precoce e resultando em tumores superestadiados, que geralmente são mais resistentes ao tratamento quimioterápico **(Tan et al., 2003; Minna, 2008)**.

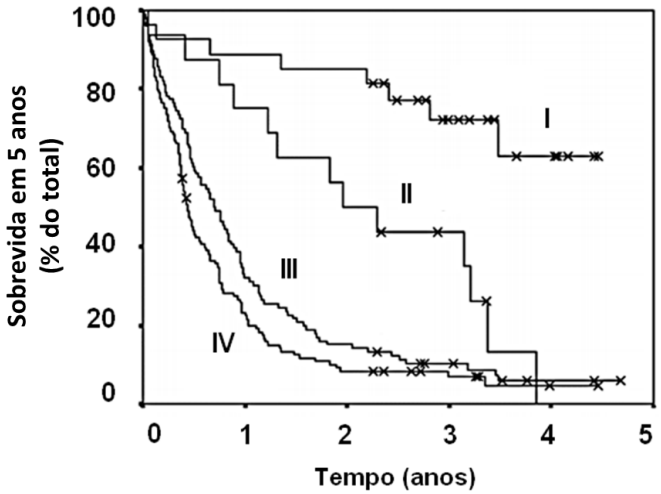


Figura 1.2. Sobrevida relativa em 5 anos comparando-se diferentes estágios do desenvolvimento tumoral pulmonar. O diagrama considera a sobrevida relativa em cinco anos para os quatro estágios variados do câncer de pulmão a partir do momento do diagnóstico. Uma vez que o curso inicial assintomático da doença leva ao diagnóstico tardio, a grande maioria dos tumores já são classificados em estágios III ou IV. Não surpreendentemente, a sobrevida diminui com a evolução tumoral, podendo chegar a menos de 5% para os estágios mais avançados. Figura adaptado de Tan et al., 2003.

Por razões clínico-patológicas, a classificação mais utilizada para as neoplasias pulmonares se dá em câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC, do inglês "*Non-Small Cell Lung Cancer"*) e câncer de pulmão de pequenas células (SCLC, do inglês "*Small Cell Lung Cancer"*) **(Brambilla et al., 2001)**. O câncer de pulmão de não-pequenas células representa cerca de 85% das neoplasias pulmonares **(Sher et al., 2008; Herbst et al., 2008)** e

é, ainda, subdividido histologicamente em carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células **(Ramalingam et al., 2011)**.

O câncer de pulmão é considerado uma doença altamente possível de ser evitada, uma vez que 75 a 90% dos casos estão relacionados ao consumo de tabaco **(Parkin et al., 2005)**. Todas as classificações histológicas de câncer de pulmão estão associadas ao tabagismo, embora esta relação seja bem mais forte para SCLC e carcinoma de células escamosas do que para o adenocarcinoma **(Khuder, 2001)**, que é a forma mais comum de câncer de pulmão em não-fumantes **(Kreuzer et al., 1999; Toh et al., 2006; Dibble et al., 2005)**.

Após o diagnóstico, o tratamento do paciente pode envolver cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapias-alvo, dependendo do tipo e do estágio da doença. Para os estágios iniciais, a cirurgia é geralmente o tratamento de escolha; que pode ser lobectomia (retirada de um lobo pulmonar) ou pneumectomia (retirada de um pulmão) **(Hammerschmidt e Wirtz, 2009)**. A quimioterapia pode, ainda, ser combinada com a cirurgia para diminuir as chances de recidiva. Para os estágios avançados, o paciente recebe quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas e drogas que aliviam os sintomas da doença.

Das alterações genéticas encontradas no adenocarcinoma de pulmão, as mais comuns são mutações pontuais ou amplificações de genes que regulam proliferação e sobrevida celular, tais como em *KRAS*, *EGFR*, *NF1*, *BRAF, ERBB2*, entre outros **(The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) (Figura 1.3)**. De fato, com a elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pela tumorigênese pulmonar **(Salgia e Skarin, 1998; Sharma et al., 2010)**, vários grupos começaram a buscar moléculas capazes de inibir componentes específicos importantes de vias que estão superativadas no câncer de pulmão.

Avanços significativos têm sido alcançado no desenvolvimento de terapias-alvo para pacientes com câncer de pulmão, principalmente naqueles com tumores induzidos por *EGFR*, *ERBB2*, *PI3K*, *BRAF* e *ALK*, que já contam com drogas específicas já aprovadas na clínica

(Sharma et al., 2010). Entretanto, aquisição de resistência à terapia ainda é um evento muito comum para diversos tipos tumorais, tornando este um problema recorrente no uso de drogas dirigidas **(Hologan et al., 2013)**.

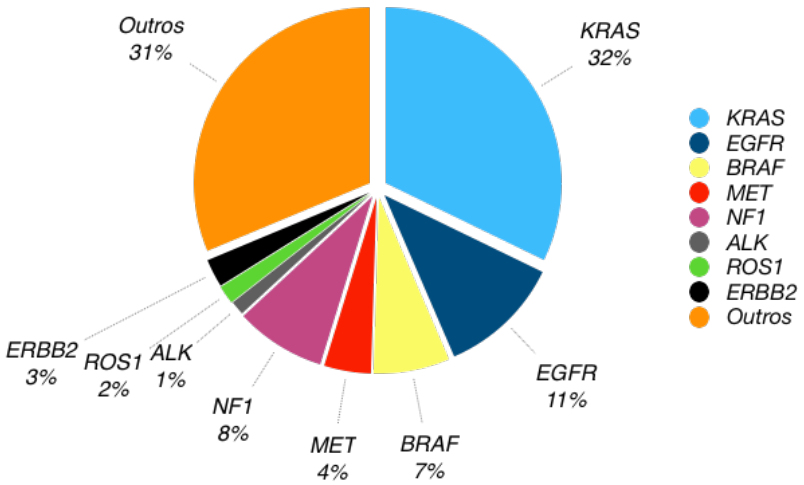


Figura 1.3. Distribuição das alterações genéticas mais frequentes em NSCLC. No diagrama acima estão representadas diferentes alterações genéticas encontradas em pacientes com câncer de pulmão, como *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *MET*, *NF1*, *ALK*, *ROS1* e *ERBB2*. Tais alterações incluem tanto mutações pontuais quanto amplificações genéticas, como é o caso de ERBB2 (mutações pontuais em 1,7% dos pacientes e amplificações em 0,9%). Figura adaptada de *The Cancer Genome Atlas Research Network*, 2014.

Por outro lado, pacientes oncológicos portadores de mutações em *KRAS* até hoje não foram beneficiados com terapias-alvo **(Cox et al., 2014)**, limitando a melhora na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão, uma vez que esta alteração genética ocorre em 30 a 40% dos casos **(The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014)**. Por este motivo, o desenvolvimento de novas terapias-alvo capazes de inibir eficientemente a atividade de KRAS oncogênica é extremamente necessário, não apenas para melhorar a sobrevida de pacientes com câncer de pulmão, mas também para beneficiar pacientes portadores de outras neoplasias induzidas pela forma oncogênica de KRAS.

1.2. A pequena GTPase KRAS

As proteínas RAS são pequenas GTPases monoméricas associadas à face interna da membrana plasmática que atuam como interruptores moleculares convertendo estímulos extracelulares em respostas intracelulares complexas. Em humanos, três genes da família RAS codificam quatro proteínas distintas, mas extremamente homólogas: HRAS, NRAS, KRAS4A e KRAS4B, sendo as duas últimas variantes de *splicing* alternativo do gene *KRAS*.

A identificação destes genes iniciou-se em 1964, quando Jennifer Harvey observou que vírus de leucemia murina isolados de ratos leucêmicos podiam induzir sarcomas em roedores recém-nascidos **(Harvey, 1964)**. Posteriormente, outros três retrovírus capazes de induzir transformação maligna foram identificados: Kirsten-MSV (do inglês *Kirsten **m**urine **s**arcoma **v**irus*) em 1967 **(Kirsten e Mayer, 1967)**, BALB-MSV (do inglês ***m**urine **s**arcoma **v**irus of the BALB/cCr mouse*) em 1974 **(Peters et al., 1974)** e RaSV (do inglês ***ra**t **s**arcoma **v**irus*) em 1978 **(Rasheed et al., 1978)**.

Com o desenvolvimento de técnicas bioquímicas para transferir uma única cópia de genes em células de mamíferos **(Wigler et al., 1978)**, cientistas começaram, a partir de experimentos de ganho de função, a buscar genes capazes de induzir alterações morfológicas em diversos tipos celulares. O primeiro relato ocorreu em 1979, quando fibroblastos murinos NIH-3T3 foram transformados pela incorporação de DNA genômico isolado de células murinas quimicamente transformadas **(Shih et al., 1979)**. Tal evidência não foi facilmente recebida pela comunidade científica, uma vez que as células NIH-3T3 eram conhecidas por sofrerem transformação espontânea em passagens seriadas. Mais tarde, em resposta às críticas, o mesmo grupo e outros pesquisadores demonstraram que a transformação das células NIH-3T3 era, de fato, consequência do fragmento de DNA incorporado por estas células (**Shih, et al., 1981; Perucho et al., 1981)**. Finalmente, com o advento da clonagem molecular, qualquer dúvida remanescente quanto a existência de genes humanos capazes de induzir transformação maligna

foi resolvida com evidências de três grupos distintos, que isolaram e caracterizaram sequências transformadoras de células humanas de carcinoma de bexiga **(Shih e Weinberg, 1982; Goldfarb et al., 1982; Pulciani et al., 1982)**.

Ainda, pouco depois foi demonstrado que as primeiras células NIH-3T3 transformadas continham a forma ativada do oncogene *KRAS* **(Parada e Weinberg, 1983)**. Simultaneamente, um novo gene transformador humano que não possui um homólogo retroviral foi identificado em células de neuroblastoma e denominado *NRAS* **(Shimizu et al., 1983; Hall et al., 1983)**.

Estudos posteriores a estas descobertas de extrema relevância biológica confirmaram o que a comunidade científica já suspeitava: os oncogenes *RAS* não exerciam um papel transformador apenas nas células crescidas em laboratório, mas também em tumores humanos, uma vez que em 1984 foi identificada uma mutação oncogênica em *KRAS* através de biópsias de um paciente com câncer de pulmão, onde a forma normal do gene *KRAS* mantinha-se presente nos tecidos normais do mesmo paciente **(Santos et al., 1984)**. É interessante que, mesmo 50 anos após sua descoberta, muito ainda há a ser investigado sobre a biologia de RAS e seu papel em doenças humanas.

1.2.1. Estrutura, função e regulação

Os três genes da família RAS codificam quatro pequenas proteínas de aproximadamente 21 kDa: HRAS, NRAS, KRAS4A e KRAS 4B. Enquanto que HRAS, NRAS e KRAS4A possuem 189 aminoácidos, KRAS4B possui 188 aminoácidos. Essa diferença é resultado da incorporação de um éxon 4 diferente em sua estrutura – os éxons 4A e 4B do gene *KRAS* codificam 39 e 38 aminoácidos, respectivamente. Todas as quatro isoformas compartilham cerca de 89% de homologia em seu domínio catalítico (resíduos 1-166), também denominado domínio G. A sequência de maior diferença entre as quatro isoformas (resíduos 167-188/189) é denominada região hipervariável (HVR, do inglês *hypervariable region*), que envolve uma

região C-terminal conhecida como motivo CAAX (onde C representa cisteína, A geralmente representa um aminoácido alifático, e X qualquer aminoácido), importante para modificações pós-traducionais e subsequente associação à face interna da membrana plasmática **(Hancock, 2003; Castellano e Santos, 2011)**.

Estruturalmente, o domínio G das proteínas RAS contém seis folhas-β intercaladas com cinco α-hélices. O domínio G liga-se diretamente ao difosfato de guanosina (GDP) ou ao trifosfato de guanosina (GTP) e é composto de cinco motivos G: motivo G1 (ou *P-loop*), motivo G2 (ou *Switch I*), motivo G3 (ou *Switch II*), motivo G4 e motivo G5 **(Vetter, 2014) (Figura 1.4)**. A afinidade do domínio G com o monofosfato de guanosina (GMP) é geralmente muito baixa quando comparada com o GDP e GTP **(John et al., 1990)**. O motivo G1 liga-se diretamente ao oxigênio do fosfato-β e do fosfato-γ do nucleotídeo de guanina através de uma lisina (K), um aminoácido positivamente carregado, enquanto que o motivo G2 interage com o fosfato-γ do GTP e a um íon de magnésio através da treonina 35. O motivo G3 auxilia na interação com o fosfato-γ e desempenha um papel crucial na regulação da atividade das proteínas RAS, uma vez que participa da interação com os fatores de troca de nucleotídeo de guanina (GEFs, do inglês *guanine nucleotide exchange factors*) e no estímulo da hidrólise de GTP pelas proteínas ativadoras de GTPases (GAPs, do inglês *GTPase activating proteins*). O domínio G4, por sua vez, carrega um aspartato em sua estrutura que é responsável pela especificidade de ligação a guanina, uma vez que não consegue se ligar a adenina, por exemplo. O motivo G5 auxilia nesta interação **(Vetter, 2014)**.

O domínio G das proteínas RAS sofre mudança conformacional quando troca o tipo de nucleotídeo de guanina ao qual está ligado. Quando complexado com GTP, o fosfato-γ faz com que os motivos G2 e G3 assumam uma conformação mais próxima ("fechada") do nucleotídeo, conferindo a RAS uma afinidade muito maior a suas moléculas efetoras do que quando complexada com GDP, que, devido a ausência do fosfato-γ, assume uma conformação mais

"aberta" e menos suscetível a interação com moléculas efetoras **(Filchtinski et al., 2010; Vetter e Wittinghofer, 2001; Ostrem e Shokat, 2016)**. De fato, estudos com a purificação *in vitro* e estrutura cristalina de RAS prova que essas proteínas possuem diferenças estruturais frente a sua capacidade de ligação ao GDP e ao GTP **(Borjack-Sjodin, et al., 1998; Cox et al., 2014; Ostrem e Shokat, 2016)**.

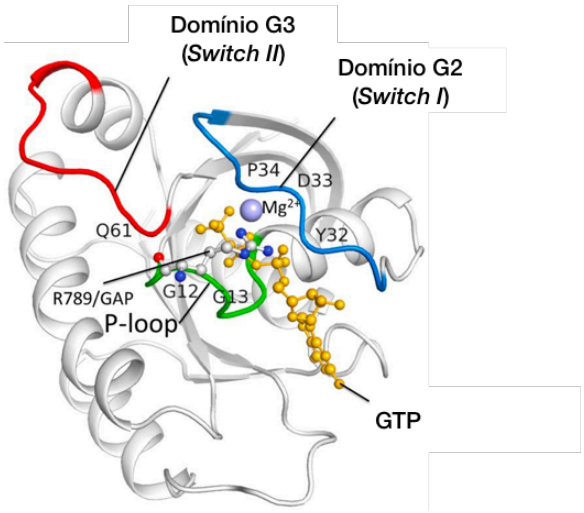


Figura 1.4. Estrutura tridimensional de KRAS. A proteína KRAS contém 5 motivos G e os motivos G1 (P-loop), G2 (Swtich I) e G3 (Switch II) estão indicados na figura em verde, azul e vermelho, respectivamente. A ligação ao GTP (em amarelo) é estabilizada pela presença de magnésio e com o auxílio dos aminoácidos G12 e G13 do domínio G1 e Y32, D33 e P34 do domínio G2. O aminoácido Q61 do domínio G3 é essencial para a interação de KRAS com GEFs. Figura adaptada de Chen et al., 2013.

As proteínas RAS requerem modificações pós-traducionais e associação à membrana plasmática para que possam exercer sua função biológica. Este é um processo que consiste em várias etapas e que resulta em ganho de hidrofobicidade na região C-terminal, mais especificamente pelo motivo CAAX **(Ahearn et al., 2012; Friday e Adjei, 2005; Wright e Philips, 2006)**. Primeiramente, a sequência CAAX serve de substrato para uma farnesiltransferase, que transfere um grupo farnesil à cisteína; tal modificação recebe o nome de prenilação. Alternativamente, dependendo do último aminoácido do motivo CAAX ou na presença de um inibidor de farnesiltransferase, as proteínas RAS podem receber o grupo

geranilgeranil por uma geranilgeranil transferase do grupo I (GGT1) ou do grupo II (GGT2) **(Schaber et al., 1990; Friday e Adjei, 2005)**. Sequencialmente, as proteínas RAS farnesiladas sofrem clivagem proteolítica dos aminoácidos AAX pelas CAAX proteases RCE1 ou AFC1 **(Trueblood et al., 2000)** seguida por uma carboximetilação realizada por uma metiltransferase específica **(Clarke, 1992)**. Finalmente, HRAS, NRAS e KRAS4A sofrem palmitoilação do grupo SH em resíduos de cisteína próximos a região C-terminal **(Resh, 2004)**, enquanto que KRAS4B não é palmitoilada, uma vez que essa isoforma contém uma região rica em resíduos de lisina (positivamente carregados), consequentemente favorecendo sua ancoragem à membrana plasmática devido a interações eletrostáticas **(Jackson et al., 1994) (Figura 1.5)**.

Embora sejam altamente similares estruturalmente, as proteínas RAS podem exibir diferentes funções biológicas, que resultam de suas especificidades diferentes em vias de transdução de sinais, de seus diferentes níveis de compartimentalização dentro da célula, bem como de suas associações a domínios específicos da membrana plasmática **(Seabra, 1998)**. Um exemplo disso é um estudo que mostra que a deleção individual ou combinada dos genes *HRAS* e *NRAS* não afeta o desenvolvimento normal de camundongos, enquanto que a deleção do gene *KRAS* é extremamente importante **(Johnson et al., 1997)**.

Uma vez associada à membrana plasmática, as proteínas RAS, como quaisquer outras GTPases, alternam entre dois estados: ativo, quando ligadas à GTP, e inativo, quando ligadas a GDP. Essas pequenas GTPases possuem atividade GTPásica intrínseca, porém altamente ineficiente, uma vez que RAS purificadas *in vitro* lentamente hidrolisam GTP em GDP. Além disso, também apresentam baixa velocidade de troca de nucleotídeos, ou seja, GDP é gradualmente substituído por GTP **(Takai et al., 2001; Downward, 2003)**. Entretanto, estes processos são catalisados dentro da célula através de interações físicas com as proteínas GAPs e GEFs, que regulam fortemente a transdução de sinal mediada por RAS.

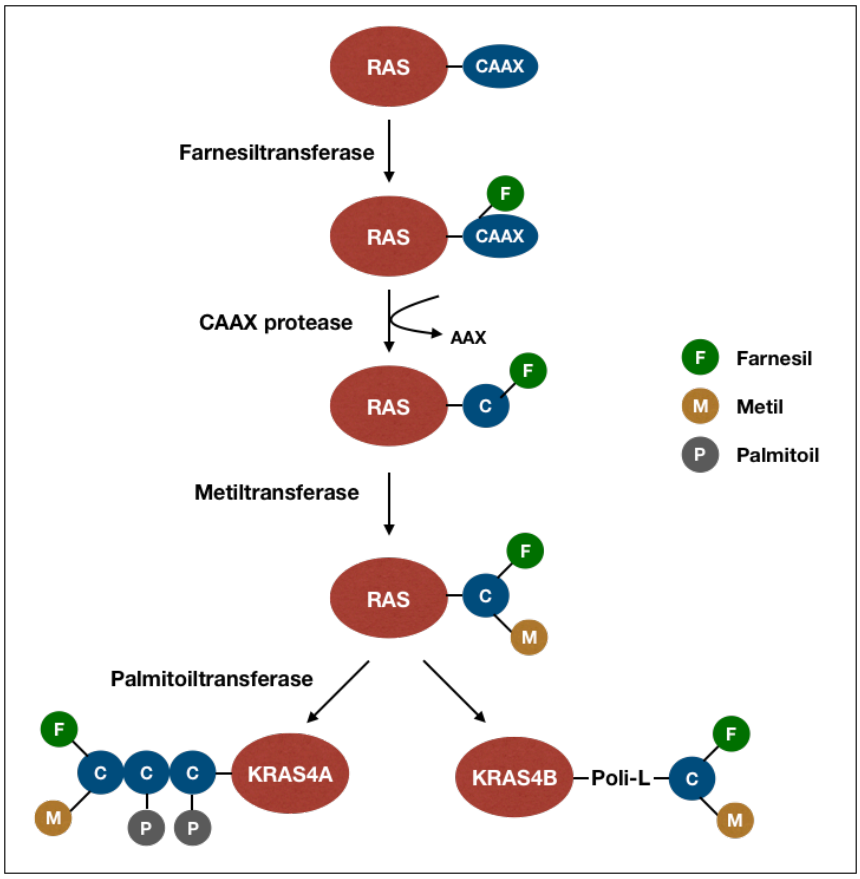


Figura 1.5. Modificações pós-traducionais das proteínas RAS. A extremidade carboxiterminal é altamente conservada em todas as proteínas RAS (HRAS, NRAS, KRAS4A e KRAS4B). Um motivo CAAX presente nesta região representa a sequência de aminoácidos que passam pelas modificações pós-traducionais. Primeiramente, o resíduo de cisteína (C) do motivo CAAX sofre farnesilação por uma farnesiltransferase. Posteriormente, o tripeptídeo AAX é clivado por uma CAAX protease e o resíduo de cisteína é metilado por uma metiltransferase. KRAS4B, que possui uma região rica em lisina (Poli-L) na extremidade carboxiterminal facilita sua associação à membrana plasmática, enquanto que as demais proteínas RAS (KRAS4A, HRAS e NRAS) recebem a adição de resíduos de cisteínas que sequencialmente são palmitoilados, o que também contribui para a sua associação à membrana plasmática.

Um dos mecanismos mais estudados e caracterizados que leva à ativação de RAS envolve a ativação de receptores tirosina-quinase (RTKs, do inglês *receptor tyrosine kinases*) da família de proteínas denominadas ERBB, a qual compreende quatro membros: EGFR (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*, ou ERBB1), ERBB2 (HER2/Neu), ERBB3 (HER3) e ERBB4 (HER4) **(Lemmon e Schlessinger, 2010)**. Diferentes moléculas solúveis são reconhecidas por estes receptores, tais como EGF, TGFα, epirregulina, anfirregulina e

neurorregulina, e são capazes de induzir homo ou heterodimerização destes RTKs e sua subsequente ativação por fosforilação cruzada **(Roskoski, 2014)**.

Uma vez ativado, o receptor recruta uma série de proteínas adaptadoras, das quais a proteína GRB2 (do inglês *growth-factor-receptor-bound protein 2*) faz parte. Através do domínio SH2, GRB2 interage diretamente com os resíduos fosforilados do receptor, enquanto que através do domínio SH3, GRB2 interage com a proteína SOS ou Cdc25, dois dos vários fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) **(Downward, 2003)**. Uma vez recrutada para a membrana plasmática, onde RAS está localizada, a proteína SOS induz uma mudança conformacional em RAS que resulta na liberação do GDP. Com o sítio catalítico de RAS livre, outra molécula de GDP ou uma molécula de GTP pode agora se ligar ao domínio G vazio. Uma vez que GTP é o nucleotídeo de guanina mais abundante na célula, a formação do complexo RAS-GTP é favorecida, levando, portanto, RAS ao seu estado ativo **(Downward, 2003)**.

Uma vez ligada a GTP, KRAS ativa uma variedade de moléculas efetoras responsáveis, principalmente, por induzir proliferação e sobrevivência celular, diferenciação, migração e alterações no citoesqueleto **(Figura 1.6) (Zuber et al., 2000; Crespo e Leon, 2000; Wu et al., 2009; Wiesmüller e Wittinghoffer, 1994; Cox e Der, 2010; Mitin et al., 2005; Wennenberg et al., 2005)**. Essas cascatas de sinalização incluem, sobretudo, a ativação das vias RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, RAC-GEFs, PLCε/PKC, entre outras **(Downward, 2003; Shields et al., 2000; Castellano e Downward, 2011; Kelley et al., 2001; Cherfils e Zeghouf, 2013)**.

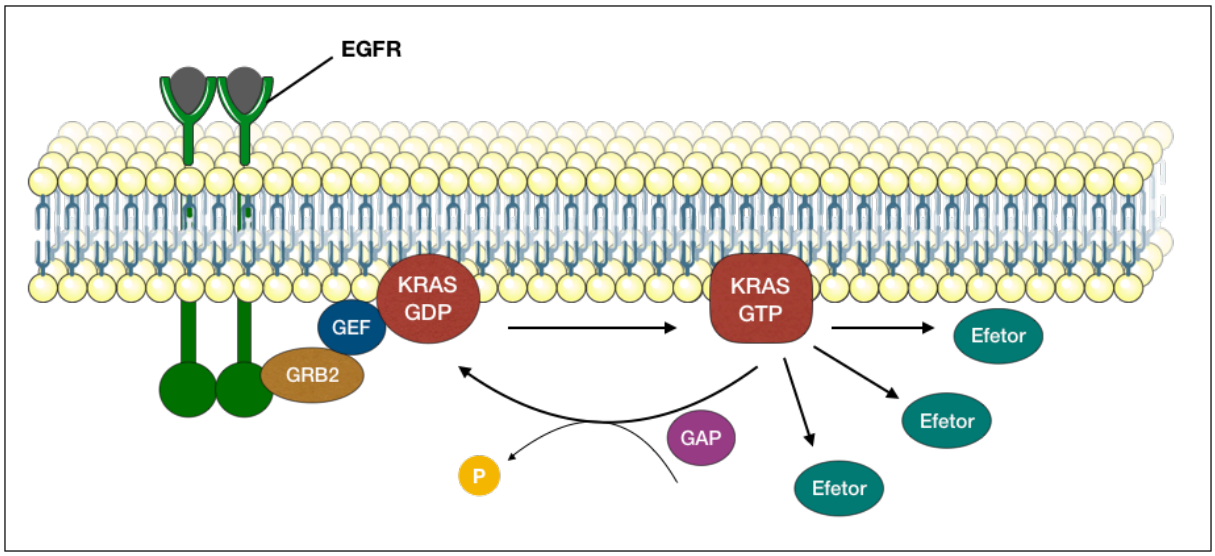


Figura 1.6. Regulação da atividade de KRAS através da ativação de um receptor tirosina-quinase. Um fator de crescimento (EGF) liga-se a uma molécula de EGF, induzindo sua dimerização e autofosforilação. Esta ativação resulta no recrutamento da proteína acessória GRB2 que ativa as GEFs. Desta forma, as GEFs reconhecem a forma inativa de KRAS (ligada a GDP) e induzem a troca do nucleotídeo de guanina. Em sua forma ativa (ligada a GTP), KRAS consegue interagir com diferentes efetores cujas funções estão relacionadas, principalmente, à sobrevida e proliferação celular. O sinal cessa quando GAPs interagem com KRAS e promovem a hidrólise do GTP a GDP. Quando isto ocorre, a ativação dos efetores induzida por KRAS é interrompida e um novo ciclo de ativação e inativação pode ser iniciado.

A atividade catalítica intrínseca de RAS depende criticamente de dois resíduos de aminoácidos, a treonina 35 e a glutamina 61, que, através de ligações de hidrogênio, se ligam a uma molécula de água necessária para reação de hidrólise **(Scheffzek et al., 1997)**. Por fim, a transdução de sinal cessa quando proteínas GAPs interagem com o complexo RAS-GTP e aumentam exponencialmente a eficiência catalítica de RAS, levando, consequentemente, à rápida hidrólise do GTP a GDP. Desta forma, RAS passa para o seu estado inativo e um novo ciclo de ativação/inativação pode iniciar-se.

Devido a forte correlação das vias ativadas por KRAS com proliferação e sobrevivência celular, mutações específicas no gene *KRAS* estão diretamente relacionadas com divisão celular descontrolada e, consequentemente, desenvolvimento de tumores.

1.2.2. KRAS e câncer

Em organismos multicelulares, uma complexa rede de vias de sinalização é responsável por manter a homeostase tecidual. Câncer é o resultado do desequilíbrio dos mecanismos normais que controlam o crescimento celular, frequentemente causado por alterações genéticas e/ou epigenéticas que controlam morte e proliferação celular **(Hanahan e Weinberg, 2011)**. Neste contexto, KRAS desempenha um papel crucial na tumorigênese, uma vez que mutações em *KRAS* são, de longe, as alterações genéticas mais frequentemente encontrada em tumores humanos **(Forbes et al., 2011; Prior et al., 2012)**. Aproximadamente 30% de todas as neoplasias humanas apresentam mutações de ponto em algum gene da família RAS **(Friday e Adjei, 2005)**. Destas, cerca de 85% ocorrem em *KRAS*, quase 15% em *NRAS* e menos de 1% em *HRAS* **(Bos, 1989; Downward, 2003)**.

Molecularmente, o mecanismo pelo qual KRAS está diretamente relacionada à transformação maligna envolve tanto a sua capacidade de interagir com GAPs, que são responsáveis por "desligar" a transdução de sinal mediada por KRAS, quanto a sua atividade catalítica intrínseca de hidrólise de GTP. Neste contexto, os códons 12 e 13 do motivo G2 (*Swtich I*) são essenciais para que as GAPs possam reconhecer o complexo KRAS-GTP. Portanto, mutações nestes resíduos frequentemente levam à grande perda de afinidade entre KRAS e GAPs **(Macaluso et al., 2002; Aviel-Ronen et al., 2006)**. Ainda, mutações no códon 61 do motivo G3 (*Switch II*), fundamental para inerente atividade catalítica de KRAS, também estão relacionadas à tumorigenicidade induzida por KRAS **(Friday e Adjei, 2005)**. Em ambas as situações, KRAS torna-se constitutivamente ativa e leva, portanto, à proliferação celular descontrolada **(Figura 1.7)**.

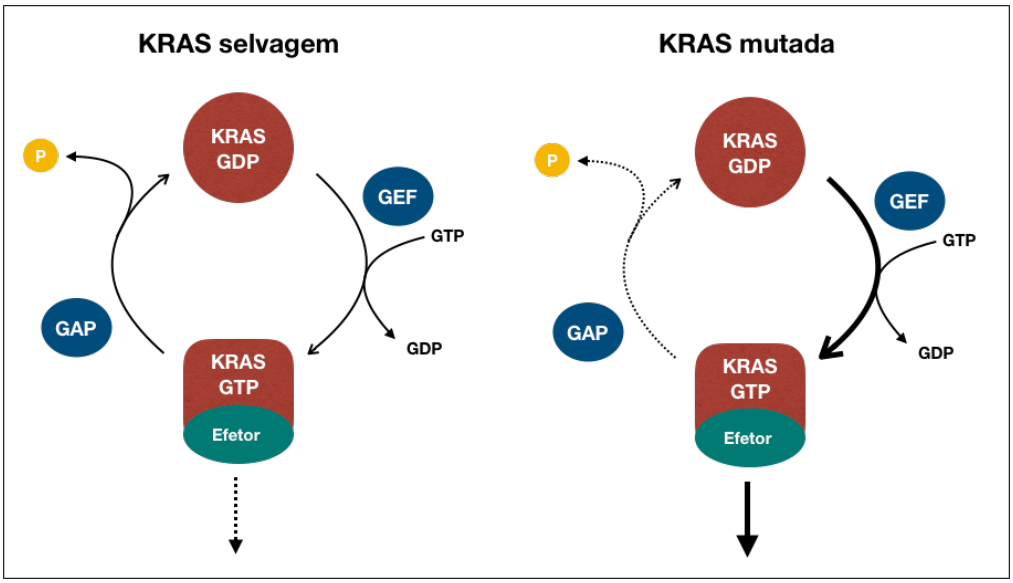


Figura 1.7. Regulação da atividade de KRAS selvagem e KRAS mutada. KRAS selvagem se liga a GDP e GTP com afinidade picomolar. Com os níveis de GDP e GTP na célula estão em concentrações milimolares, KRAS está constantemente ligada a um nucleotídeo de guanina. KRAS possui atividade catalítica intrínseca e atividade de troca de nucleotídeo de guanina baixa e, por isso, seu estado é regulado por interações com GEFs e GAPs. Após o estímulo de um fator de crescimento, GEFs são ativadas e KRAS passa para o estado ativo (ligado a GTP), quando interage com seus efetores. Em células normais, a ativação dos efetores é regulada através de interações entre KRAS com GAPs, levando à hidrólise do GTP. Devido a mutações em G12, G13 e G61, KRAS perde afinidade por GAPs ou sua atividade catalítica intrínseca, levando à uma menor regulação de sua atividade e promovendo ativação constitutiva de seus efetores.

Dentre as mutações pontuais em *KRAS*, 98% concentram-se em alterações que levam à substituição dos resíduos G12, G13 ou Q61 **(Cox et al., 2014)**. Além disso, em adenocarcinoma pulmonar, cerca de 91% das substituições estão em G12, 6% em G13, 2% em Q61 e 1% em outras regiões, como, por exemplo, no resíduo A146. Para esta mesma neoplasia, as trocas de aminoácidos mais comuns são G12C, G12V, G12D e G12A **(Cox et al., 2014)**.

Interessantemente, alguns estudos vêm demonstrando que as variantes oncogênicas de KRAS possuem diferentes propriedades bioquímicas e tumorigênicas, que, portanto, geram diferentes respostas clínicas **(Prior et al., 2012; Hunter et al., 2015)**. Esta é uma observação extremamente relevante, uma vez que os modelos *in vivo* disponíveis para se estudar tumores pulmonares induzidos por KRAS baseiam-se quase que exclusivamente no *knock-in* mediado pela Cre recombinase, que leva à expressão de $KRAS^{G12D}$ **(Jackson et al., 2001; Johnson et**

al., 2001). Porém, expressão de $KRAS^{G12D}$ está presente em menos de 20% dos casos de adenocarcinoma pulmonar humano **(TCGA Research Network, 2014)**. Finalmente, um estudo recente mostrou que a incorporação de diferentes aminoácidos nos resíduos G12 e G13 de KRAS resulta em níveis distintos de tumorigenicidade e agressividade em adenocarcinoma de pulmão **(Winters et al., 2017)**, indicando que o modelo animal utilizado quase que de forma unânime nesta área não considera outros tipos de mutações, que talvez poderiam ser mais suscetíveis ou resistentes a um determinado tratamento do que tumores induzidos por $KRAS^{G12D}$.

Tumores que exibem mutações em *KRAS* estão associados a um comportamento extremamente agressivo e de pior prognóstico de adenocarcinoma colorretal **(Andreyev et al., 2001; Bazan et al., 2002)**, carcinoma de tireoide **(Garcia-Rostan et al., 2003)** e câncer de pulmão **(Mascaux et al., 2005; Izar et al., 2014; Ohtaki et al., 2014)**. Não obstante, mais de 90% dos pacientes com adenocarcinoma de ducto pancreático possuem mutação em *KRAS*, cuja sobrevida em 5 anos é uma das menores possíveis (menos de 8%) entre todas as neoplasias humanas **(Hezel et al., 2006; Ryan e Hong, 2014; Waddell et al., 2015)**.

Além das mutações pontuais existem outros mecanismos que, embora menos frequentes, também são responsáveis pelas propriedades oncogênicas de KRAS. Estes envolvem amplificação do gene *KRAS*, que é altamente frequente em adenocarcinoma de esôfago **(Galiana et al., 1995),** e perda de um ou de dois alelos que codificam para GAPs específicas **(Weiss et al., 1999)**, cujo exemplo mais conhecido ocorre em pacientes com neurofibromatose do tipo I.

1.2.3. KRAS como alvo terapêutico

Como apontado anteriormente, KRAS desempenha um papel central na biologia do câncer, uma vez que está envolvida em muitos dos *hallmarks* do câncer propostos por **Hanahan**

e Weinberg (2011). Além de seu papel óbvio em promover divisão celular descontrolada por diversos mecanismos, a KRAS oncogênica também está envolvida na reprogramação metabólica de diversos tumores **(Kerr et al., 2016; Pylayeva-Gupta et al., 2011)**, na inflamação e supressão imune **(Kortlever et al., 2017)**; na angiogênese tumoral **(Matsuo et al., 2009)** e na promoção de um fenótipo invasivo e metastático **(Boutin et al., 2017; Pylayeva-Gupta et al., 2011).**

Portanto, embora seja um alvo terapêutico racional, inibição da atividade de KRAS tem se mostrado um enorme desafio, trazendo uma percepção de que KRAS seja "*undruggable*" **(Cox et al., 2014)**. Desta forma, uma melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares pelos quais KRAS promove o fenótipo maligno, sustenta o crescimento tumoral, auxilia na disseminação de metástases e resiste aos tratamentos convencionais podem trazer informações extremamente relevantes no desenvolvimento de terapias clinicamente eficazes.

Com base nisto, diferentes estratégias terapêuticas serão discutidas adiante que foram estudadas com o objetivo de se melhorar a sobrevida de pacientes oncológicos portadores de mutações em *KRAS*, que até hoje carecem de terapias alvo-eficazes.

1.2.3.1. Inibição direta de KRAS

O desenvolvimento de pequenas moléculas que inibem a atividade de KRAS diretamente tem se mostrado um grande desafio. Isso se deve, principalmente, ao fato de KRAS ativar seus efetores *downstream* por meio de interações proteína-proteína e por não apresentar regiões adequadas onde inibidores poderiam se ligar, exceto pelo sítio de ligação ao GDP/GTP que, infelizmente, tem afinidade incrivelmente alta por estes nucleotídeos (da ordem de picomolar), tornando o uso de moléculas análogas uma abordagem extremamente complicada **(McCormick, 2015)**. Desta forma, inibidores diretos teriam que impedir a interação efetiva entre a proteína KRAS e seus efetores. Isso poderia ser atingido através de quatro maneiras: (1)

reduzindo os níveis do complexo KRAS-GTP; (2) rompendo a interação de KRAS-GTP com seus efetores; (3) regulando negativamente a expressão do gene *KRAS*; ou (4) inibindo a associação de KRAS à membrana plasmática **(Ostrem et al., 2016; McCormick, 2015)**.

Primeiramente, a redução dos níveis do complexo KRAS-GTP pode depender tanto da ligação de uma molécula que prenda KRAS em seu estado inativo quanto da inibição de GEFs. Em relação à primeira, o inibidor SCH-53239 foi o primeiro a ser sintetizado a fim de competir com o GDP pela ligação ao sítio catalítico de KRAS **(Taveras et al., 1997)**. Entretanto, também foi demonstrado que o seu parceiro hidrofílico (SCH-54292) se ligava à uma região próxima ao domínio G3 (*Switch II*), que não está envolvida na ligação com o GDP **(Taveras et al., 1997)**. Seguindo a mesma linha, outra tentativa envolveu a síntese de um análogo bicíclico do SCH-54292, que demonstrou inibir o crescimento celular mediado por KRAS **(Peri et al., 2005)**. Este composto, porém, contém hidroxilamina em sua estrutura, que parece ser crucial para sua atividade, mas que inviabiliza seu uso *in vivo* devido à alta toxicidade e instabilidade metabólica **(Cox et al., 2014)**. Sucessivamente, estudos recentes vêm utilizando uma abordagem extremamente interessante, a qual se baseia na inibição mutante-específica de KRAS. Neste contexto, foi demonstrado que pequenas moléculas se ligam seletiva e irreversivelmente à $KRAS^{G12C}$ **(Ostrem et al., 2013)**, a variante mais comum em adenocarcinoma de pulmão. Ainda, outros dois estudos mostraram que uma série de inibidores se ligam covalentemente à $KRAS^{G12C}$, prendendo-a na sua conformação do estado inativo e inibindo a ativação de suas vias *downstream* **(Lito et al., 2016; Patricelli et al., 2016)**. Estes estudos também foram altamente relevantes porque trouxeram fortes evidências de que KRAS mutada está superativada, ao invés de presa num estado ativo estático. Finalmente, um estudo recente se propôs a investigar se estas moléculas funcionam *in vivo* e demonstrou que a molécula ARS-1620 se liga à $KRAS^{G12C}$ num modelo animal xenográfico e leva a redução da massa tumoral **(Janes et al., 2018)**. Embora este inibidor atue exclusivamente sobre a atividade

de versões mutantes de KRAS que tenham sofrido a substituição da glicina 12 por cisteína, estes trabalhos trazem grande otimismo de que inibição direta de KRAS talvez seja ainda possível na clínica, mesmo que beneficie apenas uma parcela dos pacientes oncológicos com mutação em *KRAS*.

Ainda, a inibição de GEFs também parece uma abordagem plausível, uma vez que esta classe de proteínas auxilia na troca de GDP por GTP, favorecendo a ativação de RAS. Neste contexto, um peptídeo inspirado na região da proteína SOS que se liga a RAS foi desenhado e verificou-se que esse peptídeo se ligava à RAS-GDP, impedindo a interação com SOS e inibindo a formação do complexo ativo RAS-GTP **(Patgiri et al., 2011)**.

Segundamente, o rompimento da interação KRAS-GTP com seus efetores foi estudado com base na inibição da formação do complexo RAS-RAF através dos compostos Kobe0065 e Kobe2602, que foram capazes de diminuir a fosforilação dos alvos *downstream* de RAS, tais como MEK, ERK e AKT, além de inibirem o crescimento tumoral em um modelo xenográfico de câncer de cólon ($KRAS^{G12V}$) **(Shima et al., 2013)**. Contudo, novamente a presença de grupamentos tóxicos dificultam a utilização destes compostos em estudos translacionais. Por outro lado, talvez sirvam como base para o desenvolvimento de outras moléculas não-tóxicas que se baseiem nesta mesma abordagem.

Em terceiro lugar, a regulação negativa da expressão de KRAS oncogênica pode ser abordada com o uso de pequenos RNAs de interferência (siRNA, do inglês *small interference RNA*). Algumas tentativas têm sido altamente promissoras quanto a inibição da expressão de KRAS em modelos murinos pré-clínicos **(McCormick, 2015)**. Por exemplo, a regressão de tumores induzidos por KRAS foi observada através da administração sistêmica de nanopartículas sintéticas carregando um potente siRNA para KRAS. Ainda, melhores resultados foram obtidos quando estes siRNAs foram combinados com siRNAs inibindo também PI3K na mesma nanopartícula **(Yuan et al., 2014)**. Outros trabalhos também

demonstraram que a inibição simultânea de KRAS e do microRNA miR-34A por siRNA utilizando um veículo diferente preveniu o crescimento de tumores de pulmão *in vivo* **(Xue et al., 2014)** e inibição específica de $KRAS^{G12D}$ em um modelo animal de câncer de pâncreas foi possível por um polímero biodegradável carregando um siRNA específico **(Khavalevsky et al., 2013)**. Por fim, um estudo recente utilizou microRNAs artificiais capazes de inibir apenas KRAS mutada **(Acunzo et al., 2017)**, deixando claro o quanto estas técnicas ainda podem ser exploradas e aprimoradas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

Finalmente, muito estudos têm explorado uma outra abordagem relevante no tratamento de tumores induzidos por mutações em KRAS: a inibição das diferentes etapas responsáveis pelas modificações pós-traducionais de RAS, uma vez que estas são responsáveis por sua associação à membrana plasmática e, consequentemente, essencial para sua função. Neste contexto, as primeiras tentativas fazendo uso desta abordagem utilizaram inibidores de farnesiltransferases **(Jackson et al., 1990; Reiss et al., 1990; Kohl et al., 1993; James et al., 1993)**. Entretanto, como mencionado anteriormente, em células tratadas com inibidores de farnesiltransferases, KRAS pode sofrer prenilação alternativa por geranilgeranil transferases **(Whyte et al., 1997)**. Provavelmente por causa disto, ensaios clínicos utilizando inibidores de farnesiltransferases falharam em demonstrar atividade antitumoral em tumores induzidos por KRAS **(Ostrem et al., 2016)**. Embora a combinação de inibidores de geranilgeranil transferases e farnesiltransferases tenham inicialmente se mostrado promissores pela redução no desenvolvimento de tumores em camundongos com câncer de pulmão induzido por KRAS **(Liu et al., 2010)**, mais tarde foi demonstrado que a inibição conjunta destas enzimas causava sérios efeitos colaterais, principalmente cardiotóxicos **(Berndt et al., 2011)**, provavelmente pelo fato de várias outras proteínas serem substrato destas enzimas para associação à membrana plasmática. Apesar da inibição das outras etapas das modificações pós-traducionais de RAS já terem sido descritas **(Cox et al., 2014)**, como, por exemplo, a inibição das enzimas responsáveis

pela clivagem proteolítica do tripeptídeo AAX, é extremamente relevante investigar se as respostas celulares observadas são consequência do efeito *on-target* de RAS, já que, mais uma vez, estas enzimas possuem vários outros substratos.

1.2.3.2. Inibição indireta de KRAS

A grande dificuldade em trazer para clínica pequenas moléculas capazes de inibir diretamente a atividade de KRAS sem grande toxicidade gerou a necessidade de buscar diferentes estratégias terapêuticas. Ainda que muito avanço tenha sido feito no âmbito da inibição direta de RAS, como o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir variantes oncogênicas específicas de KRAS e o progresso no desenho de novos veículos capazes de carregar siRNAs para a massa tumoral, uma abordagem alternativa se baseia na inibição de efetores *downstream* de KRAS que estão estritamente relacionados às suas propriedades malignas. Embora desafiador, uma vez que KRAS ativa uma série de cascatas de sinalização que contribuem para o fenótipo oncogênico **(Pylayeva-Gupta et al., 2011; Rodrigues-Viciana et al., 2005)**, acredita-se que a eficácia terapêutica pode ser alcançada através da inibição conjunta de alvos específicos.

De todas as famílias de efetores ativadas por RAS identificadas até hoje, quase metade está relacionada à tumorigênese e manutenção do crescimento tumoral mediado por RAS **(Vigil et al., 2010; Baines et al., 2011)**. Destas, a família de serina/treonina quinases RAF (a-RAF, b-RAF, c-RAF) potencialmente representa os efetores mais importantes no desenvolvimento de tumores induzidos por RAS **(Blasco et al., 2011; Collisson et al., 2012)**. Neste contexto, inibidores da via RAF-MEK-ERK já foram extensivamente estudados em diferentes contextos, inclusive na clínica.

Uma característica dos inibidores de RAF é que eles inibem a ativação de ERK apenas em tumores com mutações em *BRAF* **(Solit e Rosen, 2011; Lito et al., 2013),** enquanto que em

tumores induzidos por RAS, estes inibidores levam, paradoxalmente, à ativação de ERK **(Heidorn et al., 2010; Poulikakos et al., 2010; Hatzivassiliou et al., 2010)**. O mecanismo que explica esta observação está baseado na transativação de dímeros de RAF **(Poulikakos et al., 2010)**. A ligação do inibidor em uma das moléculas de RAF do dímero induz uma mudança conformacional que resulta na ativação de molécula de RAF não-ligada ao inibidor. Desta forma, a molécula ligada ao inibidor está inativa, enquanto que a molécula não-ligada é alostericamente ativada, levando ao aumento da ativação de ERK. Ainda, o aumento da concentração do inibidor de RAF para que o dímero todo seja inativado está relacionado à aquisição de resistência a droga, além do fato de que inibidores de RAF são mais eficientes em células com baixa atividade de RAS, uma vez que neste contexto as proteínas RAF existem primordialmente como monômeros **(Lito et al., 2013)**.

Os inibidores de MEK e ERK, por outro lado, não demonstram esta ativação paradoxal. Entretanto, são geralmente ineficientes individualmente porque aliviam a inibição por retroalimentação de reguladores *upstream*, causando, entre outras, ativação de PI3K **(Mirzoeva et al., 2009; Corcoran et al., 2012; Turke et al., 2012; Montero-Conde et al., 2013)**. Além disso, inibidores de MEK inibem a ativação de ERK também em tecidos normais, resultando em janelas terapêuticas limitadas, que dificultam a exploração destes inibidores na clínica.

Os inibidores da via da PI3K também não se saíram muito melhor na clínica por causa dos mesmos mecanismos que levam à ativação de sinais de *upstream* **(Stephen et al., 2014)**. É importante ressaltar que a falha relativa na inibição destes efetores não significa que eles não estejam envolvidos na oncogênese mediada por RAS. De fato, a deleção de c-RAF (mas não de b-RAF) em um modelo animal de adenocarcinoma pulmonar inibe o desenvolvimento e retarda a progressão tumoral mediada por RAS **(Blasco et al., 2011)**. Interessantemente, um estudo recente demonstrou que a deleção de c-RAF levou a regressão de tumores avançados induzidos

por $KRAS^{G12V}$/Trp53 sem efeitos tóxicos sistêmicos e sem afetar a ativação de MEK e ERK **(Sanclemente et al., 2018)**.

Uma terceira classe de efetores extremamente relevantes na oncogenicidade mediada por RAS depende da ativação da via RalGEFs **(Bodemann e White, 2008)**. Uma evidência crucial para esta observação é a de que camundongos deficientes em RALGDS (do inglês *RAL guanine nucleotide dissociation stimulator*) apresentam resistência na tumorigênese induzida por carcinogênicos **(Gonzalez-Garcia et al., 2005)**. Embora a ausência de mutações somáticas nos componentes desta via torne difícil a compreensão destes efetores para a transformação maligna, sabe-se que a ativação de RalGEFs é *upstream* de NF-κB e TBK1 (do inglês *TANK-binding kinase 1*), que já foram reportados como sendo contribuidores essenciais para a transformação maligna induzida por RAS **(Neel et al., 2011; Kashatus, 2013)**.

Por fim, uma outra abordagem envolve estudos de letalidade sintética, que se baseia na detecção de vias oncogênicas ou não-oncogênicas que são cruciais para a sobrevivência de células com mutação em *KRAS* **(Luo et al, 2009a; Luo et al., 2009b)**. Neste contexto, considera-se que dois ou mais genes são letais sintéticos se a mutação em um deles não muda a viabilidade da célula, enquanto que mutação simultânea nestes genes resulta em um fenótipo letal. Algumas interações letais sintéticas já foram identificadas para tumores induzidos por *KRAS* através do uso de bibliotecas de RNAs de interferência (RNAi) **(Luo et al., 2009b; Barbie et al., 2009; Kumar et al., 2012)**. Embora alguns resultados sejam promissores, muitos alvos identificados não são facilmente drogáveis.

1.3. A quinase IKKβ

A descoberta de que o fator de transcrição NF-κB (*nuclear factor-κB*) era ativado por um mecanismo dependente de fosforilação levou diversos grupos a buscarem pelas quinases

responsáveis por esta observação. Neste contexto, um complexo multiproteico de alto peso molecular (700 kDa) capaz de ativar NF-κB através da fosforilação de IκBα foi purificado a partir de células HeLa **(Chen et al., 1996)**. Mais tarde, identificou-se que este complexo multiproteico era, na verdade, composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ **(DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Regnier et al., 1997; Woronicz et al., 1997; Zandi et al., 1997)**, e uma subunidade regulatória, IKKγ **(Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998)**. Deste então, muito tem se investigado sobre a contribuição do complexo IKK em diversos processos celulares e seu papel em doenças humanas.

1.3.1. Estrutura, função e regulação

Os genes *CHUK* e *IKBKB* codificam para duas proteínas de 745 e 756 aminoácidos, respectivamente. A primeira é a quinase IKKα (*inhibitor of κB kinase* α, IKK1; ou CHUK, *conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*), que possui 85 kDa, e a segunda é a quinase IKKβ (*inhibitor of κB kinase* β; ou IKK2), de 87 kDa. Estas quinases compartilham cerca de 50% de homologia em sua sequência e contêm um domínio N-terminal de quinase, um domínio de dimerização e um domínio C-terminal de ligação a IKKγ (*inhibitor of κB kinase γ*, ou NEMO, *NF-κB essential modulator*), também chamado de domínio NBD (*NEMO-binding domain*) **(Liu et al., 2012; Israël, 2010; Scheidereit, 2006)**. Adicionalmente, IKKβ possui um domínio análogo a ubiquitina (ULD, do inglês *ubiquitin-like domain*), essencial para sua ativação catalítica **(May et al., 2004) (Figura 1.8).**

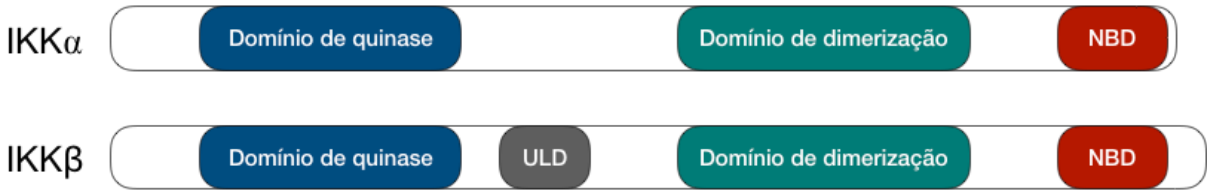


Figura 1.8. Os domínios das quinases IKK. As quinase IKKα (745 aminoácidos) e IKKβ (756 aminoácidos) compartilham cerca de 50% de homologia. Ambas possuem um domínio de quinase, um domínio de dimerização e um domínio de ligação a NEMO (NDB, do inglês NEMO-binding domain). Adicionalmente, IKKβ possui um domínio análogo a ubiquitina (ULD, do inglês ubiquitin-like domain).

Apenas recentemente, estudos de cristalização de proteínas providenciaram maior detalhes sobre a estrutura de IKKα e IKKβ **(Xu et al., 2011; Liu et al., 2013; Polley et al., 2013)**. O mecanismo completo pelo qual estas quinases são ativadas ainda está sob investigação. Porém, está claro que para se tornarem ativas precisam ser fosforiladas em dois resíduos de serina: Ser176 e 180 para IKKα, e Ser177 e 181 para IKKβ **(Mercurio et al., 1997; Ling et al., 1998; Delhase et al., 1999)**, responsáveis por induzirem uma mudança conformacional associada à ativação de suas atividades de quinase. Mutações sítio-dirigidas nos resíduos de serina para alanina inibem a ativação destas quinases, enquanto que mutações para glutamina (um fosfomimético) resultam em ativação constitutiva **(Israël et al., 2010)**.

O complexo IKK representa um ponto central na integração de sinal responsável pela ativação do NF-κB. Os fatores de transcrição da família do NF-κB são compostos por cinco membros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, P105/p50 e p100/p52. Cada uma destas proteínas contém um domínio amino-terminal de homologia REL (RHD, do inglês *REL homolody domain*), que permite localização nuclear, ligação ao DNA, homo e heterodimerização. As proteínas p65, RelB e c-Rel possuem também domínios de ativação da transcrição, enquanto que p50 e p52 não possuem. Os precursores p105 e p100 possuem repetições de anquirinas na região carboxi-terminal, que são clivadas proteolicamente para produzir as subunidades ativas p50 e p52, respectivamente **(Hayden e Ghosh, 2008)**.

Em condições celulares basais, os complexos NF-κB são geralmente mantidos numa forma inativa através da interação com a família de proteínas inibidoras de κB (IκB, do inglês *inhibitor of κB*). Os membros da família IκB incluem IκBα, IκBβ, IκBε, Bcl-3, p100 e p105, todos os quais possuem repetições análogas à anquirina que se ligam ao NF-κB e o inibem. De forma geral, esta inibição se baseia no sequestro do NF-κB no citoplasma, portanto impedindo que este se ligue ao DNA e leve a transcrição de seus genes-alvo **(Bassères e Baldwin, 2006)**.

Estudos de deleção genética de diferentes subunidades do complexo IKK revelaram que a ativação de NF-κB pode ocorrer através de dois mecanismos diferentes, denominados de via canônica e não-canônica **(Hinz e Scheidereit, 2014)**.

A ativação da via canônica ocorre através de diferentes estímulos, incluindo produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS), expressão viral, citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1, fatores de crescimento e sinais de estresse celulares, como danos ao DNA e espécies reativas de oxigênio **(Beg e Baltimore, 1996; Chow et al., 1999; Hayden e Ghosh, 2008; Hinz e Scheidereit, 2014)**. Desta forma, em resposta a um destes estímulos, ocorre a indução do complexo IKK, composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ, e uma subunidade regulatória, NEMO. O mecanismo molecular desta transdução de sinal ainda não está totalmente elucidado, onde se considera a existência de quinases que fosforilem as quinases do complexo IKK (IKKKs) e/ou trans-autofosforilação **(Hayden e Ghosh, 2012; Hinz e Scheidereit, 2014)**.

Em condições celulares normais, o dímero p65-p50 está no citoplasma em sua forma inativa, uma vez que está ligado a IκBα. Desta forma, a fosforilação de IκBα na Ser32 e 36 pelo complexo IKK leva à sua degradação através da via ubiquitina-proteossoma **(Brown et al., 1995; DiDonato et al., 1996)**. Uma vez que IκBα é degradado, p65-p50 se acumula no núcleo e regula a transcrição de seus genes-alvo, os quais se incluem fatores anti-apoptóticos, citocinas, como IL-6, e fatores de proliferação, como ciclina D1. Ainda, o NF-κB gera uma

retroalimentação negativa, uma vez que leva à transcrição do próprio IκBα, a proteína que o inibe **(Hayden e Ghosh, 2012)**.

A via não-canônica, por outro lado, é ativada principalmente através de sinais de desenvolvimento, como BAFF (*B-cell activating factor*), CD40 (*cluster of differentiation 40*) e LTβR (*lymphotoxin beta receptor*) **(Claudio et al., 2002; Dejardin et al., 2002)**. Estes sinais levam a ativação de NIK (*NF-κB-inducing kinase*) por meio das proteínas TRAF (*TNF receptor-associated factor)*, que ativa dímeros de IKKα para fosforilação de p100. Aqui, p100 age como um IκB, mantendo RelB no citoplasma. Após sua fosforilação, p100 é clivado em p52, o que resulta na formação do dímero RelB-p52 que, por sua vez, acumula-se no núcleo e leva a transcrição de seus genes-alvo **(Figura 1.9) (Coope et al., 2002)**.

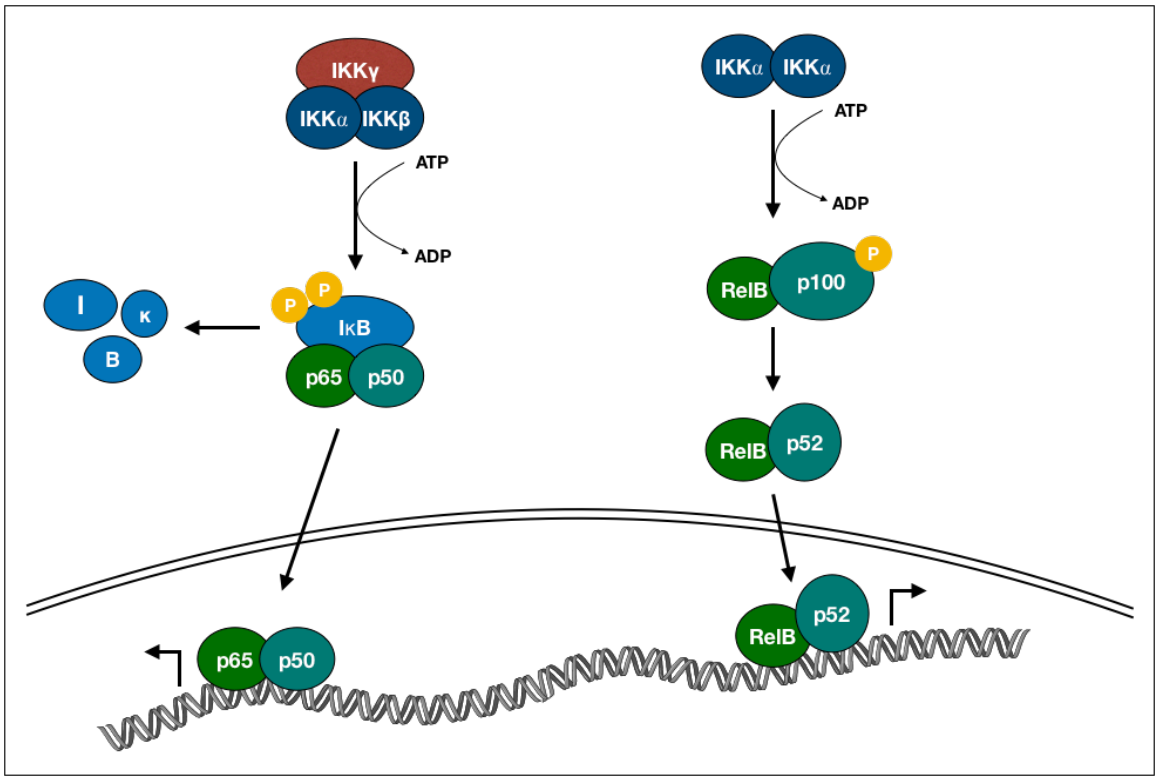


Figura 1.9. Via canônica e não-canônica de ativação do NF-κB. A via canônica (à esquerda) consiste na formação do complexo IKK (IKKα, IKKβ e IKKγ) através de um sinal *upstream*. A fosforilação de proteína IκB leva a sua degradação através da via ubiquitina-proteossoma, permitindo que o dímero p65-p50 acumule no núcleo e regula a transcrição de seus genes-alvo. A via não-canônica (à direita) consiste em um dímero IKKα capaz de fosforilar p100 e causar sua degradação parcial. Desta forma, o dímero RelB-p52 é capaz de entrar no núcleo e transcrever seus genes-alvo.

Interessantemente, tanto IKKα quanto IKKβ possuem uma variedade de substratos e outras funções celulares que independem da ativação do NF-κB **(Hinz e Scheidereit, 2014)**. Uma prova disto é um estudo que mostra que deleção de IKKβ em camundongos é embrionicamente letal, enquanto que deleção de p65 só causa morte dos camundongos na segunda semana, principalmente devido a apoptose no fígado induzida por TNF **(Li, Q et al., 1999a; Li, ZW et al., 1999)**. Além disso, camundongos deficientes em IKKα conseguem sobreviver por um mês após o nascimento, mas sofrem de defeitos morfológicos, como epiderme hiperplásica **(Li, Q et al., 1999b)**.

Finalmente, já foi mostrado que IKKβ pode fosforilar diferentes proteínas que estão relacionadas ao controle do ciclo celular, respostas ao dano no DNA, estabilidade do RNA mensageiro, metabolismo, apoptose, migração celular, entre outras **(Page et al., 2017)**.

1.3.2. IKKβ e câncer

Superativação das vias do NF-κB é um fenômeno encontrado em uma variedade de doenças humanas, tais como artrite, inflamação crônica, asma, doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas e câncer **(Baldwin, 2012; Courtois e Gilmore, 2006)**. A primeira associação do NF-κB com câncer veio da observação de que o gene *NFKB2* é encontrado mutado em certos tipos de linfomas. Adicionalmente, amplificação do gene *c-rel* é comum em linfoma de células B, enquanto que mutações ou deleções do gene que codifica para IκBα ocorre em alguns casos de linfoma de Hodgkin, levando à ativação constitutiva do NF-κB **(Courtois e Gilmore, 2006)**. Portanto, uma vez que IKKβ é necessária para a ativação canônica do NF-κB, esta quinase está envolvida em várias das contribuições do NF-κB para oncogênese. Ainda, por possuir uma gama de outros substratos, muito dos quais estão relacionados aos "*hallmarks* do câncer" **(Hanahan e Weinberg, 2011)**, IKKβ também contribui para a transformação maligna e para a

manutenção do fenótipo maligno por mecanismos independentes de NF-κB **(Hinz e Scheidereit, 2014)**.

Ao ser ativado pela quinase IKKβ, o NF-κB regula diversas propriedades oncogênicas pela transcrição de genes que codificam para proteínas envolvidas em proliferação e sobrevivência celular (ciclina D1, ciclina E, CDK2, c-Myc, Bcl-2, survivina), invasão e metástase (MMP2, MMP9), transição epitelial-mesenquimal (vimentina, MMP2, MMP13), inflamação (TNF, IL-1, IL-8) e angiogênese (IL-1, IL-6, IL-8, VEGF) **(Bassères e Baldwin, 2006)**.

A IKKβ também participa de propriedades oncogênicas através da fosforilação da proteína supressora de tumor p53 na Ser362 e 366, que leva à sua ubiquitinação e consequente degradação **(Xia et al., 2009)**, sugerindo que a inibição de IKKβ em tumores pode trazer maior regulação do ciclo celular através da conservação da estabilidade de p53. Um outro substrato de IKKβ é a proteína quinase envolvida na resposta a danos no DNA, ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), que é fosforilada por IKKβ no núcleo para atuar no reparo de DNA **(Sakamoto et al., 2013)**. Adicionalmente, FOXO3a, um fator de transcrição que regula progressão do ciclo celular e apoptose, encontra-se retido no citoplasma de células tumorais, sem transcrever seus genes-alvo, o que contribui para o fenótipo maligno. Neste contexto, um estudo demonstrou que IKKβ inativa e induz degradação de FOXO3a, portanto contribuindo para tumorigênese **(Hu et al., 2004)**.

Interessantemente, um estudo mostrou que a deleção de IKKβ em células epiteliais do intestino de um modelo animal de câncer de cólon diminui drasticamente a incidência de tumores **(Greten et al., 2004)**. Ainda, a ausência de IKKβ em células mieloides gera uma alteração no microambiente tumoral que diminui a expressão de citocinas inflamatórias que servem como fatores de crescimento tumorais **(Greten et al., 2004)**. Outro estudo evidenciou que os níveis de fosforilação de IKKβ acompanha o aumento da expressão de marcadores de

proliferação (Ki67 e survivina) quando tecidos normais são comparados com tumores de pacientes com câncer de próstata, sugerindo que aumento da atividade de IKKβ está relacionada a estágios clínicos mais avançados destes tumores **(Zhang et al., 2016)**. A deleção de IKKβ em um modelo animal de câncer de pulmão reduz significativamente o crescimento e a progressão tumoral **(Xia et al., 2012)**, além de inibir a tumorigênese pancreática, uma vez que 70% destes tumores possuem ativação constitutiva da via IKK/NF-κB **(Fujioka et al., 2003; Wang et al., 1999)**. Curiosamente, IKKβ também já foi envolvida atuando como supressor tumoral, uma vez que deleção de IKKβ em carcinoma hepatocelular quimicamente induzido acelera o crescimento tumoral através do aumento da atividade de STAT3 **(He et al., 2010)**. Por fim, também foi demonstrado que inibição farmacológica de IKKβ induz apoptose em células leucêmicas sem afetar a atividade de NF-κB em células hematopoiéticas normais **(Frelin et al., 2005)**, bem como inibe o crescimento de células de mieloma *in vitro* e *in vivo* **(Hideshima et al., 2006)**.

1.3.3. IKKβ e KRAS

Ultimamente, vários estudos vêm demonstrando que a via IKK/NF-κB é extremamente relevante em tumores induzidos por KRAS. Primeiramente, HRAS ativa o NF-κB para induzir transformação celular em fibroblastos **(Finco et al., 1997; Mayo et al., 1997)**, bem como o aumento da atividade de NF-κB já foi relacionado ao aumento da expressão de KRAS oncogênica **(Tang et al., 2006; Kim et al., 2002)**. Importantemente, foi demonstrado que KRAS oncogênica ativa o NF-κB através da quinase IKKβ para promover a tumorigênese pulmonar **(Bassères et al., 2010)** e que inibição genética de IKKβ inibe a tumorigênese mediada por RAS **(Yang et al., 2010; Ling et al., 2012; Xia et al., 2012)**.

Embora não muito se conheça sobre o mecanismo molecular pelo qual KRAS ativa a quinase IKKβ, um estudo mostrou que esta via depende da ativação da proteína adaptadora p62 e a consequente poliubiquitinação de TRAF6 **(Duran et al., 2008)**. Adicionalmente, um outro estudo demonstrou que KRAS oncogênica regula positivamente a glicogênio sintase quinase 3α (GSK-3α, do inglês *glycogen synthase kinase 3α*), promovendo sua interação com TAK1 para estabilizar o complexo TAK1-TAB e promover a atividade do complexo IKK **(Bang et al., 2013)**. Também já foi evidenciado que a via RALGEFs *downstream* de RAS pode ativar o NF-κB independente do complexo IKK, onde o efetor RalB induz a ativação de TBK1 (*TANK-binding kinase*), uma proteína quinase análoga às IKKs **(Chien et al., 2006; Henry et al., 2000; Harris et al., 2006)**. Desta forma, fica claro que KRAS pode contribuir para a ativação de IKKβ por diferentes mecanismos.

Por fim, um estudo recente mostrou que o tratamento de um modelo animal de câncer de pulmão induzido por KRAS com um inibidor altamente específico para quinase IKKβ (Composto A, **Ziegelbauer et al., 2005**) diminui o crescimento tumoral, reduz proliferação celular e também previne a progressão tumoral para graus histológicos mais avançados **(Bassères et al., 2014)**.

1.4. As células iniciadoras de tumor

Diferentes mecanismos contribuem para a heterogeneidade intratumoral, incluindo mutações genéticas, alterações epigenéticas e a existência de subpopulações celulares fenotipicamente distintas. Exatamente por isso, o tratamento do câncer representa um grande desafio: eliminar todas as células malignas, independente de quais são os mecanismos moleculares que sustentam a sua proliferação celular descontrolada. A heterogeneidade tumoral é o principal motivo pelo qual até mesmo as terapias-alvo falham em testes clínicos e células

neoplásicas rapidamente se adaptam e adquirem resistência às drogas **(Hanahan e Weinberg, 2011)**.

Atualmente, dois modelos foram propostos para tentar explicar a tumorigênese, heterogeneidade intratumoral, metástase, resistência às drogas, progressão tumoral e recidiva: o modelo estocástico, baseado na evolução clonal, e o modelo hierárquico, baseado na existência das células iniciadoras de tumor. A principal diferença entre estes dois modelos é que o primeiro sugere que mutações genéticas e/ou alterações epigenéticas resultam em uma população clonal dominante de células que possuem potencial tumorigênico similar **(Nowell, 1976)**, enquanto que o último prediz que apenas uma pequena parcela de células tumorais autorrenováveis são tumorigênicas e capazes de sustentar o crescimento tumoral. Embora o modelo hierárquico tenha atraído bastante atenção devido a importantes implicações na clínica e para terapia, estes dois modelos não são mutualmente exclusivos **(Kreso e Dick, 2014)** e podem ser harmonizados para melhor explicar as propriedades oncogênicas.

O modelo das células iniciadoras de tumor propõe uma organização celular hierárquica para os tumores, na qual células tumorigênicas (CITs) "se diferenciam" em células não-tumorigênicas (não-CITs) **(Figura 1.10) (Li et al., 2007; Visvader e Lindeman, 2012)**. Desta forma, CITs são definidas como células tumorais capazes de se autorrenovar, iniciar a formação de tumores e sustentar o crescimento tumoral. Estas células são também resistentes às terapias convencionais, como quimio- e radioterapia, e responsáveis pela disseminação metastática e recidiva tumoral **(Li et al., 2007; Visvader e Lindeman, 2012)**. Portanto, as diferenças funcionais entre células com e sem potencial tumorigênico têm implicações extremamente importantes na clínica.

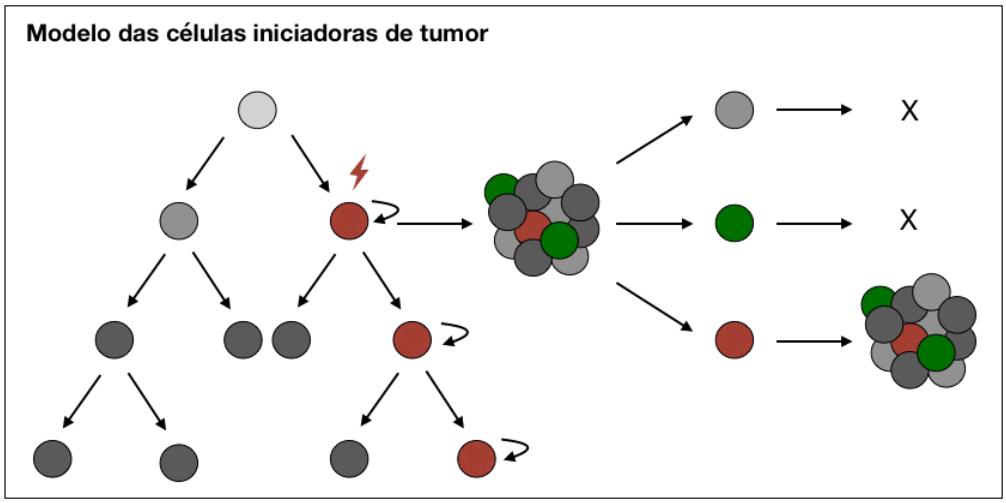


Figura 1.10. O modelo das células iniciadoras de tumor. O modelo das células iniciadoras de tumor (ou células-tronco tumorais) considera uma organização celular hierárquica, onde apenas uma subpopulação de células (em vermelho) têm a habilidade de sustentar a tumorigênese e promover a heterogeneidade tumoral através da diferenciação. Estas células são capazes de se autorrenovar e dar origem a células não-tumorigênicas (em verde e em cinza).

Esta observação de que existem células tumorais com diferentes potenciais tumorigênicos foi primeiramente descrita em leucemia mieloide aguda, onde células de pacientes foram transplantadas em camundongos imunodeficientes. Foi observado que uma população de células $CD34^+$ $CD38^-$ causava a doença muito mais frequentemente e em concentrações mais baixas do que células $CD34^-$ **(Bonnet e Dick, 1997)**. De fato, avaliar o potencial tumorigênico de diferentes populações celulares em camundongos imunodeficientes tem sido uma estratégia bastante utilizada para a identificação de CITs em diversos tumores, incluindo de mama **(Al-Hajj et al., 2003)**, próstata **(Collins et al., 2005)**, glioblastoma **(Singh et al., 2004)**, pulmão **(Kim et al., 2005)**, fígado **(Suetsugu et al., 2006)**, pâncreas **(Li et al., 2007)**, entre outros **(Ailles e Weissman, 2007)**. É importante destacar que nem todos os tumores seguem o modelo hierárquico. Curiosamente, em melanoma humano, quase todas as células possuem capacidade inata de iniciar a formação de tumores **(Quintana et al., 2008)**.

Frequentemente, CITs podem ser isoladas através do uso combinado ou individual de marcadores, seja por *beads* magnéticas ou por separação de células ativadas por fluorescência

(FACS, do inglês *fluorescence-activated cell sorting*). Neste contexto, muitos marcadores têm sido propostos para distinguir entre CITs e as outras células tumorais. Embora nenhum marcador individual seja perfeito, CD133, CD44, CD24, EpCAM e atividade de ALDH estão entre os mais utilizados **(Visvader et al., 2012)**. Uma vez isoladas, as células purificadas podem ser comparadas através de diversos ensaios funcionais e fenotípicos distintos, tais como proliferação celular, sobrevivência e expressão gênica **(Singh et al., 2004; Al-Hajj et al., 2003; Collins et al., 2005; Li et al., 2007; Dalerba et al., 2007)**.

A capacidade das CITs de se autorrenovarem envolve os mesmos mecanismos moleculares utilizados por células-tronco e, portanto, estão relacionadas à manutenção de um fenótipo tronco-tumoral em diversos tumores. Por este motivo, células iniciadoras de tumor são frequentemente chamadas de células-tronco tumorais ou células-tronco cancerígenas (CSC, do inglês *cancer stem cells*). Embora a origem das CITs não seja muito conhecida, sabe-se que o seu aparecimento não depende de alterações genéticas e/ou epigenéticas apenas em células-tronco, mas também em células progenitoras ou diferenciadas, dependendo do tipo de tumor. Portanto, para evitar concepções precipitadas, nós preferimos o uso da terminologia "células iniciadoras de tumor". Apesar de não existir um consenso, alguns grupos apontam que o termo "célula-tronco tumoral" traz um contexto conceitual, já que se refere a células capazes de propagarem clones malignos indefinidamente, enquanto que "célula iniciadora de tumor" representa um termo operacional, uma vez que podem ser detectáveis, purificadas e avaliadas conforme sua capacidade de gerar tumores em camundongos imunodeficientes **(Valent et al., 2012)**.

Alguns estudos vêm demonstrando que as diferenças funcionais e fenotípicas encontradas entre CITs e não-CITs (células não-iniciadoras de tumor, ou seja, as células que não são CITs) são essencialmente atribuídas a modificações epigenéticas **(Dawson e Kouzarides, 2012; Reya et al., 2001; Wainwright e Scaffidi, 2017; Shibue e Weinberg, 2017)**. Em carcinomas, esta

diferença pode estar fortemente relacionada ao processo denominado transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-to-mesenchymal transition*) **(Polyak e Weinberg, 2009; Medema, 2013)**. Uma vez que este processo é ativado por modificações epigenéticas, células de carcinoma perdem muitas de suas características epiteliais e, por sua vez, adquirem propriedades mesenquimais, incluindo um fenótipo mais alongado, morfologia análoga à de fibroblastos e capacidade aumentada de migração e invasão **(Yilmaz e Christofori, 2009)**.

Além disso, diversos trabalhos mostram que CITs são resistentes a quimioterápicos, como doxorrubicina e cisplatina, por várias razões, as quais se incluem sua natureza mais quiescente e de proliferação lenta **(Gottesman, 2002)**, maior expressão de bombas de efluxo dependentes de ATP **(Zhou et al., 2001)**, maiores níveis de moléculas anti-apoptóticas **(Reya et al., 2001)**, além serem mais resistentes ao estresse oxidativo e a agentes genotóxicos, uma vez que possuem um sistema de reparo de DNA mais eficiente **(Ito et al., 2004; Bao et al., 2006; Diehn et al., 2009)**.

Assim como células-tronco dependem de interações com o microambiente e dos componentes da matriz extracelular para manter sua identidade e capacidade de autorrenovação **(Moore e Leimischka, 2006)**, estudos demonstram que CITs dependem criticamente do microambiente tumoral para manter suas propriedades de *stemness* para sustentar o crescimento tumoral e se disseminar para outros sítios. Ainda, estudos recentes vêm mostrando que CITs podem estar envolvidas no processo de colonização metastática através da tentativa de recriar um ambiente similar ao do tumor primário **(Malanchi et al. 2012)**, e no fenômeno da "dormência tumoral", que é o reaparecimento do câncer após vários anos de remissão clínica, cujos mecanismos moleculares ainda são pouco compreendidos **(Kleffel e Schatton, 2013; Gay e Malanchi, 2017)**.

Por fim, o desenvolvimento de terapias direcionadas às CITs tem sido alvo de intenso estudo, uma vez que estas são consideradas as raízes do tumor. Ainda, estas terapias podem não

somente levar à eliminação tumoral, como também à redução de metástases e recidivas. Neste contexto, as estratégias mais comuns para a eliminação de CITs envolvem a identificação e inibição de vias e moléculas essenciais para a sua sobrevivência, a inibição dos mecanismos moleculares responsáveis pelo seu fenótipo tronco e capacidade de autorrenovação e o uso de drogas que prejudiquem a comunicação entre CITs e os componentes e células do microambiente tumoral. Entretanto, a barreira que estas abordagens enfrentam é a plasticidade do fenótipo tronco-tumoral, ou seja, a capacidade de CITs e não-CITs de alterarem seu fenótipo. Por este motivo, acredita-se que terapias anti-CITs devem ser utilizadas em conjunto com as terapias convencionais **(Figura 1.11)** e que CITs não devem ser tratadas como uma "entidade", mas sim como um "estado" (como discutido em **Valle et al., 2018**), uma vez que está claro que o microambiente tumoral desempenha um papel importante na reprogramação epigenética de células malignas que lhe conferem propriedades de CITs **(Visvader et al., 2012; Zhou et al., 2009)**.

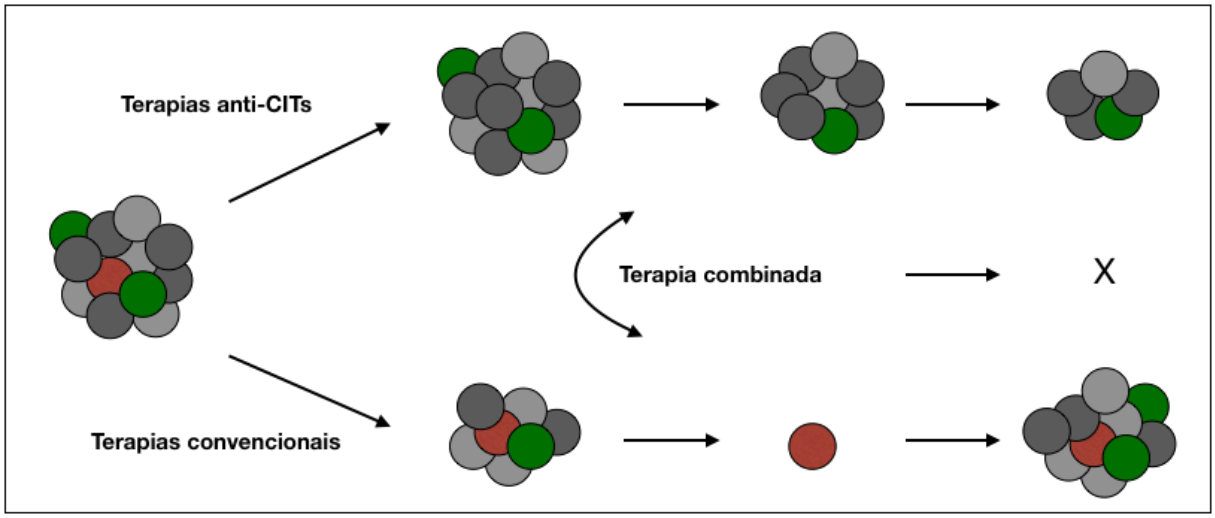


Figura 1.11. Terapias convencionais e terapias direcionadas às células iniciadoras de tumor. As terapias convencionais têm como alvo células com rápida taxa de proliferação. CITs, entretanto, são células resistentes aos tratamentos convencionais, o que geralmente resulta na eliminação incompleta das células malignas. Desta forma, as CITs sobrevivem e são responsáveis pela recidiva tumoral. As terapias anti-CITs, por outro lado, têm como objetivo identificar os mecanismos moleculares vitais para a sobrevivência destas células a fim de eliminá-las. Acredita-se que a eliminação das CITs resulta na regressão da massa tumoral e, consequentemente, eliminação completa do tumor, uma vez que apenas CITs são capazes de se autorrenovar e sustentar o crescimento tumoral. Entretanto, a combinação das suas terapias por apresentar maior eficácia terapêutica e erradicação mais rápida do tumor.

1.4.1. O papel de KRAS na biologia das células iniciadoras de tumor

Como já mencionado anteriormente, KRAS está envolvida em diversas propriedades oncogênicas e recentemente tem sido implicada em mais uma: a aquisição e manutenção do fenótipo tronco-tumoral. Primeiramente, um estudo demonstrou que a indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células epiteliais mamárias humanas resulta na aquisição de características mesenquimais e na expressão de genes de células-tronco **(Mani et al., 2008)**. Este mesmo estudo observou que estas células apresentam maior capacidade de formação de esferas em cultura antiaderente e formam tumores de forma mais eficiente **(Mani et al., 2008)**. Adicionalmente, um outro estudo mostrou por experimentos de ganho e perda de função que KRAS é necessária para aquisição de um fenótipo mesenquimal e metastático **(Kim et al., 2015)**. Desta forma, se EMT é um processo que culmina na aquisição de propriedades "tronco" (que também será referido adiante como "*stemness*") e KRAS é um regulador da EMT, é altamente provável que KRAS esteja envolvida na manutenção do fenótipo tronco-tumoral. De fato, em queratinócitos a via utilizada por RAS para a promoção de características tronco-tumorais envolve a ativação do fator de transcrição NF-κB através do silenciamento do microRNA let-7c **(Jiang et al., 2014)**. Além disso, em câncer de mama, um estudo isolou células com o fenótipo tronco através do marcador Sca-1 e demonstrou que células positivas para Sca-1 possuem maiores níveis de RAS-GTP do que células negativas para Sca-1, sugerindo que estas características de *stemness* dependem de vias ativadas por RAS. **(Kim et al., 2010)**. Este mesmo trabalho mostrou que a inibição das vias ativadas por RAS diminui a expressão dos fatores de transcrição SOX2, OCT4 e NANOG, bem como reduz a formação de esferas **(Kim et al., 2010)**. Recentemente, mostrou-se que KRAS oncogênica participa na manutenção do fenótipo tronco-tumoral em câncer de pulmão através da PKCι, que fosforila o fator de transcrição ELF3 para regular positivamente a expressão de NOTCH3 **(Ali et al., 2016)**. Apesar disto, o papel de KRAS na promoção e regulação do fenótipo tronco-tumoral em

câncer de pulmão permanece pouco explorado e mais estudos são necessários para que consigamos compreender melhor a contribuição desta proteína nestas propriedades oncogênicas.

1.4.2. O papel de IKKβ na biologia das células iniciadoras de tumor

Como mencionado anteriormente, ativação do NF-κB está associada a diversas propriedades oncogênicas, incluindo a aquisição e manutenção de um fenótipo tronco-tumoral. Um dos primeiros estudos a evidenciar esta observação mostrou que células iniciadoras de leucemia purificadas ($CD34^+/CD38^-/CD123^+$) apresentam superativação de NF-κB **(Guzman et al., 2001)**. Outro estudo demonstrou que células de glioblastoma oriundas da cultura de tumoresferas, uma técnica *in vitro* que leva ao enriquecimento de CITs, apresentam maior localização nuclear da subunidade p65 do NF-κB do que células cultivadas na cultura aderente (ou de monocamada) **(Garnet et al., 2013)**. Observações similares foram obtidas por outros estudos para diversos tipos de tumores, como mama **(Liu et al., 2007)**, próstata **(Birnie et al., 2008)** e ovário **(Leizer et al., 2010)**, e sugerem que NF-κB está mais ativo em CITs.

O envolvimento do NF-κB na manutenção do fenótipo-tronco tumoral é consequência dos seus alvos transcricionais, que incluem citocinas (MCP1, IL-1, IL-3, IL-6 e IL-8), fatores de células-tronco (Nanog, Sox2, CD44, Klf4), fatores de transição epitelial-mesenquimal (Snail, Slug, Twist1, ZEB2) e microRNAs (Lin28 e Let7) **(Rinkenbaugh e Baldwin, 2016)**. Neste contexto, o envolvimento de IKKβ na biologia das CITs se dá pelos alvos da via canônica do NF-κB e através de mecanismos independentes de NF-κB, como a fosforilação de p53 por IKKβ, já mencionada anteriormente.

De fato, aumento da fosforilação de IKKβ está relacionado a expressão de Snail, Slug, Nanog, Oct4 e Sox2 quando tecidos normais são comparados com tumores de pacientes com

câncer de próstata **(Zhang et al., 2016)**. Interessantemente, em células malignas de próstata, IKKβ (mas não NF-κB) regula a expressão de Nanog, que por sua vez modula os níveis de Oct4, Sox2, Snail e Slug, sugerindo um papel fundamental de IKKβ no fenótipo tronco e na regulação da transição epitelial-mesenquimal **(Zhang et al., 2016)**. Por fim, IKKβ também já foi envolvida na capacidade de autorrenovação de CITs de mama *in vitro* **(Kendellen et al., 2013)** e na manutenção do fenótipo tronco-tumoral em glioblastoma **(Rinkenbaugh et al., 2016)**. Entretanto, seu papel em CITs pulmonares e principalmente em CITs induzidas por KRAS permanece inexplorado.

2. HIPÓTESE

A fim de identificar potenciais alvos terapêuticos que contribuam para o fenótipo tronco-tumoral induzido pelo oncogene KRAS no pulmão, a hipótese deste trabalho é de que (1) a quinase IKKβ promove o fenótipo tronco-tumoral e, consequentemente, a capacidade metastática tumoral; e (2) a inibição de IKKβ reduzirá a quantidade de CITs em linhagens pulmonares que expressam KRAS mutada.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da quinase IKKβ na biologia das células iniciadoras de tumor (CITs) pulmonares em linhagens portadoras da forma oncogênica de KRAS visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento do câncer de pulmão.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar, em linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano portadoras de mutação em *KRAS*, como a inibição da IKKβ afeta a expressão de marcadores específicos de CITs;

2. Avaliar, em linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano portadoras de mutação em *KRAS*, como a inibição da IKKβ afeta a formação de tumoresferas;

3. Determinar o papel da quinase IKKβ para o fenótipo tronco-tumoral das CITs pulmonares através de células derivadas da cultura de tumoresferas portadoras de mutação em *KRAS*.

4. MATERIAIS E PROCEDIMENTOS

4.1. Linhagens celulares e condições de cultura aderente

As linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano portadoras de mutação oncogênica em KRAS A549 (ATCC CCL-185; $KRAS^{G12S}$ em homozigose) e H358 (ATCC CRL-5807; $KRAS^{G12C}$ em heterozigose) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino, Cultilab cat# F063), sem antibióticos, em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O_2 e 5% de CO_2 a 37 °C. A subcultura foi feita utilizando-se solução de tripsina 0,1% (m/v) diluída em PBS (do inglês *Phosphate buffer saline* – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM $NaHPO_4$; 1,5 mM KH_2PO_4; pH = 7,6) contendo 0,53 mM de EDTA, e as passagens celulares foram devidamente registradas. Os estoques celulares foram criopreservados no meio de cultivo contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) a -190ºC, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

4.2. Inibidores farmacológicos

Diferentes inibidores far macológicos foram utilizados ao longo deste trabalho e estão descritos nas seções específicas dos métodos. As concentrações utilizadas variam com os experimentos e estão sempre indicadas nas legendas das figuras. A Tabela 4.1 indica o nome dos inibidores utilizados e seus respectivos alvos.

Tabela 4.1. Inibidores farmacológicos utilizados e seus respectivos alvos.

Inibidor Farmacológico	Alvo
Composto A	Quinase IKKβ
Neratinib	EGFR e ERBB2
Trametinib	ERK
NVP-BEZ235	Akt e mTOR

4.3. Ensaio de formação de tumoresferas

As linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano A549 e H358 foram cultivadas em placas de baixa aderência de 6 ou 24 poços (Corning® Costar® cat# 3471 ou Corning® Costar® cat# 3473, respectivamente) em baixa densidade celular (1000 ou 5000 células/poço) com 2 mL de meio (para placa de 6 poços) ou 1 mL de meio (para placa de 24 poços) DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12*) (Gibco™ cat# 11330032) suplementado com N-2 (Gibco™ cat# 17502048), 20 ng/mL de FGF (fator de crescimento de fibroblasto, Gibco™ cat# PHG0266) e 20 ng/mL de EGF (fator de crescimento epitelial, Gibco™ cat# PHG0311L) por 14 dias em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O_2 e 5% de CO_2 37 °C. A cada três dias as esferas foram suplementadas com 500 µL (para placa de 6 poços) ou 200 µL (para placa de 24 poços) do meio de cultura descrito acima. O número de tumoresferas formadas foi registrado e as tumoresferas foram fotografadas.

Para a geração de esferas secundárias, as tumoresferas primárias foram dissociadas na presença de Accutase (Gibco™ StemPro™ Accutase™ cat# A1110501). As células individuais foram contadas e 1000 células foram plaqueadas por poço em placas de cultura de 6 poços de baixa aderência em meio DMEM/F12 suplementado com N-2, FGF e EGF. O processo foi repetido para as esferas terciárias.

Para avaliar o efeito da inibição da quinase IKKβ foi utilizado Composto A **(Ziegelbauer et al., 2005)** no momento do plaqueamento das esferas primárias, não sendo reutilizado em nenhum outro momento, nem mesmo na formação de tumoresferas secundárias e terciárias. Da mesma forma, para avaliar o efeito da inibição dual de EGFR e ERBB2 foi utilizado Neratinib **(Subramaniam et al., 2015)** no momento do plaqueamento.

Alternativamente, as culturas de tumoresferas foram realizadas com células A549 e H358 com inibição genética de IKKβ ou KRAS por interferência de RNA, conforme descrito no item 4.6.

4.4. Ensaio de formação de tumoresferas *single-cell*

As tumoresferas oriundas das linhagens celulares A549 e H358 foram dissociadas com Accutase após aproximadamente 12 dias em cultura e plaqueadas na densidade de 1 célula/poço em uma placa de baixa aderência de 96 poços (Corning® Costar® cat# 3474) com 100 µL de meio de cultura DMEM/F12 suplementado com N-2, EGF e FGF por 14 dias. A cada três dias as esferas foram suplementadas com 30 µL de meio de cultura descrito acima. Os poços contendo apenas uma célula foram fotografados nos dias 0, 5, 15 para avaliar a formação de tumoresfera a partir de uma única célula.

4.5. Ensaio de formação de colônias

As linhagens celulares A549 e H358 (parentais ou oriundas da cultura de tumoresferas, tratadas ou não com Composto A e/ou Neratinib) foram cultivadas em placas de 60mm (500 células para A549 e 5000 células para H358) e incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de FBS por 10-15 dias. O meio de cultura foi trocado uma ou duas vezes durante este período. Após a formação de colônias visíveis a olho nu, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas em metanol à temperatura ambiente por 10 minutos, coradas com solução de 0,1% cristal violeta em 20% de etanol e lavadas com PBS. O número e a área das colônias foram quantificados com o auxílio do programa *ImageJ* (NCBI).

4.6. Silenciamento da expressão gênica mediado por transfecção com siRNA

A inibição transiente da expressão de KRAS ou IKKβ nas linhagens celulares A549 e H358 foi realizada utilizando-se um *pool* (Dharmacon siGenome Smart Pool siRNA Design®) contendo 5 pequenos RNAs de interferência (siRNAs) para a KRAS humana (siKRAS,

Dharmacon cat# M-005069-00) ou para a IKKβ humana (siIKKβ, Dharmacon, cat #M-003545-10). Como controle negativo, as células foram transfectatadas com siRNA controle *non-targeting* #3 (siCtrl, Dharmacon, cat# D-001210-03-20), que não possui similaridade com genes humanos conhecidos. Para tanto, as células A549 e H358 foram plaqueadas ($1x10^5$ células/poço) em placas de 6 poços em meio RMPI-1640 suplementado com 10% FBS. Após 24h, foi preparada a mistura de siRNA (tubo 1) e o reagente de transfecção (tubo 2). No tubo 1, 5 µL do siRNA de interesse na concentração estoque de 20 µM foi diluído em 45 µL de tampão siRNA buffer 1x (Dharmacon, cat# B-002000-UB-100), em seguida, 150 µL de meio RPMI sem soro feral bovino foi adicionado. No tubo 2, 4 µL do reagente de transfecção DharmaFECT® (Dharmacon, cat# T-2001-02) foi diluído em 196 µL de meio RPMI sem soro feral bovino e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, o conteúdo do tubo 2 foi adicionado ao tubo 1 e mantido à temperatura ambiente por 20 minutos. Nesse intervalo, o meio foi retirado da placa, as células lavadas com PBS, e foram adicionados 1,6 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro feral bovino em cada poço. Por fim, 400 µL do mix de siRNA + DharmaFECT foi adicionado a cada poço contendo as células e as mesmas foram incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2. As células foram plaqueadas para cultura de tumoresferas cerca de 48h após a transfecção. Para avaliar a eficiência de inibição da expressão dos genes de interesse, o RNA foi extraído 72h após a transfecção.

4.7. Extração e quantificação de RNA

Para extração de RNA, as linhagens celulares A549 e H358 (oriundas da cultura aderente ou da cultura de tumoresferas) foram tripsinizadas ou dissociadas e, em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 7 minutos em tubos de 15 ou 50 mL. O meio de cultura foi, então, descartado e o *pellet* de células ressuspenso em 250 µL do reagente TRIzol™ (Invitrogen®, cat# 15596026). Após a homogeneização, a solução foi transferida para tubos de

1,5 mL (podendo ser armazenadas a -80 ºC). Após isto, foram adicionados 100 µL de clorofórmio em cada tubo, agitando-os vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase incolor, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 250 µL de isopropanol e agitados vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram mantidos a 4 °C *overnight* e em seguida foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 100 µL de etanol 100%. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O tubo contendo somente o precipitado de RNA foi mantido em temperatura ambiente por 5 minutos.

O RNA foi diluído em água autoclavada (Millipore, MilliQ System) e mantido em banho seco a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, mantendo os tubos com o RNA diluído em gelo, a concentração do RNA foi determinada por meio de sua absorbância a 260 nm no espectofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.8. Síntese de cDNA

Para síntese do cDNA, 1 µg de RNA total tratado com DNase 1 (Invitrogen™, cat#18047019) foi submetido à transcrição reversa com SuperScript™ III (Invitrogen™ cat# 18080093). Para 1 µg de RNA tratado com DNAse 1, foram adicionados 1 µL de iniciadores randômicos (Invitrogen™, cat# N8080127, *random hexamers* 50 ng/µL) e 1 µL de tampão de anelamento (*Annealing Buffer*), completando com água para um volume final de 8 µL. Os tubos foram incubados no termociclador Mastercycler gradient AG22331 (Eppendorf®) a 65°C por 5 minutos e depois colocados em gelo imediatamente. Em seguida, foram adicionados aos tubos, ainda no gelo, 10 µL de mistura de reação de primeira fita 2x (*2x First-Strand Reaction Mix*) e 2 µL de *SuperScript™ III*. As amostras foram agitadas delicadamente e incubadas a 25°C por

10 minutos, em seguida a 50°C por 50 minutos e, finalmente, a 85°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso.

4.9. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), com primers específicos para os transcritos de interesse (Tabela 4.2) desenhados com auxílio do programa Primer Express 2.0® (Applied Biosystems®), sendo a detecção realizada por fluorescência de Sybr Green e em triplicata técnica e experimental.

Para a reação de PCR em tempo real foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços 3 µL do cDNA, 3 µL do mix de primers (*forward* e *reverse* para os genes de interesse) para concentração final de 200 nM e 6 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, cat# 4309155), de forma que os mesmos respeitem pré-requisitos otimizados para qPCR conforme aconselhado pelo fabricante e previamente padronizado no laboratório. A quantificação relativa dos genes-alvo nas amostras foi determinada pelo método ΔΔCt utilizando como controle endógeno o gene humano de expressão constitutiva da β-actina.

Tabela 4.2 – Sequências dos pares de primers *forward* (Fw) e *reverse* (Rv) utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Gene alvo	Primers
ACTB (β-actina)	Seq_{Fw}: 5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3' Seq_{Rv}: 5'-CCGATCCACACGGGAGTACTTG-3'
BMI1	Seq_{Fw}: 5'-CCCACCTGATGTGTGTGCT-3' Seq_{Rv}: 5'-GGTCTCCAGGTAACGAACAATACA-3'
CD24	Seq_{Fw}: 5'-GACATGGGCAGAGCAATGGTGGC-3' Seq_{Rv}: 5'-GAGTGAGACCACGAAGAGACTGGC-3'
CXCR4	Seq_{Fw}: 5'-GGCCGACCTCCTCCTTTGT-3' Seq_{Rv}: 5'-TTGCCACGGGCATCAACTG-3'
SOX2	Seq_{Fw}: 5'-CCCGGCGGAAAACCAA-3' Seq_{Rv}: 5'-GCCGGGCAGCGTGTACT-3'
OCT4	Seq_{Fw}: 5'-TCGAGCAATTTGCCAAGCT-3' Seq_{Rv}: 5'-GCCTCAAAGCGGCAGATG-3'
NANOG	Seq_{Fw}: 5'-CCTCAGCCTCCAGCAGATG-3' Seq_{Rv}: 5'-CAGTTGTTTTCTGCCACCTCTT-3'
ABCG2	Seq_{Fw}: 5'-ACTTTGGGCTAAAAAATGATTCTACTG-3' Seq_{Rv}: 5'-CACTGGTTGGTGGTCAGGAA-3'
ALDH	Seq_{Fw}: 5'-GACAAAGTAGCCTTCACA-3' Seq_{Rv}: 5'-TCCCGGCAGCTTCTTTGA-3'
KRAS	Seq_{Fw}: 5'-CCCAGGTGCGGGAGAGA-3' Seq_{Rv}: 5'-CAGCTCCAACTACCACAAGTTT-3'
IKBKB (IKKβ)	Seq_{Fw}: 5'-GCCCTTCCTCCCCAACTG-3' Seq_{Rv}: 5'-TCTTCTGCCGCACTTTTGAA-3'

4.10. Western Blot

$5x10^5$ células A549 ou H358 foram plaqueadas em placas de 60mm em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% SFB. No dia seguinte, as células foram tratadas com DMSO (controle), Composto A, Neratinib, NVP-BEZ235 ou Trametinib por 30 minutos, lavadas com PBS, lisadas com 200 μL de tampão RIPA (1% IGEPAL, 1% SDS, 50 mM Tris pH = 7,5, 150 mM NaCl e 0,5% desoxicolato de sódio) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (1/100) e transferidas para tubos de 1,5 mL. As soluções foram sonicadas por 10 segundos e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford **(Bradford, 1976)**. 50 μg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra 5x, incubadas por 10 min a 90–100 ºC e submetidas a fracionamento vertical em gel de poliacrilamida-SDS 10% (SDS-

PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então corada com Ponceau para confirmar a transferência. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em solução contendo 5% de leite desnatado em TBS (50 nM Tris-Cl, 150 nM NaCl, pH = 7,6) contendo 0,1% Tween (TBST). Anticorpos primários foram utilizados de acordo com a tabela abaixo (Tabela 4.3). Os anticorpos primários foram diluídos em solução 2,5% BSA em TBST contendo 0,05% de azida sódica e os anticorpos secundários foram diluídos a 1/7000 em solução 5% leite desnatado em TBST (Tabela 4.4). A membrana foi incubada com o anticorpo primário *overnight*, lavada por 10 min com TBST por três vezes, incubada com o anticorpo secundário por 1 hora, lavada com TBST e revelada por reação de quimioluminescência. A detecção das bandas marcadas foi realizada através do equipamento *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BioRad®).

Tabela 4.3. Anticorpos primários utilizados nos experimentos de Western Blot.

Anticorpo Primário	Número do Catálogo (#)	Fabricante	Diluição	Anticorpo Secundário
Fosfo-ERBB2^{Tyr1248}	06-229	Merck Millipore	1/500	Coelho
ERBB2	OP15L	Merck Millipore	1/500	Camundongo
Fosfo-EGFR^{Tyr1069}	09-310	Merck Millipore	1/500	Coelho
EGFR	06-847	Merck Millipore	1/500	Coelho
Fosfo-Akt^{Ser473}	4060	Cell Signaling	1/1000	Coelho
Akt	2920	Cell Signaling	1/2000	Camundongo
Fosfo-ERK1/2$^{Thr202/Tyr204}$	SC-7383	Santa Cruz	1/500	Camundongo
ERK1/2	4695	Cell Signaling	1/1000	Coelho
Fosfo-IκBα^{Ser32}	2859	Cell Signaling	1/1000	Coelho
IκBα	4812	Cell Signaling	1/1000	Coelho
β-Actina	A5441	Sigma-Aldrich	1/7000	Camundongo

Tabela 4.4. Anticorpos secundários utilizados nos experimentos de Western Blot.

Anticorpo Secundário	Número do Catálogo (#)	Fabricante	Diluição
Coelho (HRP anti-rabbit)	NA934	GE Healthcare	1/7000
Camundongo (HRP anti-mouse)	NA931	GE Healthcare	1/7000

4.11. Citometria de fluxo

Para citometria de fluxo foram utilizadas $5x10^5$ células A549 ou H358 oriundas de cultura aderente ou da cultura de tumoresferas. As células foram lavadas com PBS e incubadas com PBS contendo 1% de albumina bovina sérica por 30 minutos a 4 °C para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos utilizados. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpos primários monoclonais marcados com *tags* fluorescentes PE (ficoeritrina) ou FITC (isotiocianato de fluoresceína). O anticorpo anti-CD24 é conjugado com FITC (mouse anti-human CD24, clone ML5, BD Biosciences, cat# 555426) e o anticorpo anti-CD44 é conjugado com PE (mouse anti-human CD44, clone G44-26, BD Biosciences cat# 562818). Após serem lavadas duas vezes com PBS, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% e analisadas em um citômetro de fluxo BD FACScaliburTM (Becton- Dickinson, EUA). Foram analisados um total de 10.000 a 30.000 eventos por amostra. O *gate* foi estabelecido com base na amostra parental sem o anticorpo ("branco"), de forma que 100% dessas células estivessem fora do *gate* de marcação. Os dados coletados foram analisados pelo programa KALUZA. A quantidade ideal de anticorpo a ser utilizada foi determinada por titulação.

4.12. Ensaio de proliferação e morte celular por imageamento ao vivo

Para a realização dos ensaios de proliferação e morte celular foi utilizado o equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* (Essen BioScience), uma incubadora de células com um microscópio acoplado contendo diferentes lentes objetivas, que captura e envia imagens para um disco rígido externo conectado à rede, reunindo e processando os dados das imagens. Com o uso deste dispositivo foi possível acompanhar, em tempo real, o andamento de ensaios funcionais, que foram registrados em tempos pré-determinados (a cada 2 horas, por exemplo). As imagens foram analisadas utilizando o software do sistema, *IncuCyte® Zoom Software* (Essen BioScience).

Para este ensaio de proliferação e morte celular foram realizadas triplicatas técnicas em placas de 96 poços. 3000 células da linhagem A549 e 9000 células da linhagem H358 (parentais ou oriundas da cultura de tumoresferas) foram plaqueadas por poço e incubadas *overnight*. Foi adicionada então a droga em sua respectiva concentração de interesse para Composto A, Neratinib e a combinação de ambos (ver legendas das figuras). Quando a combinação das drogas estava sendo avaliada, a condição controle foi tratada com 0,2% DMSO. Quando se investigava a contribuição individual de cada droga, a condição controle foi tratada com 0,1% DMSO. Junto com a droga ou DMSO, todos os poços foram tratados com *IncuCyte® Sytox Green Reagent* (1/1000) para contagem de células mortas. Este reagente marca o DNA nuclear de células que perderam a integridade da membrana plasmática. A confluência da placa foi avaliada em tempo real por cerca de 60 a 120 horas. Ao final do experimento, todos os poços foram tratados com Triton X-100 por 1 hora, para permeabilizar a membrana plasmática para que todas as células sejam marcadas com *Sytox Green*, permitindo, portanto, o cálculo da porcentagem de células mortas em relação às células totais.

4.13. Ensaio de migração celular por *wound-healing* acompanhado por imageamento ao vivo

Para a realização do ensaio de migração celular por *wound-healing* também foi utilizado o equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* (Essen BioScience) e placas de 96 poços especializadas (*ImageLock Microplate*, Essen BioScience, cat# 4379). $2{,}5 \times 10^4$ células da linhagem A549 e $7{,}5 \times 10^4$ células da linhagem H358 foram plaqueadas por poço e incubadas *overnight*. O risco foi feito em todos os poços da placa de 96 poços simultaneamente com o uso do equipamento *IncuCyte® WoundMaker* (Essen BioScience), segundo as instruções do fabricante. Os poços foram lavados com PBS duas vezes para remover debris celulares e células fracamente aderidas à placa. Foi adicionado a droga em sua respectiva concentração de

interesse para Composto A, Neratinib e a combinação de ambos (ver legendas das figuras). Quando a combinação das drogas estava sendo avaliada, a condição controle foi tratada com 0,2% DMSO. Quando se investigava a contribuição individual de cada droga, a condição controle foi tratada com 0,1% DMSO. A confluência da ferida foi avaliada em tempo real por cerca de 72 a 96 horas. As imagens foram analisadas utilizando o software do sistema, *IncuCyte® Zoom Software* (Essen BioScience).

4.14. Análise estatística

Todos os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão ou através de imagens representativas de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Prism 7* (*GraphPad Software*, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças entre os grupos foram determinadas por testes de amostras pareadas, como *t-student* e análise da variância (ANOVA). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas que tiveram valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. A cultura de tumoresferas enriquece para células com o fenótipo tronco-tumoral e com maior atividade da quinase IKKβ

Células iniciadoras de tumor (CITs) já foram isoladas e expandidas a partir de diversos tumores, incluindo pulmão **(Eramo et al., 2008)**. Uma abordagem comumente utilizada que enriquece para CITs se baseia na cultura de células em placas de baixa aderência com meio de cultivo definido de células-tronco **(Singh et al., 2004; Han et al., 2011; Eramo et al., 2008; Ponti et al., 2005)**. Com base nisto, nós submetemos as linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano A549 e H358, ambas portadoras de mutação em *KRAS*, a este cultivo para enriquecer para as CITs pulmonares presentes nestas linhagens. Nesta cultura, a células crescem suspensas e formam estruturas denominadas tumoresferas (Figura 5.1A). Quando dissociadas e re-plaqueadas na cultura aderente, estas células se "re-diferenciam" e adquirem morfologia comparável às células parentais crescidas em cultura aderente (Figura 5.1A), como já evidenciado por outros grupos **(Ali et al., 2016)**.

Uma vez que estas células crescem suspensas, é inevitável que agregados celulares (ou agregados de tumoresferas) se formem. Para minimizar esta decorrência da técnica, as células são plaqueadas em baixa confluência e evita-se movimentar as placas durante todo o tempo de cultura. Portanto, a fim de demonstrar que as tumoresferas não são meros agregados celulares, nós utilizamos a linhagem H358 para demonstrar que uma única célula é capaz de originar uma tumoresfera (Figura 5.1B), o que está de acordo com outros trabalhos que mostram que apenas CITs são capazes disto **(Cao et al., 2011)**.

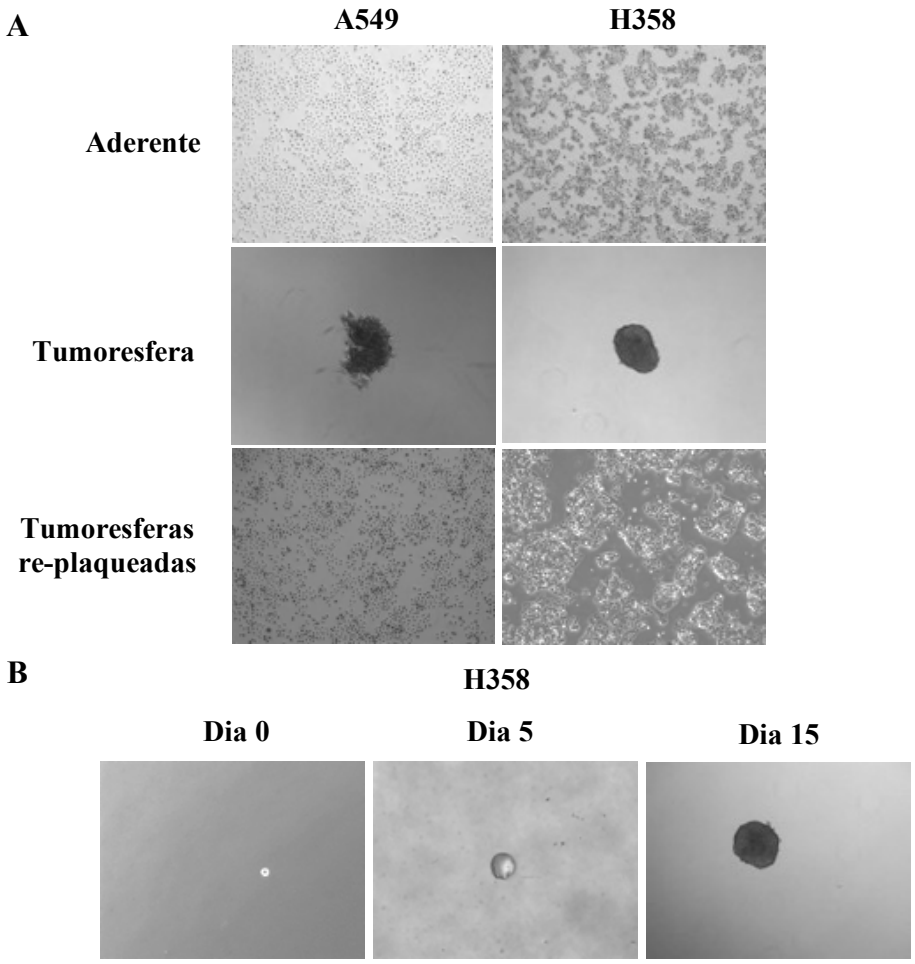


Figura 5.1. Formação de tumoresferas a partir de células de adenocarcinoma pulmonar humano. (A) Células de adenocarcinoma pulmonar humano A549 e H358 formam tumoresferas quando plaqueadas na cultura de baixa aderência e se "re-diferenciam" quando retornadas à cultura aderente, onde adquirem morfologia similar a das células parentais. **(B)** Uma única célula da linhagem H358 foi plaqueada por poço em uma placa de 24 poços de baixa aderência e acompanhada durante 15 dias. Os poços com uma única célula foram marcados e fotografados aos dias 0, 5 e 15.

Com o objetivo de comprovar que a nossa cultura de tumoresferas enrique para células com o fenótipo tronco-tumoral, nós comparamos a expressão de marcadores de CITs em células oriundas da cultura de tumoresferas com as células parentais da cultura aderente por qPCR (Figura 5.2). A expressão destes genes associados ao fenótipo tronco (*stemness*) é uma característica marcante de CITs e, portanto, sua maior expressão em células oriundas da cultura de tumoresferas sugere que esta abordagem está, de fato, enriquecendo para CITs pulmonares.

Para ambas as linhagens foi observado um aumento da expressão de SOX2, NANOG e OCT4, que são marcadores tradicionais de *stemness*, uma vez que regulam pluripotência e autorrenovação de células-tronco embrionárias **(Hadjimichael et al., 2015)**. CXCR4, que é um marcador de células-tronco hematopoiéticas e está fortemente envolvido com propriedades metastáticas e de resistência à terapia **(Chatterjee et al., 2014)**, ambas propriedades inerentes as CITs, foi encontrado significativamente mais expresso em células oriundas da cultura de tumoresferas quando comparado as células cultivadas de forma aderente. Ainda, BMI-1 foi encontrado altamente expresso nas tumoresferas derivadas da linhagem A549. Além de regular autorrenovação em células-tronco hematopoiéticas, BMI-1 já foi implicado em promover a transição epitelial-mesenquimal **(Paranjape et al., 2014)**. Encontramos também uma maior expressão de CD24 em tumoresferas derivadas da linhagem A549. CD24, além de ser usado frequentemente como um marcador de CITs, está envolvido em adesão celular e metástase em câncer de pulmão **(Lee et al., 2010)**. O aumento da expressão de E-Caderina na cultura não-aderente comparado a cultura aderente nas linhagens A549 e H358 não era o que esperávamos. Entretanto, nós hipotetizamos que este resultado pode ser consequência do aumento da superfície de contato entre as células, uma vez que nas tumoresferas o contato célula-célula é maior do que em uma cultura bidimensional.

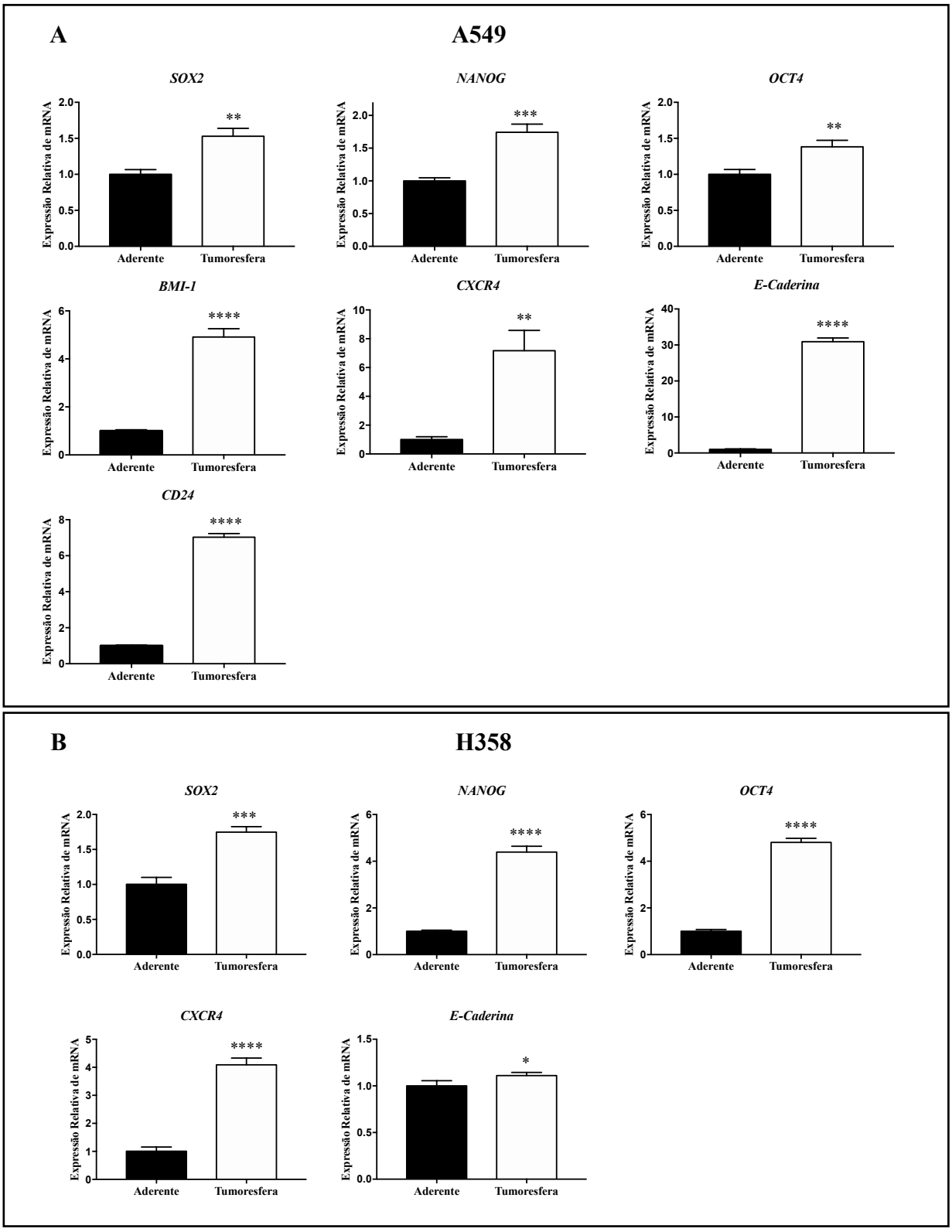


Figura 5.2. Células oriundas da cultura de tumoresferas apresentam maior expressão de genes marcadores de CITs. (A) Análise de expressão gênica por qPCR dos genes *SOX2*, *NANOG*, *OCT4*, *BMI-1*, CXC*R4*, *E-Caderina* e *CD24* na linhagem A549 e (B) *SOX2*, *NANOG*, *OCT4*, CXC*R4* e *E-Caderina* na linhagem H358 comparando as culturas de tumoresferas e aderente. O gene *ACTB* (que codifica para β-Actina) foi utilizado como controle endógeno na normalização da expressão. Os asteriscos indicam *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001 de acordo com o teste *student-t*.

Posteriormente, nós comparamos a habilidade clonogênica das células das linhagens A549 e H358 quando crescidas na cultura aderente e na cultura de tumoresferas. Células oriundas da cultura de tumoresferas apresentam maior crescimento celular clonogênico (Figura 5.3). Uma vez que as CITs apresentam maior oncogenicidade que as células não-CITs, este resultado corrobora o nosso resultado de expressão, sugerindo novamente que a cultura de tumoresferas está realmente enriquecendo para CITs nestas linhagens pulmonares.

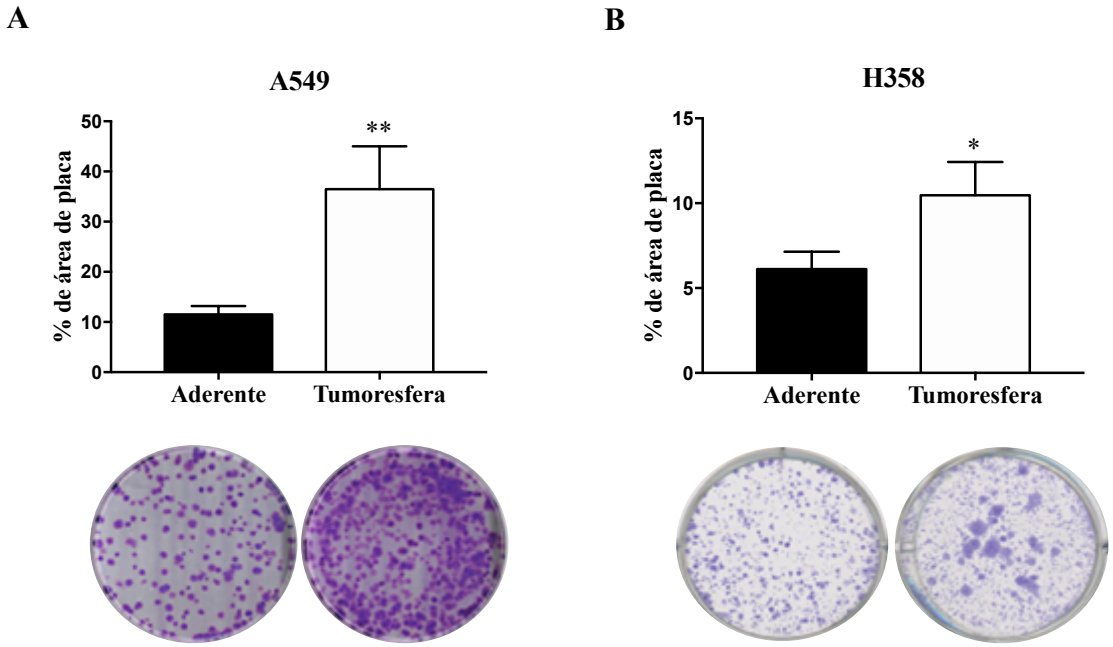


Figura 5.3. Células oriundas da cultura de tumoresferas apresentam maior crescimento clonogênico. Após 14 dias na cultura de baixa aderência, as tumoresferas formadas foram dissociadas e **(A)** 500 células da linhagem A549 e **(B)** 5000 células da linhagem H358 foram plaqueadas para o ensaio de formação de colônias. O gráfico mostra a porcentagem da área da placa coberta por colônias. As imagens representativas do experimento se encontram abaixo do gráfico. Os asteriscos indicam *p<0,05 e **p<0,01, de acordo com o teste *student-t*.

Finalmente, nós avaliamos a atividade da quinase IKKβ em células derivadas de ambas as culturas através da fosforilação de IκBα por Western Blot, seu substrato mais bem caracterizado. Células oriundas da cultura de tumoresfera apresentam maior atividade de IKKβ, uma vez que possuem maior quantidade de IκBα fosforilada (Figura 5.4). Este dado é consistente com o fato de que ativação da via canônica do NF-κB é responsável por diversas

propriedades biológicas das CITs, tais quais o fenótipo tronco, autorrenovação, maior expressão de citocinas e regulação de genes relacionados à transição epitelial-mesenquimal **(Rinkenbaugh e Baldwin, 2016)**.

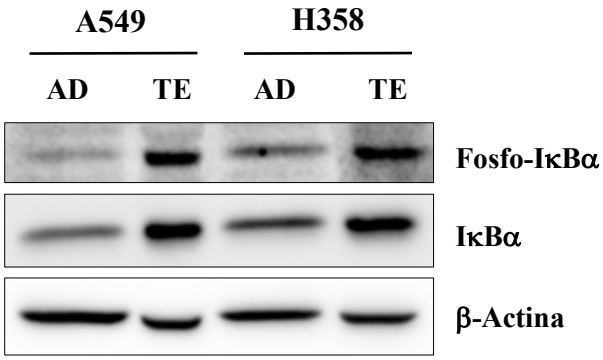


Figura 5.4. A quinase IKKβ está mais ativa em células oriundas da cultura de tumoresferas. Células oriundas da cultura aderente (AD) e da cultura de tumoresferas (TE) foram lisadas para extração de proteínas. 50 μg de proteínas totais foram utilizadas e avaliadas por Western Blot para a atividade de IKKβ. Os anticorpos utilizados estão indicados ao lado direito.

5.2. Inibição farmacológica ou por interferência de RNA de IKKβ reduz a expressão de marcadores de CITs

Como a expressão de genes de *stemness* é uma característica das CITs, e como a nossa hipótese é de que a quinase IKKβ contribua para este fenótipo, nós resolvemos investigar se a inibição de IKKβ afetaria a expressão dos mesmo genes de *stemness*, que se mostraram enriquecidos em células oriundas da cultura de tumoresferas (Figura 5.2), além de alguns outros, como ABCG2 e ALDH. ABCG2 é uma proteína de transporte da membrana celular dependente de ATP cuja função, entre outras, é frequentemente relacionada à resistência à terapia, uma vez que funciona como uma bomba de efluxo expulsando drogas do interior celular **(Natarajan et al., 2012)**. Da mesma forma, ALDH é uma enzima responsável pela oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos e, portanto, está relacionada a processos de detoxificação celular que eventualmente resultam em resistência a drogas **(Januchowski et al., 2013)**.

De fato, a inibição farmacológica de IKKβ reduz a expressão de vários genes relevantes para o contexto do fenótipo tronco-tumoral (Figura 5.5), sugerindo, mais uma vez, que IKKβ desempenha um papel importante na manutenção das propriedades de *stemness*.

A inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA também parece reduzir a expressão de grande parte dos genes enriquecidos pelas células derivadas da cultura de tumoresferas (Figura 5.6). A expressão de NANOG parece não ser afetada, enquanto que a expressão de BMI-1, CXCR4 e ABCG2 aparenta representar uma tendência à diminuição quando a expressão de IKKβ é inibida (Figura 5.6). De qualquer forma, estes dados devem ser repetidos, já que este é um único experimento e ainda não foi realizado para a linhagem H358. Interessantemente, a inibição da expressão de IKKβ (*downstream* de KRAS) leva à diminuição da expressão de KRAS (Figura 5.6), cujo dado já foi comprovado por outros membros de nosso laboratório em experimentos de Western Blot.

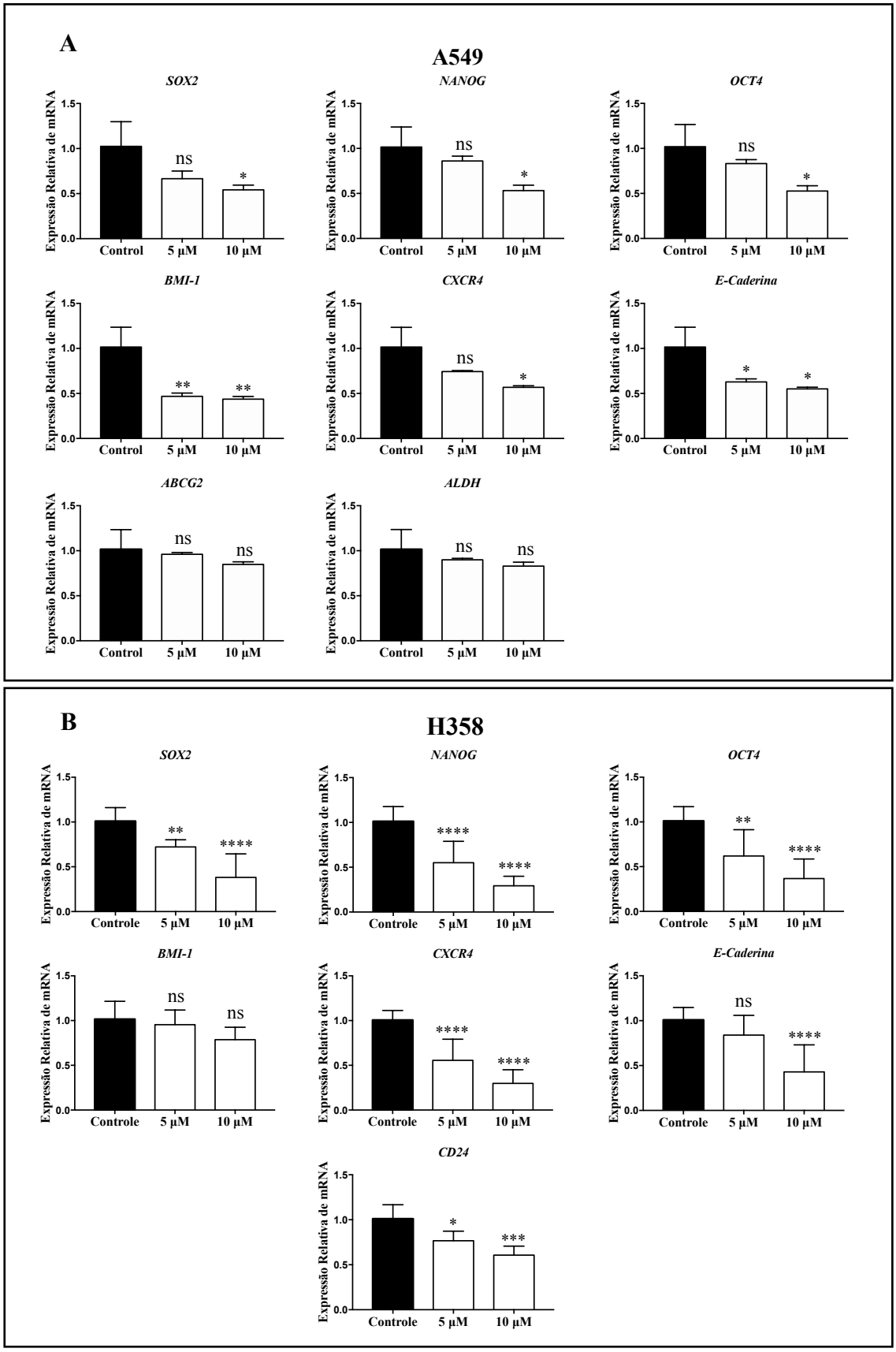


Figura 5.5. Inibição farmacológica de IKKβ em células A549 e H358 reduz a expressão de genes marcadores de CITs. $1x10^5$ células da linhagem **(A)** A549 e **(B)** H358 foram plaqueadas e tratadas com DMSO 0,1% (controle), Composto A 5 µM ou 10 µM por 48 horas. Após extração de RNA e síntese de cDNA, a expressão dos genes indicados foi analisada por qPCR. O gene *ACTB* (que codifica para β-Actina) foi utilizado como controle endógeno na normalização da expressão. Os asteriscos indicam *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001 de acordo com o teste *ANOVA*.

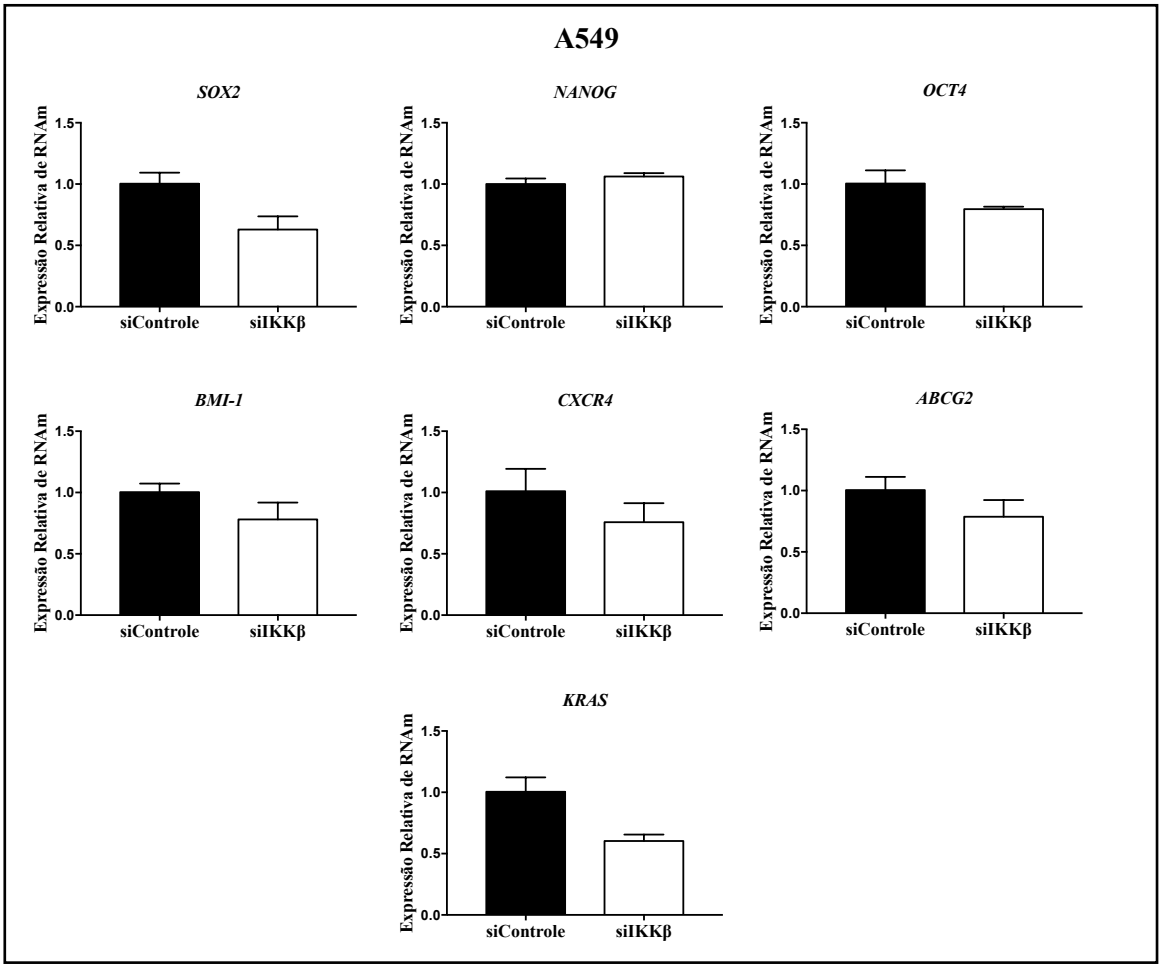


Figura 5.6. Inibição de IKKβ por interferência de RNA em células A549 reduz a expressão de genes marcadores de CITs. $1x10^5$ células da linhagem A549 foram transfectadas com siControle ou siIKKβ. Após 72h foi extraído o RNA. A expressão dos genes indicados foi analisada por qPCR. O gene *ACTB* (que codifica para β-Actina) foi utilizado como controle endógeno na normalização da expressão.

5.3. Inibição da atividade de IKKβ afeta seletivamente o crescimento clonogênico e a proliferação de células derivadas da cultura de tumoresferas

Nós mostramos previamente que a quinase IKKβ está mais ativa em células derivadas da cultura de tumoresferas do que em células derivadas da cultura aderente (Figura 5.4). Isto traz fortes indícios de que IKKβ desempenha, portanto, um papel importante em CITs pulmonares.

Embora diferentes grupos já tenham demonstrado o papel citoestático causado pela inibição tanto genética quanto farmacológica de IKKβ **(Bassères et al., 2014; Xia et al., 2012)**, nós avaliamos também como a inibição da atividade de IKKβ afeta o crescimento clonogênico e a proliferação de células oriundas da cultura aderente e da cultura de tumoresferas.

Interessantemente, o tratamento com Composto A em células da cultura aderente não parece afetar seu crescimento clonogênico. Embora o número de colônias permaneça o mesmo, o tamanho é visualmente menor, suportando a ideia de que a inibição de IKKβ reduz a proliferação celular (Figura 5.7A-C). Por outro lado, o tratamento com Composto A no momento do plaqueameto da cultura de tumoresferas leva à redução da capacidade clonogênica destas células (Figura 5.7D-F).

Posteriormente, nós realizamos ensaios de proliferação celular com as células oriundas da cultura aderente e da cultura de tumoresferas, ambas tratadas ou não com Composto A (5 ou 10 μM). Percebe-se, através dos dois gráficos, que a proliferação de células derivadas da cultura de tumoresferas é muito mais afetada do que a proliferação celular de células derivadas da cultura aderente (Figura 5.8). Em conjunto, estes resultados sugerem que a inibição da atividade de IKKβ é afeta as CITs preferencialmente.

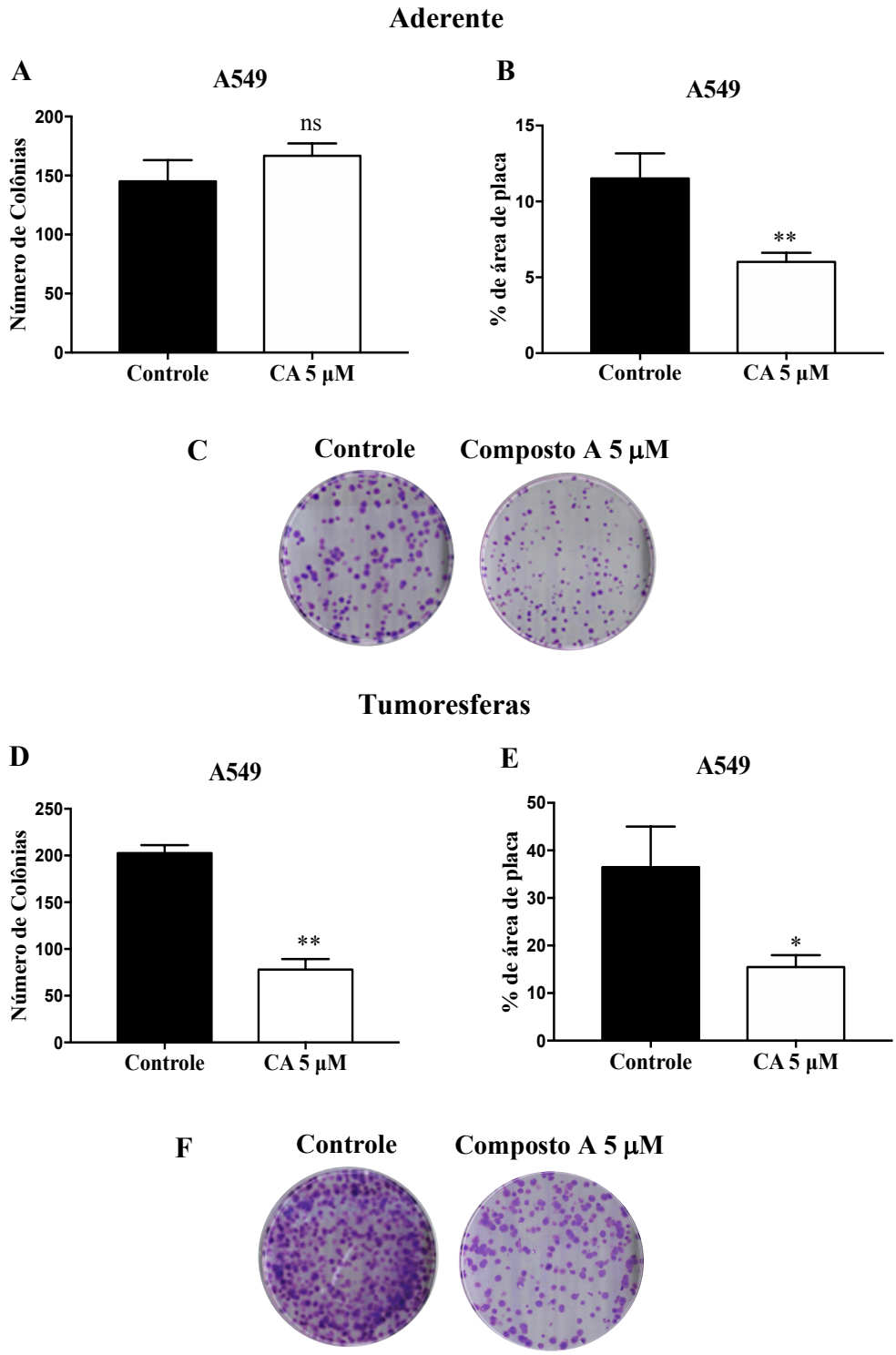


Figura 5.7. Inibição da atividade de IKKβ reduz o crescimento clonogênico de células oriundas da cultura de tumoresferas. 500 células A549 oriundas da cultura aderente e da cultura de tumoresferas foram plaqueadas para o ensaio de formação de colônias na condição controle (0,1% DMSO) ou tratada com 5 µM Composto A. Os gráficos mostram (A, D) o número de colônias e (B, E) a porcentagem da área da placa coberta por colônias oriundas da cultura aderente e (C, F) as imagens representativas do experimento. Os asteriscos indicam *p<0,05 e **p<0,01, de acordo com o teste *student-t*.

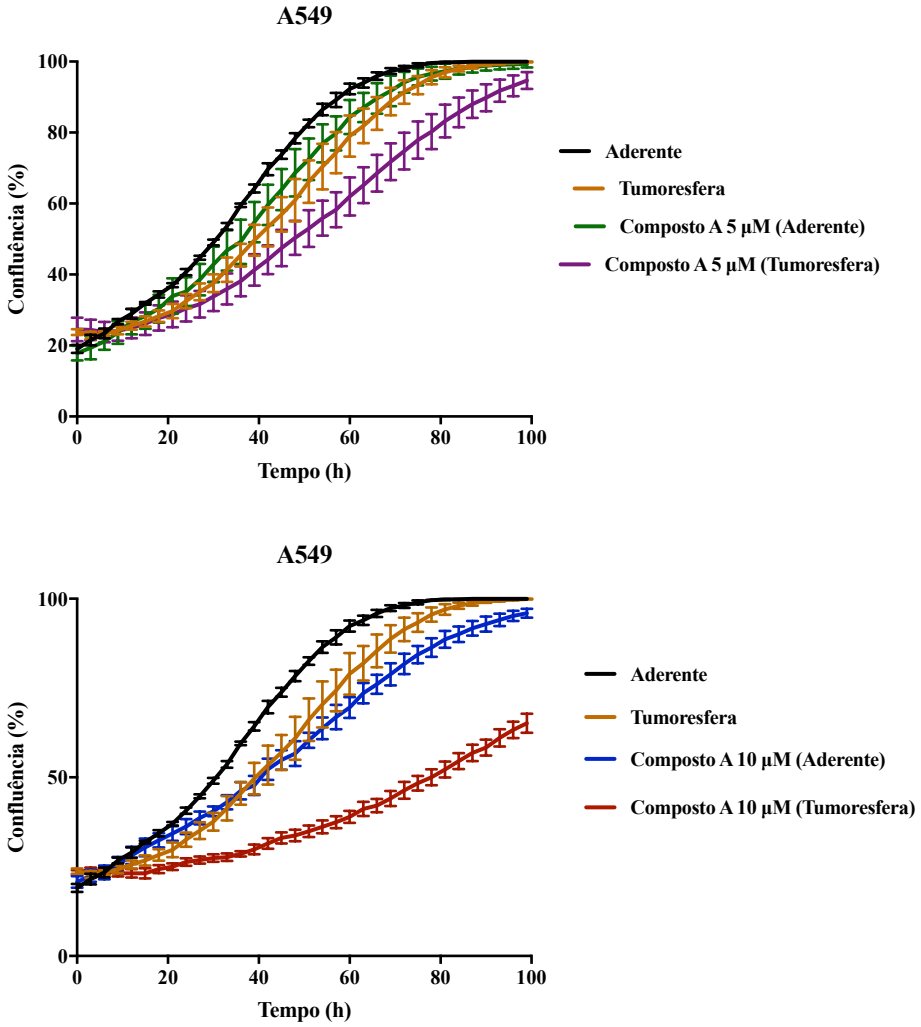


Figura 5.8. Inibição da atividade de IKKβ diminui preferencialmente a proliferação de células oriundas da cultura de tumoresferas. 3000 células da linhagem A549 oriundas da cultura aderente ou da cultura de tumoresfera foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,1% (controle) ou diferentes concentrações de Composto A (5 ou 10 µM) na presença de *Sytox Green*. A proliferação celular foi avaliada por imageamento ao vivo através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* por 66 horas e representada nos gráficos pelos valores de confluência.

5.4. Inibição da atividade de IKKβ e a inibição dual de EGFR/ERBB2 reduz proliferação celular e formação de tumoresferas pelas linhagens A549 e H358

A cultura de tumoresferas representa uma forma de avaliar a atividade de CITs *in vitro*, uma vez que o número de tumoresferas formadas é proporcional ao número de CITs presentes na população celular **(Cao et al., 2011)**. Uma vez que a quinase IKKβ está mais ativa em células pulmonares oriundas da cultura de tumoresferas, afeta a expressão de genes de *stemness* nestas células e sua inibição afeta preferencialmente a clonogenicidade e proliferação de células pulmonares oriundas de tumoresferas, nós resolvemos avaliar se a sua inibição de IKKβ diminui a capacidade de células das linhagens A549 e H358 de formarem tumoresferas. Diz-se que um determinado tratamento reduz o número de CITs na população celular se menos tumoresferas são formadas. Isto é verdade se o tratamento não causa morte celular na população de células tumorais como um todo. Nos experimentos mostrados a seguir, nós utilizamos um inibidor altamente específico para quinase IKKβ, denominado Composto A **(Ziegelbauer et al., 2005)**, e um inibidor dual para EGFR e ERBB2, denominado Neratinib **(Subramaniam et al., 2015)** (Figura 5.9A), cuja base lógica para sua utilização é explicada adiante. Nós validamos o efeito destes inibidores por Western Blot através da avaliação da atividade de seus alvos. De fato, o tratamento de células da linhagem A549 e H358 com Composto A diminui a atividade da quinase IKKβ, observada pela fosforilação de IκBα, e o tratamento com Neratinib diminui a atividade de EGFR e ERBB2, observada tanto pela fosforilação de EGFR e ERBB2 quanto pela ativação da via MEK/ERK, observada pela fosforilação de ERK1/2 (Figura 5.9B).

Após isto, nós tratamos as células das linhagens A549 e H358 com diferentes concentrações de Composto A (1–10 μM) e avaliamos proliferação (Figura 5.10) e morte celular (Figura 5.11) conforme descrito no item 4.12. Uma vez que a inibição farmacológica de

IKKβ não causa morte celular considerável, nós avaliamos se IKKβ desempenha um papel na formação de tumoresferas. De fato, o tratamento com Composto A diminui o número de tumoresferas formadas nas linhagens A549 e H358 (Figura 5.12), sugerindo que IKKβ desempenha um papel importante na biologia das CITs pulmonares com mutação em *KRAS*.

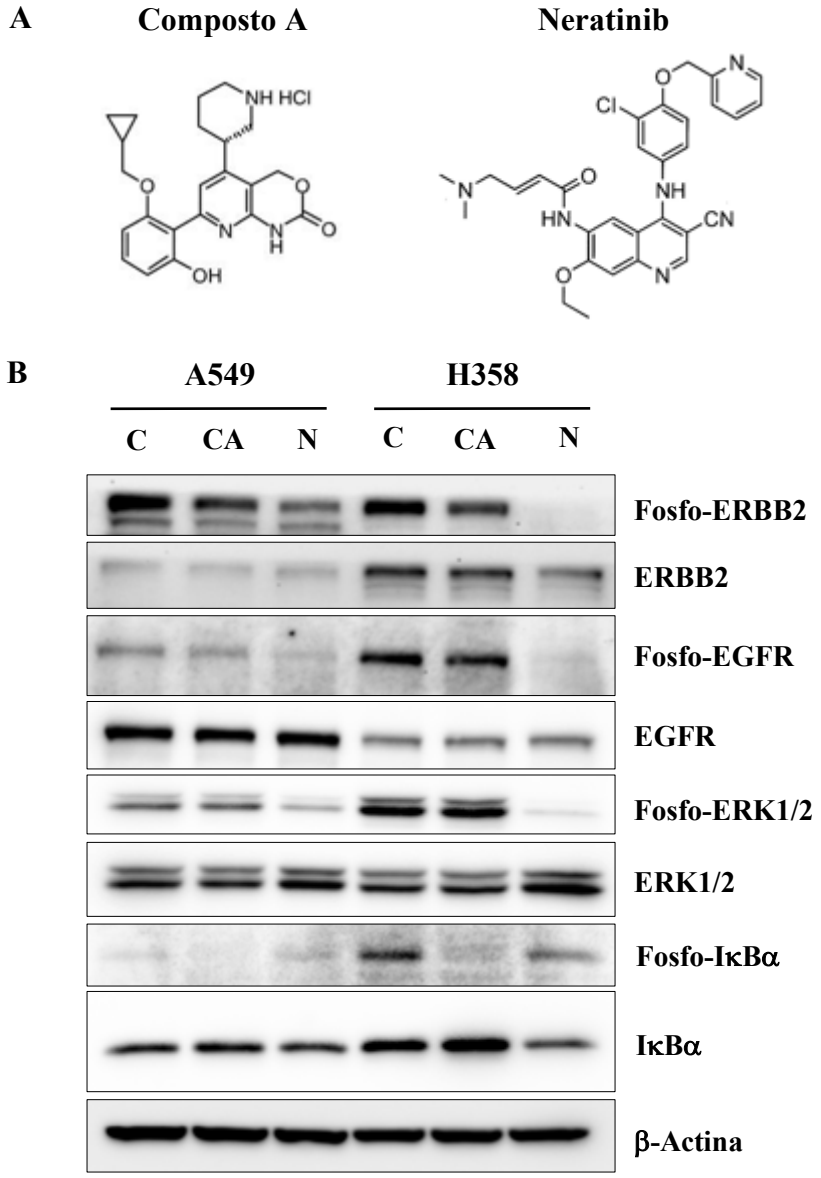


Figura 5.9. Validação da inibição farmacológica de IKKβ por Composto A e de EGFR/ERBB2 por Neratinib. (A) Estrutura dos inibidores utilizados, Composto A e Neratinib. **(B)** $5x10^5$ células da linhagem A549 e H358 foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com 0,1% DMSO (C), 5 μM de Composto A (CA) ou 500 nM de Neratinib (N) por 30 minutos e lisadas para extração de proteínas. 50 μg de proteínas totais foram utilizadas e avaliadas por Western Blot para a atividade de IKKβ e atividade de EGFR/ERBB2. Os anticorpos utilizados estão indicados ao lado direito.

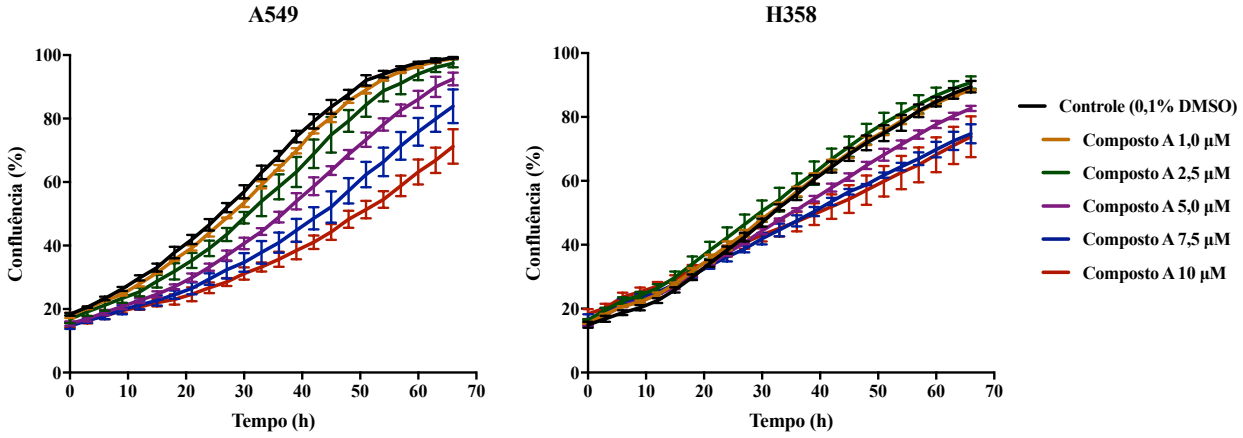


Figura 5.10. Inibição farmacológica da quinase IKKβ diminui a proliferação de células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. 3000 células da linhagem **(A)** A549 e **(B)** 9000 células da linhagem H358 foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,1% (controle) ou diferentes concentrações de Composto A (1–10 µM) na presença de *Sytox Green*. A proliferação celular foi avaliada por imageamento ao vivo através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* por 66 horas e representada nos gráficos pelos valores de confluência.

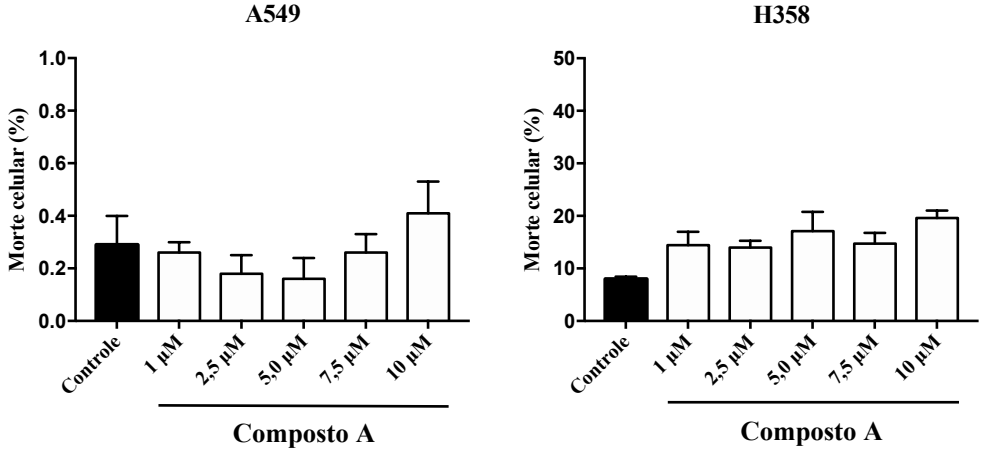


Figura 5.11. Inibição farmacológica da quinase IKKβ causa pouca morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. 3000 células da linhagem **(A)** A549 e **(B)** 9000 células da linhagem H358 foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,1% (controle) ou diferentes concentrações de Composto A (1–10 µM) na presença de *Sytox Green*. Após o término do experimento de proliferação celular, as células foram tratadas com Triton X-100 e o número de células mortas em função do número total de células pode ser avaliado através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System*.

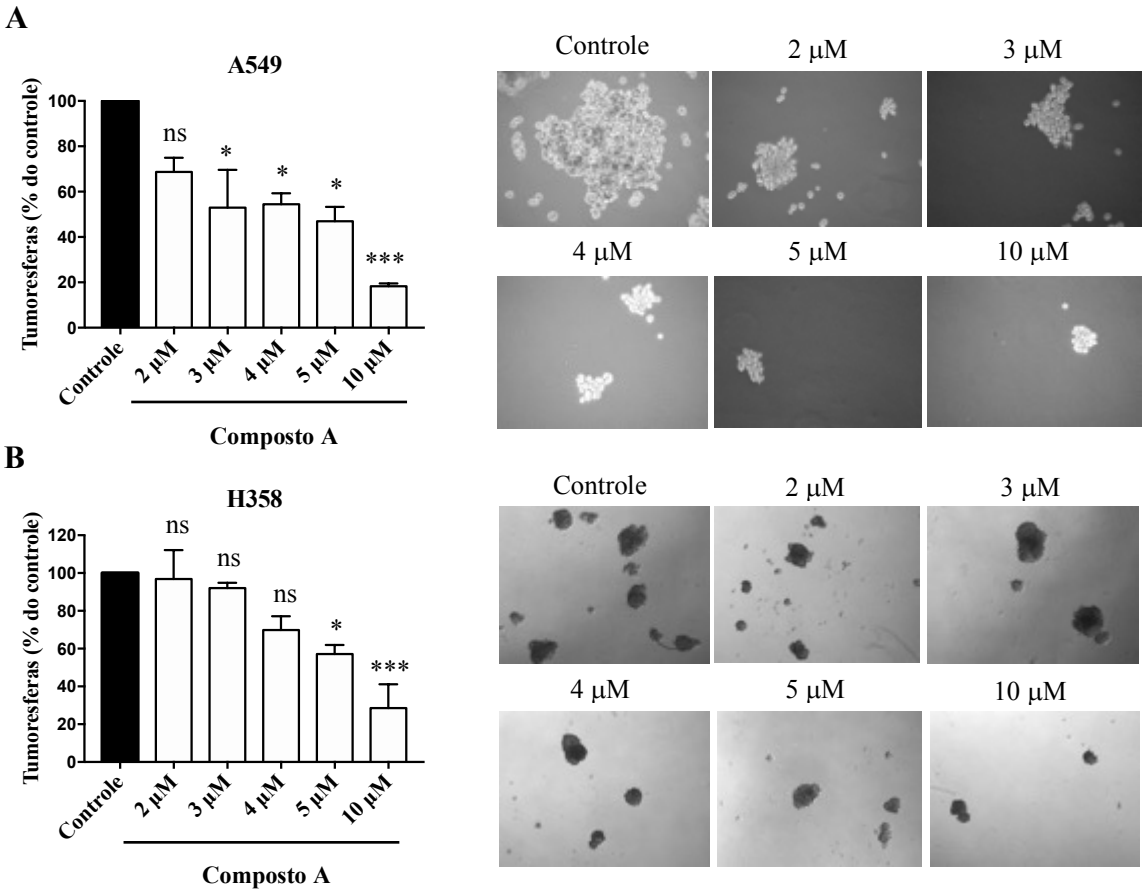


Figura 5.12. Inibição farmacológica da quinase IKKβ diminui a formação de tumoresferas por células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. (A) 1000 células da linhagem A549 e **(B)** H358 foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços de baixa aderência e tratadas com DMSO 0,1% ou diferentes concentrações de Composto A. As células foram cultivadas por 14 dias e as tumoresferas maiores do que 50 μm foram contadas. Os asteriscos indicam *p<0,05 e ***p<0,001 de acordo com o teste *ANOVA*.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, nós resolvemos avaliar também a inibição de outros alvos como uma estratégia terapêutica para a redução de CITs pulmonares com mutação em *KRAS*. Embora o uso de inibidores seletivos para EGFR tenham falhado em testes clínicos para o tratamento de tumores induzidos por KRAS, um estudo recente mostrou que a inibição dual de EGFR e ERBB2 quase que completamente inibe a tumorigênese pulmonar induzida por $KRAS^{G12D}$ **(Björn et al., 2018)**. Paralelamente, um segundo estudo independente mostrou que o uso de um outro inibidor irreversível de proteínas da família ERBB tem o mesmo efeito no

contexto de tumores induzidos por $KRAS^{G12D}$ sozinha e por $KRAS^{G12D}$ com deleção de p53 **(Moll et al., 2018)**.

Interessantemente, já foi demonstrado que ativação de EGFR está relacionada a fosforilação de IKKβ e consequente ativação de NF-κB **(Yang et al., 2012; Jiang et al., 2011)**. Ainda, o mecanismo pelo qual tumores pulmonares induzidos por EGFR adquirem resistência à terapia envolve a ativação de NF-κB pelo complexo IKK **(Blakely et al., 2015)**, sugerindo que a inibição combinada de EGFR e IKKβ possa ser clinicamente relevante para estes pacientes oncológicos. Finalmente, também foi demonstrado que a ativação de NF-κB pela via ERBB desempenha um papel importante na biologia de CITs mamárias, uma vez que a superexpressão de IκBα reduz a formação de tumoresferas mamárias com mutação em ERBB2 e o diminui o potencial tumorigênico de CITs em camundongos imunodeficientes **(Hinohara et al., 2012)**. Entretanto, o papel da via ERBB nunca foi investigado no contexto de CITs pulmonares induzidas por KRAS.

Com base nisto, nós resolvemos avaliar como a inibição dual de EGFR e ERBB2 afeta a proliferação e morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em *KRAS*. O tratamento com Neratinib reduz a proliferação celular de ambas as linhagens celulares (Figura 5.13). Interessantemente, a linhagem H358 é muito mais sensível a este inibidor e, por isto, menores concentrações foram utilizadas (Figura 5.13). Nós supomos que esta vulnerabilidade se deve, entre outros motivos, ao fato da linhagem H358 ter mutação em *KRAS* em heterozigose. Ainda, é possível perceber que 100 e 10 nM de Neratinib para as linhagens A549 e H358, respectivamente, não aumenta a morte celular quando comparada ao controle (Figura 5.14). Posteriormente, nós utilizamos estas mesmas concentrações, uma vez que não causam morte celular muito maior do que a condição controle, para avaliar se afetam a formação de tumoresferas. De fato, inibição dual de EGFR/ERBB2 diminui a formação de tumoresferas de linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar com mutação em KRAS (Figura 5.15).

Isto sugere que, de alguma forma, embora KRAS esteja mutada, alguns sinais *upstream* ainda podem ser importantes para a manutenção do fenótipo tronco-tumoral.

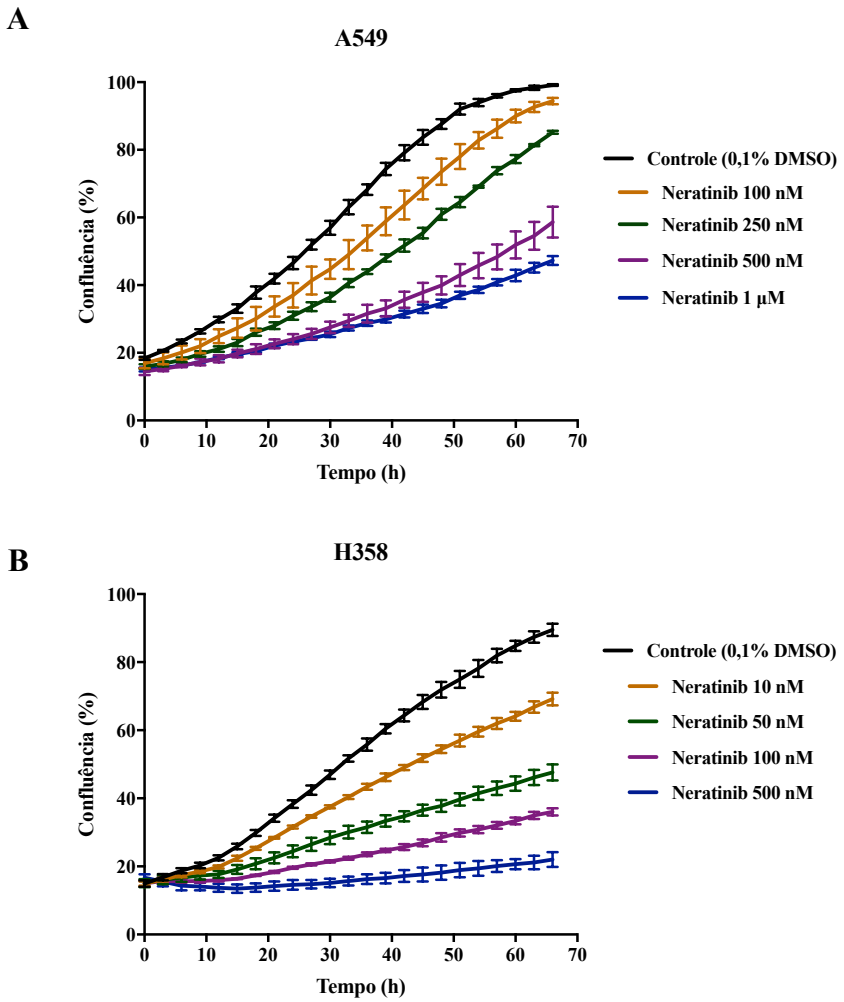


Figura 5.13. Inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 diminui a proliferação celular de células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. (A) 3000 células da linhagem A549 e **(B)** 9000 células da linhagem H358 foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,1% (controle) ou diferentes concentrações de Neratinib A (100–1000 nM para A549 e 10–500 nM para H358) na presença de *Sytox Green*. A proliferação celular foi avaliada por imageamento ao vivo através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* por 66 horas e representada nos gráficos pelos valores de confluência.

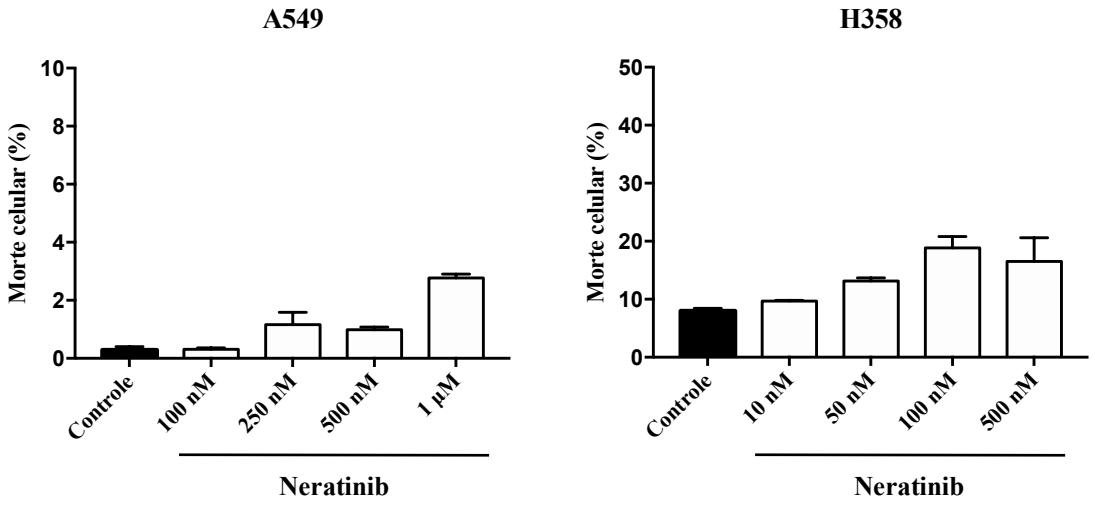


Figura 5.14. Inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 causa pouca morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. 3000 células da linhagem **(A)** A549 e **(B)** 9000 células da linhagem H358 foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,1% (controle) ou diferentes concentrações de Neratinib A (100–1000 nM para A549 e 10–250 nM para H358) na presença de *Sytox Green*. Após o término do experimento de proliferação celular, as células foram tratadas com Triton X-100 e o número de células mortas em função do número total de células pode ser avaliado através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System*.

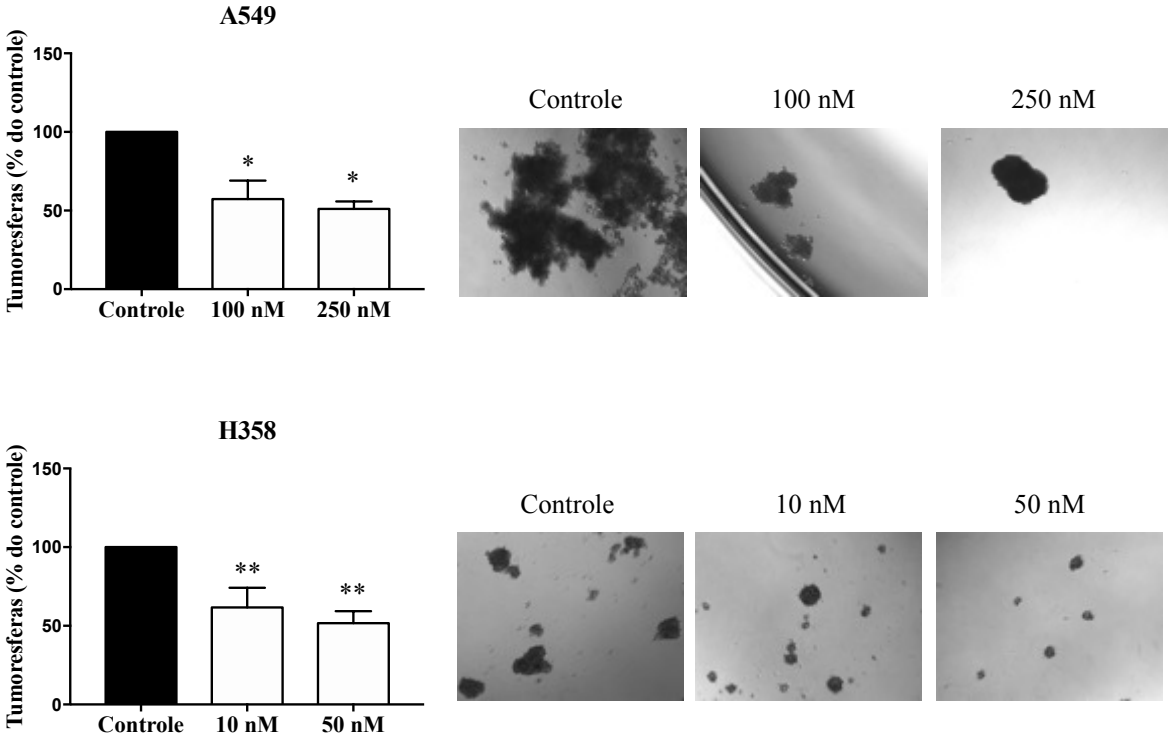


Figura 5.15. Inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 diminui a formação de tumoresferas por células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. (A) 1000 células da linhagem A549 e **(B)** H358 foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços de baixa aderência e tratadas com DMSO 0,1% ou diferentes concentrações de Neratinib. As células foram cultivadas por 14 dias e as tumoresferas maiores do que 50 µm foram contadas. Os asteriscos indicam *p<0,05 e **p<0,01 de acordo com o teste *ANOVA*.

Uma vez que avaliamos os efeitos individuais da inibição da atividade de IKKβ e EGFR/ERBB2, nós resolvemos investigar os efeitos da inibição combinada destes alvos na proliferação, morte celular e formação de tumoresferas. Os resultados obtidos sugerem que Composto A e Neratinib possuem efeito aditivo na proliferação celular das linhagens A549 e H358 (Figura 5.16). Quanto à morte celular, nas linhagens A549 é possível observar um efeito sinérgico em concentrações relativamente altas, por exemplo em 5 μM de Composto A combinado com 1 μM de Neratinib e 10 μM de Composto A combinado com 1 μM de Neratinib (Figura 5.17). Curiosamente, para a linhagem H358 não foi observado nenhum efeito consistente, ou seja, nem aditivo e nem sinérgico (Figura 5.17). Nenhum destes compostos, sozinhos ou combinados, parece causar morte celular expressiva na linhagem H358.

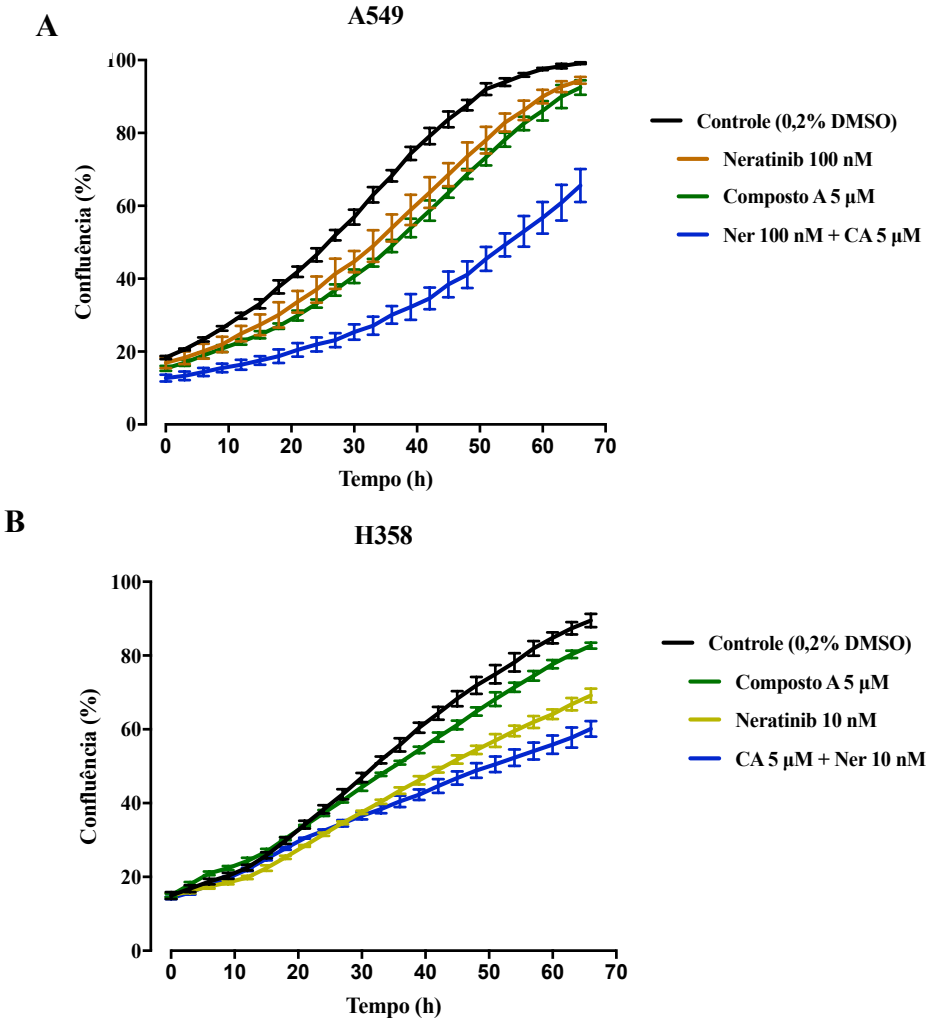


Figura 5.16. Inibição combinada de IKKβ e EGFR/ERBB2 possui efeito aditivo na proliferação celular de células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. (A) 3000 células da linhagem A549 e **(B)** 9000 células da linhagem H358 foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,2% (controle) ou Composto A (5 µM) e/ou Neratinib A (100 ou 10 nM para A549 e H358, respectivamente) na presença de *Sytox Green*. A proliferação celular foi avaliada por imageamento ao vivo através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* por 66 horas e representada nos gráficos pelos valores de confluência.

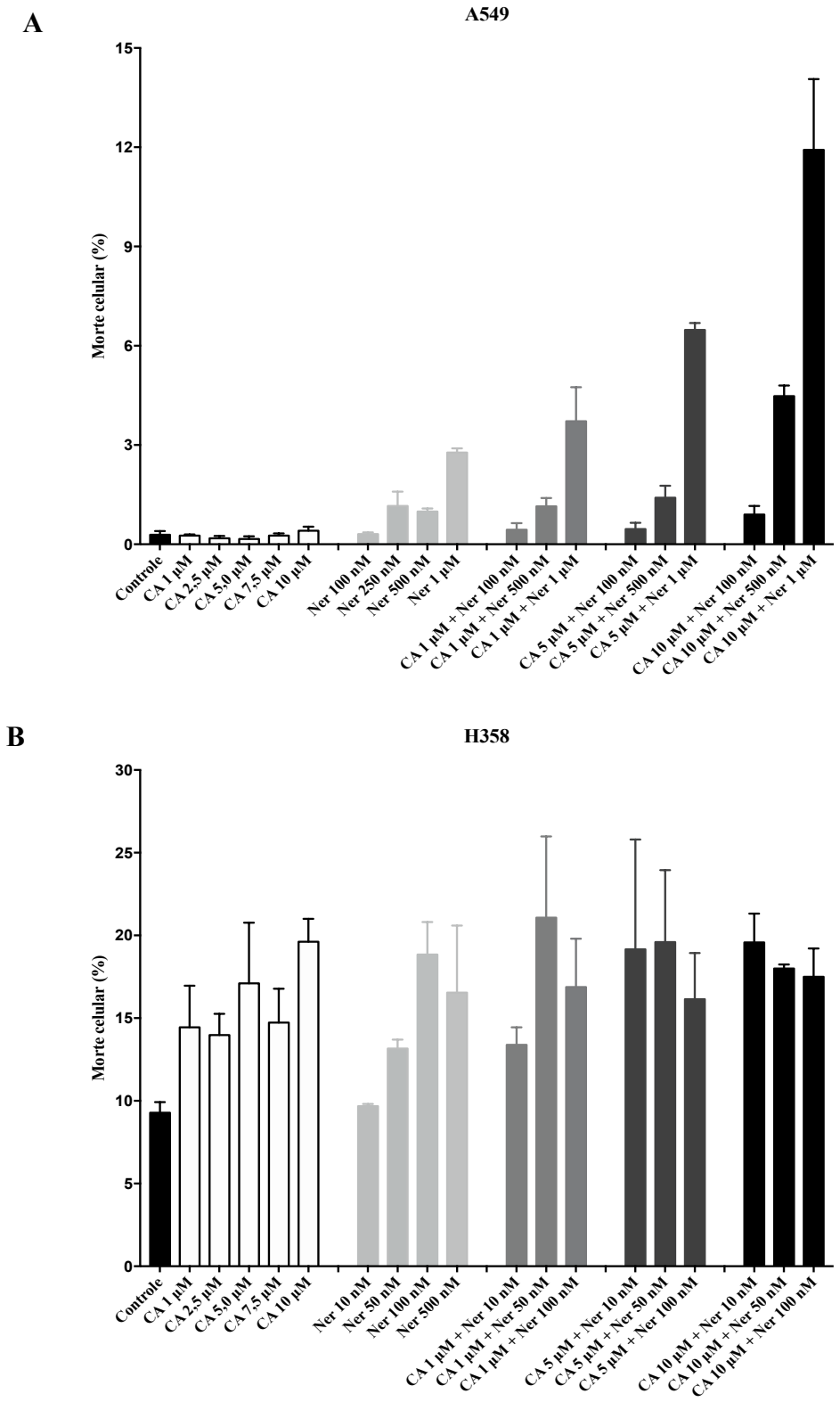


Figura 5.17. Inibição combinada da atividade de IKKβ e de EGFR/ERBB2 tem efeito na morte celular em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. (A) 3000 células da linhagem A549 e **(B)** 9000 células da linhagem H358 foram plaqueadas em triplicata para cada grupo de tratamento em uma placa de 96 poços e tratadas com DMSO 0,2% (controle) ou diferentes concentrações de Composto A e Neratinib A conforme indicado na figura na presença de *Sytox Green*. Após o término do experimento de proliferação celular, as células foram tratadas com Triton X-100 e o número de células mortas em função do número total de células pode ser avaliado através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System*.

Após os ensaios de proliferação e morte celular utilizando a combinação de drogas (Composto A e Neratinib), nós avaliamos qual o efeito destes inibidores na formação de tumoresferas. Nossos resultados sugerem que há um efeito aditivo, sendo que para a linhagem H358 a combinação de 5 μM Composto A e 100 nM Neratinib completamente inibe a formação de tumoresferas (Figura 5.18).

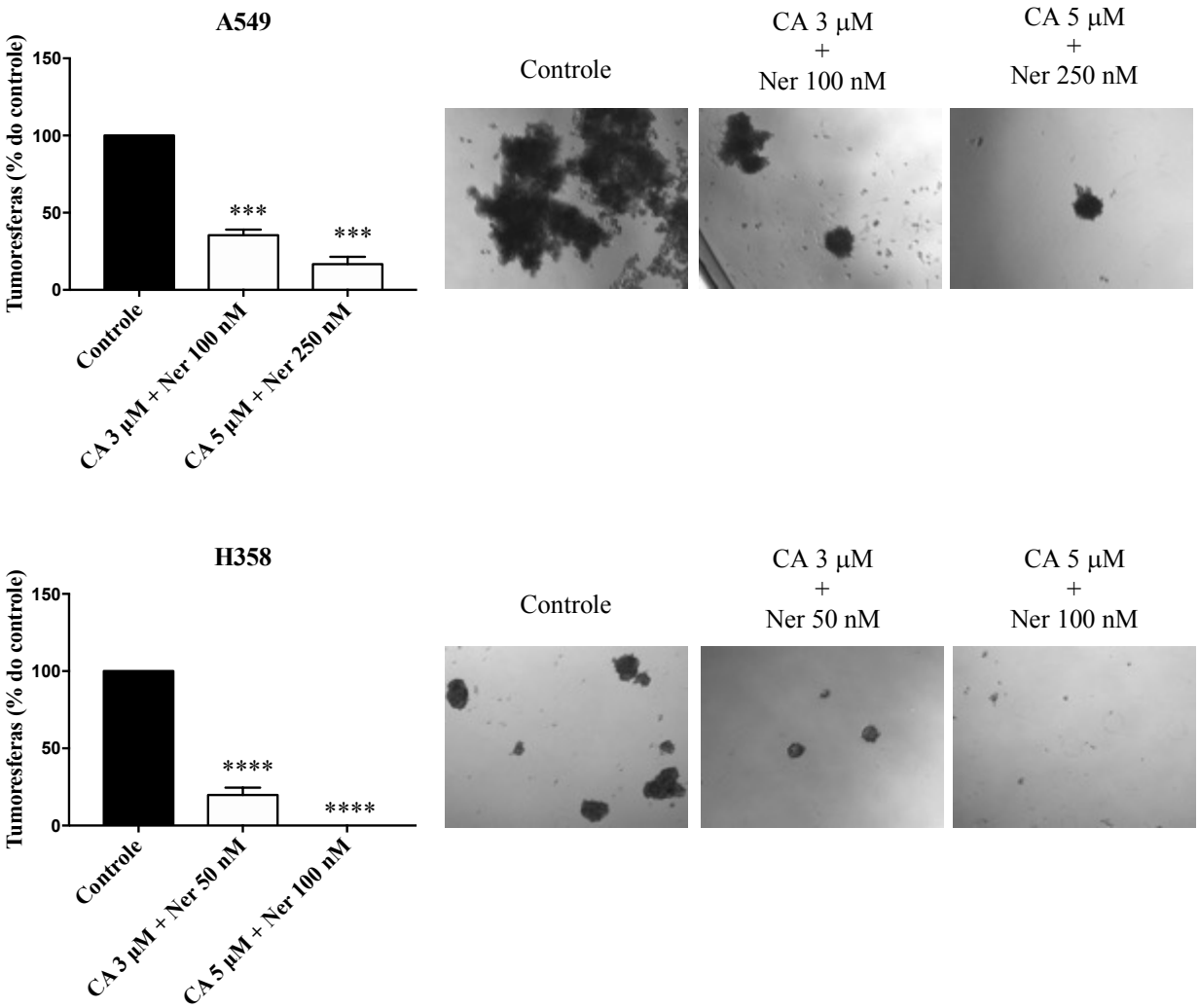


Figura 5.18. Inibição combinada da atividade de IKKβ e de EGFR/ERBB2 diminui a formação de tumoresferas por células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. (A) 1000 células da linhagem A549 e **(B)** H358 foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços de baixa aderência e tratadas com DMSO 0,2% ou diferentes concentrações de Composto A e Neratinib. As células foram cultivadas por 14 dias e as tumoresferas maiores do que 50 μm foram contadas. Os asteriscos indicam ***p<0,001 e ****p<0,0001 de acordo com o teste *ANOVA*.

5.5. Inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduz a formação de tumoresferas e autorrenovação

Para validar os resultados com a inibição farmacológica e o efeito *on-target* de Composto A nós utilizamos uma abordagem de inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA. Como controle foi utilizado um siRNA sem similaridade com genes humanos conhecidos, enquanto que a inibição da expressão de KRAS foi utilizada como controle positivo. Nós validamos a eficiência da inibição através de PCR em tempo real, onde obtivemos cerca de 60% de inibição da expressão de KRAS e 70% de inibição de IKKβ (Figura 5.19A).

Desta forma, nós seguimos para os ensaios de formação de tumoresferas e autorrenovação. Nós observamos que a inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduz a capacidade de células A549 de formarem tumoresferas primárias (Figura 5.19B). Esta redução foi semelhante à redução observada com inibição da expressão de KRAS (Figura 5.19). Não obstante, para avaliar o papel de IKKβ sobre a capacidade de autorrenovação de CITs, nós investigamos como a inibição de IKKβ por interferência de RNA afeta a formação de tumoresferas em passagens seriadas, ou seja, a formação de tumoresferas secundárias e terciárias. Inesperadamente, nós observamos uma redução no número de tumoresferas primárias para o número de tumoresferas secundárias em células transfectadas com siRNA controle. Além disso, também não esperávamos que células transfectadas com siKRAS ou siIKKβ formassem mais tumoresferas secundárias do que tumoresferas primárias. Entretanto, antes de tirarmos conclusões definitivas, vale lembrar que este experimento foi feito apenas uma vez e deve ser repetido. De qualquer forma, em linhas gerais, é possível perceber que o efeito da inibição da expressão de IKKβ afeta a biologia destas células, onde mesmo após quase 50 dias de experimento em células transfectadas com siKRAS ou siIKKβ é possível perceber que pouquíssimas tumoresferas se formam. Para avaliarmos estatisticamente a redução do

número de tumoresferas para cada passagem seriada fizemos também um gráfico mostrando a redução do número de tumoresferas formadas para cada condição com base na porcentagem do seu respectivo controle. (Figura 5.19C). Desta forma, quando comparamos a redução do número de tumoresferas primárias e a redução do número de tumoresferas terciárias, podemos perceber que células transfectadas com siKRAS e siIKKβ apresentam, em ambos os casos, uma diminuição de cerca de 70% na capacidade de formar tumoresferas, sugerindo que, de fato, inibição de IKKβ afeta a capacidade de autorrenovação de CITs pulmonares com mutação em KRAS (Figura 5.19C). É importante lembrar que a transfecção com siRNAs é feita apenas uma vez antes do plaqueamento da cultura primária e que para cada passagem seriada o mesmo número de células é plaqueado para cada condição experimental.

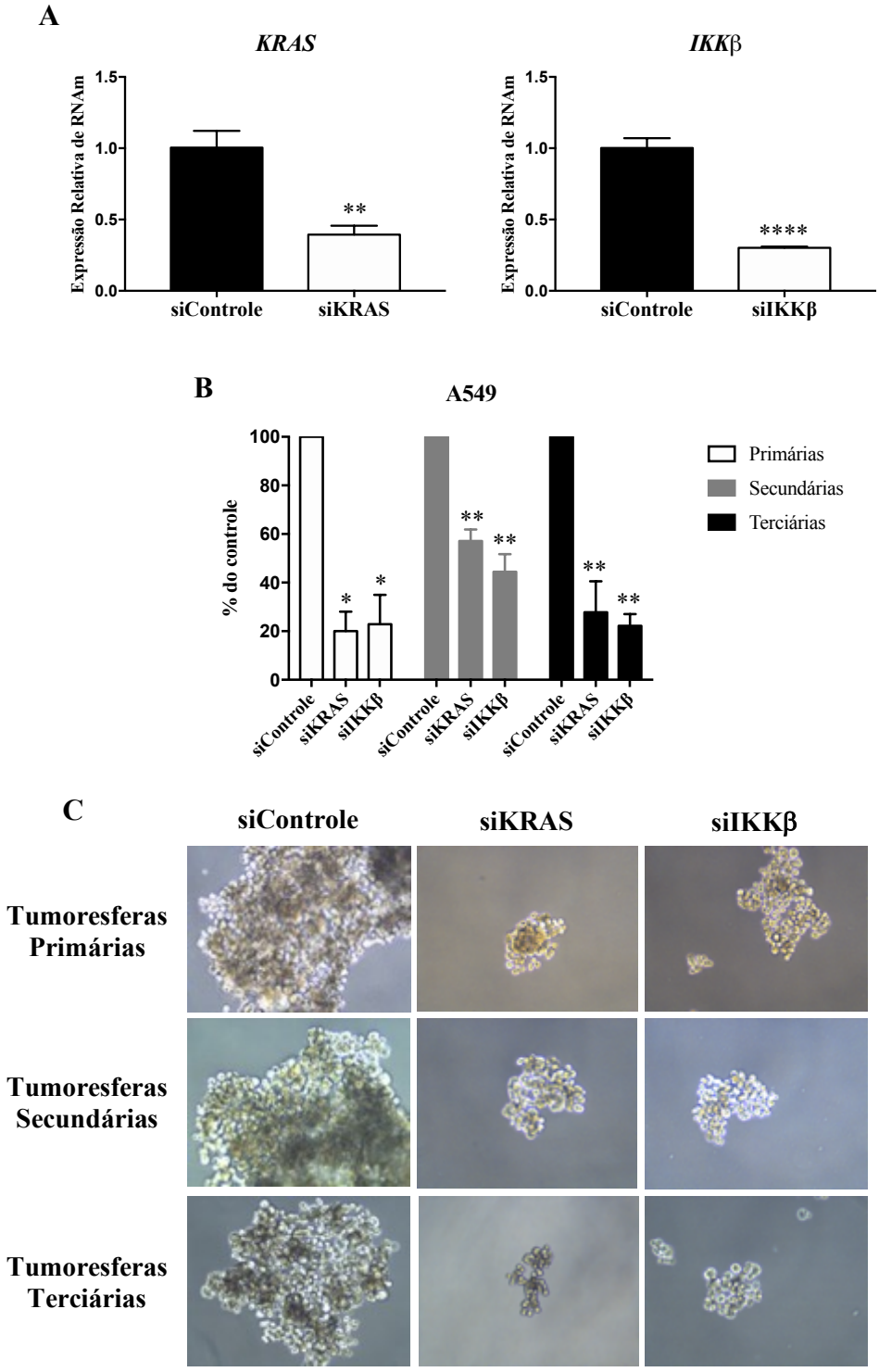


Figura 5.19. Inibição genética de IKKβ e KRAS por interferência de RNA em células da linhagem A549 diminui a formação e autorrenovação de tumoresferas. (A) Validação da inibição da expressão de KRAS e IKKβ por siRNA através de qPCR. O gene *ACTB* (que codifica para β-Actina) foi utilizado como controle endógeno na normalização da expressão. Os asteriscos indicam **p<0,01 e ****p<0,0001 de acordo com o teste *student-t*. (B) 72h após a transfecção, 1000 células da linhagem A549 foram plaqueadas por poço em placas de 6 poços de baixa aderência e cultivadas por 14 dias (tumoresferas primárias). As tumoresferas formadas foram contadas, dissociadas e cultivadas por mais 14 dias (tumoresferas secundárias) e da mesma forma para tumoresferas terciárias. Os asteriscos indicam *p<0,05 e **p<0,01 de acordo com o teste *ANOVA*. A comparação estatística foi realizada sempre entre o mesmo grupo (por exemplo, siKRAS e siIKKβ de tumoresferas primárias são comparados com siControle de tumoresferas primárias). (C) Imagens representativas do experimento.

Embora não tenhamos conseguido reproduzir o ensaio de autorrenovação na linhagem H358 devido ao baixo número de tumoresferas formadas, o que impossibilitou plaquear o mesmo número de células para formação de tumoresferas secundárias, foi possível observar que a inibição da expressão de KRAS e IKKβ também leva a uma redução significativa na formação de tumoresferas primárias (Figura 5.20).

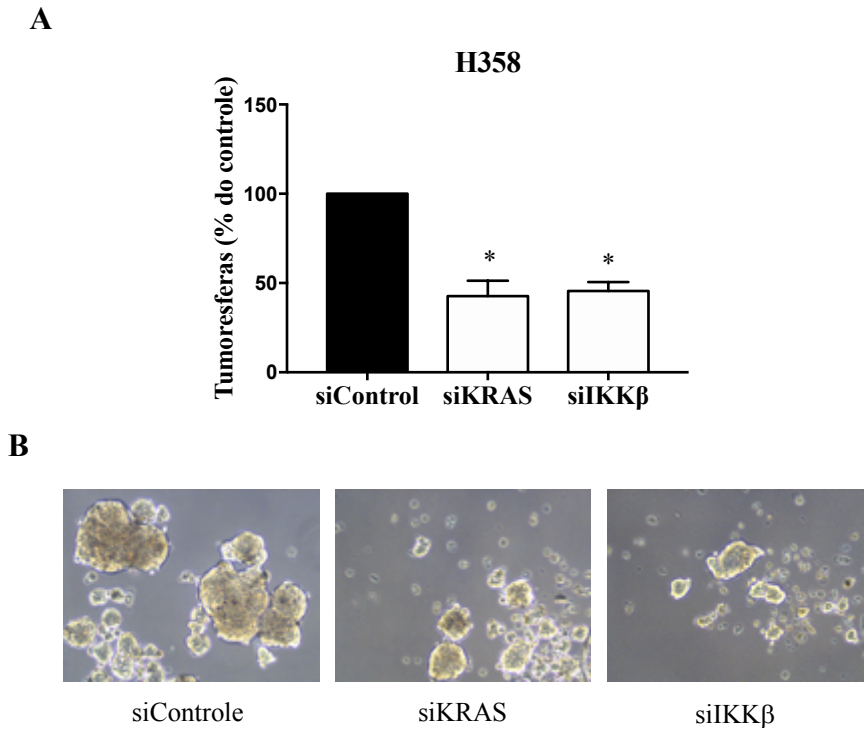


Figura 5.20. Inibição genética de IKKβ e KRAS por interferência de RNA em células da linhagem H358 diminui a formação de tumoresferas. (A) 72h após a transfecção, 1000 células da linhagem H358 foram plaqueadas por poço em placas de 6 poços de baixa aderência e cultivadas por 14 dias (tumoresferas primárias). As tumoresferas formadas foram contadas e o gráfico representado. Os asteriscos indicam *p<0,05 de acordo com o teste *ANOVA*. **(B)** Imagens representativas do experimento.

5.6. Identificação de marcadores para purificação de CITs nas linhagens A549 e H358

A validação de marcadores de superfície que permitem o enriquecimento de CITs através de uma população de células tumorais heterogêneas é uma abordagem frequentemente utilizada

para ensaios biológicos e funcionais que atuem na caracterização do fenótipo tronco-tumoral **(Visvalder et al., 2012)**. Apesar de termos demonstrado ao longo deste trabalho que a cultura de tumoresferas é, de fato, uma abordagem *in vitro* satisfatória para o enriquecimento de CITs pulmonares (Figuras 5.1–5.3), a purificação de CITs por FACS tornaria este um processo mais rápido e mais eficiente, uma vez que o enriquecimento por marcadores tende a resultar em um maior enriquecimento da população de CITs. Isto, entretanto, depende da identificação de um marcador de superfície (ou uma combinação de marcadores) que permitam o isolamento desta subpopulação de células. Infelizmente, os marcadores de superfície que se encontram enriquecidos em CITs pulmonares ainda são bastante controversos **(Alamgeer et al., 2013)**. Com base nisto, nós resolvemos testar alguns marcadores que já foram descritos na literatura como sendo promissores para o enriquecimento de CITs pulmonares, como CD24 **(Li et al., 2017)** e CD44 **(Leung et al., 2010)**

Interessantemente, nossos resultados sugerem que para a linhagem A549 a dupla marcação CD24/CD44 se mostra enriquecida quando células da cultura aderente são comparadas com células oriundas da cultura de tumoresferas (Figura 5.22A). De acordo com os nossos resultados, o enriquecimento é de 15,66% para 65,87%. Ainda, quando as tumoresferas crescem na presença de Composto A, a marcação por CD24 é reduzida (Figura 5.21A). Ainda, este resultado é complementado pela Figura 5.2, onde mostramos que células A549 derivadas da cultura de tumoresferas expressam maior quantidade de RNAm que codifica para CD24 do que células da cultura aderente. Em conjunto, estes resultados sugerem que CD24 é um marcador promissor para CITs na linhagem A549.

Por outro lado, para a linhagem H358 nós encontramos que CD44 se mostra enriquecido em células oriundas da cultura de tumoresfera (Figura 5.21B). Entretanto, este resultado deve ser repetido com um maior número de eventos para se obter um maior grau de confiança nos

dados e não foi realizado ainda devido ao baixo número de células que são recuperadas após a cultura de tumoresferas com esta linhagem.

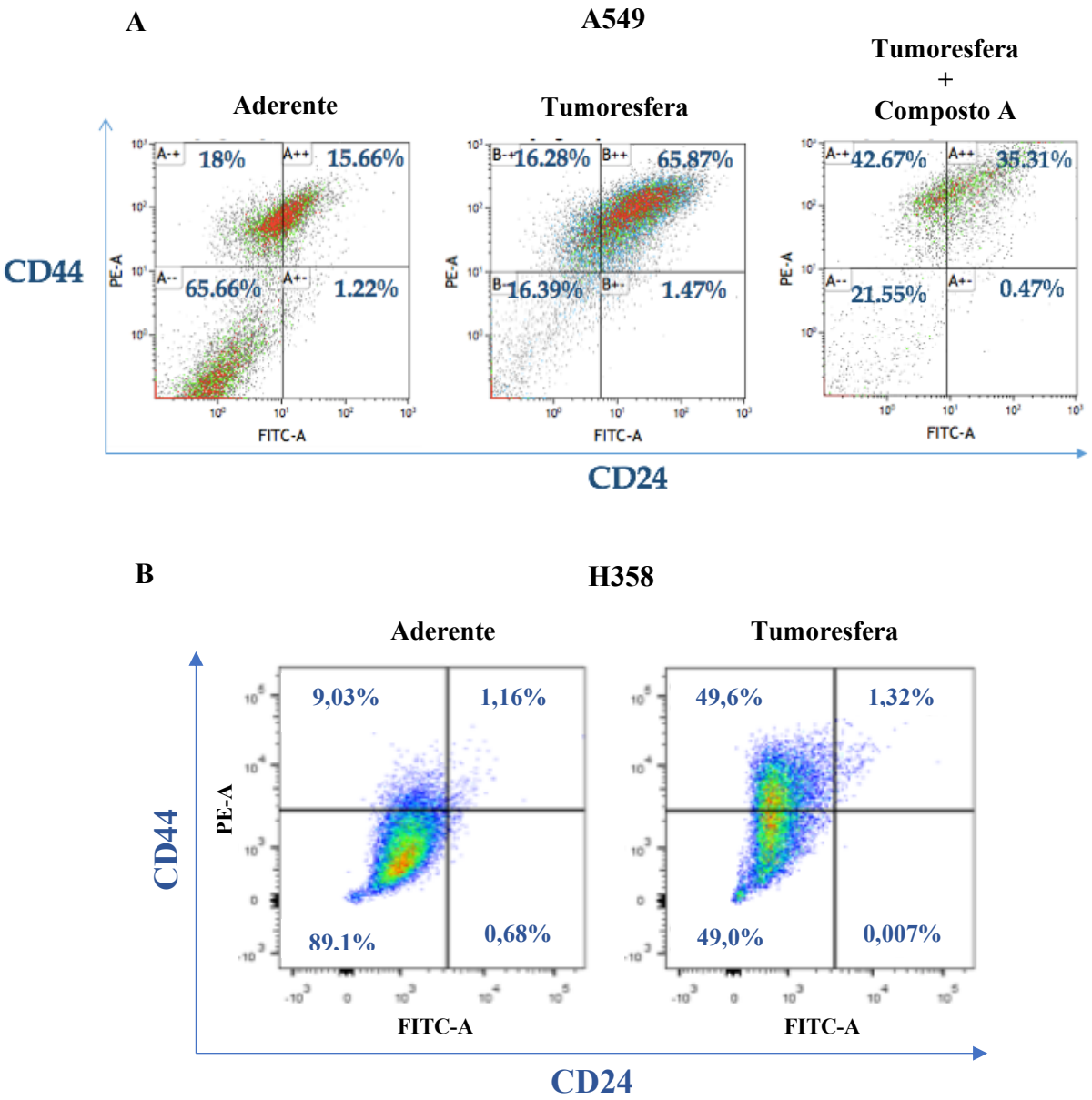


Figura 5.21. Células A549 oriundas da cultura de tumoresferas apresentam enriquecimento de células positivas para o marcador CD24 e células H358 oriundas da cultura de tumoresferas apresentam enriquecimento de células positivas para o marcador CD44. (A) Células A549 oriundas da cultura aderente ou da cultura de tumoresferas (com ou sem Composto A) foram avaliadas para os marcadores CD24 e CD44 por citometria de fluxo. **(B)** Células H358 oriundas da cultura aderente ou da cultura de tumoresferas foram avaliadas para os marcadores CD24 e CD44 por citometria de fluxo. Os eixos representam o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para CD24 ou CD44 usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas foi determinado arbitrariamente utilizando células A549 e H358 não marcadas como referência negativa. A porcentagem de células positivas para cada marcador de superfície está indicada.

5.7. Inibição da atividade de IKKβ e EGFR/ERBB2 reduz a migração celular de células de adenocarcinoma pulmonar com mutação em *KRAS*

Uma das propriedades mais importantes na oncogênese é a aquisição de capacidade metastática tumoral. Vários estudos já têm demonstrado que a aquisição de propriedades migratórias e invasivas estão estritamente relacionadas à aquisição de um fenótipo tronco-tumoral **(Shiozawa et al., 2013)**. Até este momento, todos os nossos resultados apoiam a nossa hipótese de que IKKβ desempenha um papel importante na biologia de CITs pulmonares induzidas por KRAS. Portanto, seria lógico propor que a IKKβ possa estar envolvida na aquisição de capacidade metastática. Além disso, a IKKβ é um ponto central na ativação da via canônica do NF-κB, que por sua vez está envolvida na capacidade de promover metástase em diferentes modelos tumorais. Desta forma, como células tumorais metastáticas apresentam capacidade migratória aumentada, nós resolvemos avaliar, por ensaios de *wound-healing*, como a inibição farmacológica da quinase IKKβ afeta a migração de células A549 e H358. De acordo com a nossa hipótese, o tratamento com Composto A na linhagem A549 inibe a migração celular de forma dose-dependente na linhagem A549 (Figura 5.22A, C). Para as células H358, a redução da migração é mais evidente em altas concentrações de Composto A (como em 10 μM) (Figura 5.22B).

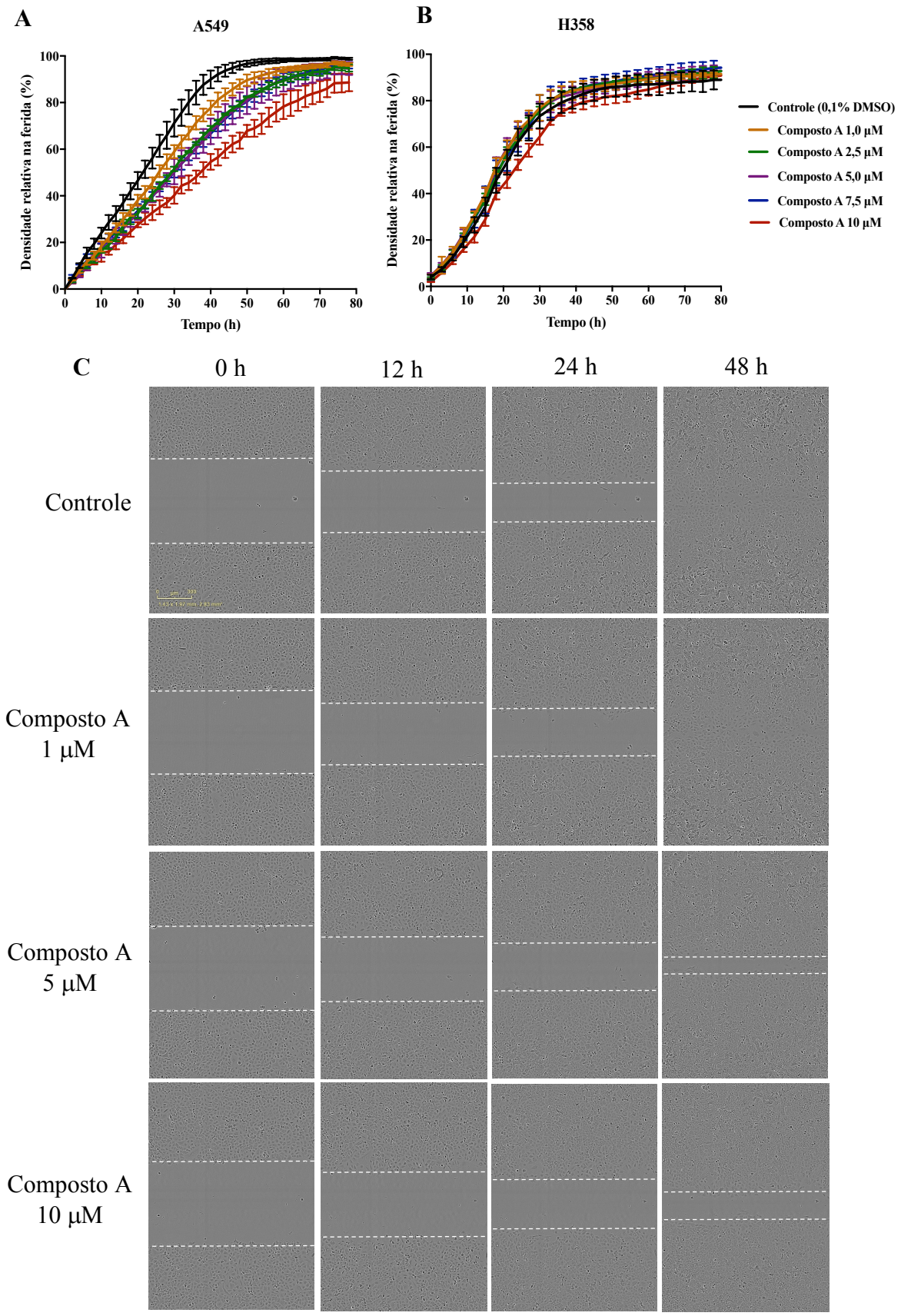


Figura 5.22. Inibição da atividade de IKKβ reduz a migração de células A549 e H358 por experimento de wound-healing. (A) 5,0x10^4 células da linhagem A549 e **(B)** 7,5x10^4 células da linhagem H358 foram plaqueadas em placas de 96 poços. A ferida foi feita com o equipamento *IncuCyte® WoundMaker* e as células foram tratadas com DMSO 0,1% (controle) ou diferentes concentrações de Composto A (1–10 µM). A migração celular foi avaliada por imageamento ao vivo através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* por cerca de 80 horas e representada nos gráficos pelos valores de densidade relativa na ferida. **(C)** Imagens representativas do experimento mostrado no painel A.

Posteriormente, nós resolvemos avaliar como a inibição combinada de IKKβ e EGFR/ERBB2 afeta a migração das células A549 e H358. Assim como nos ensaios de proliferação celular, nossos resultados mostram que há um efeito combinado na redução da migração celular (Figura 5.23). Embora estas linhagens sejam portadoras de mutação em KRAS, inibição de sinais *upstream* (EGFR/ERBB2) ainda afetam processos dependentes da via de RAS e este efeito é potencializado com a inibição de um alvo *downstream* (IKKβ).

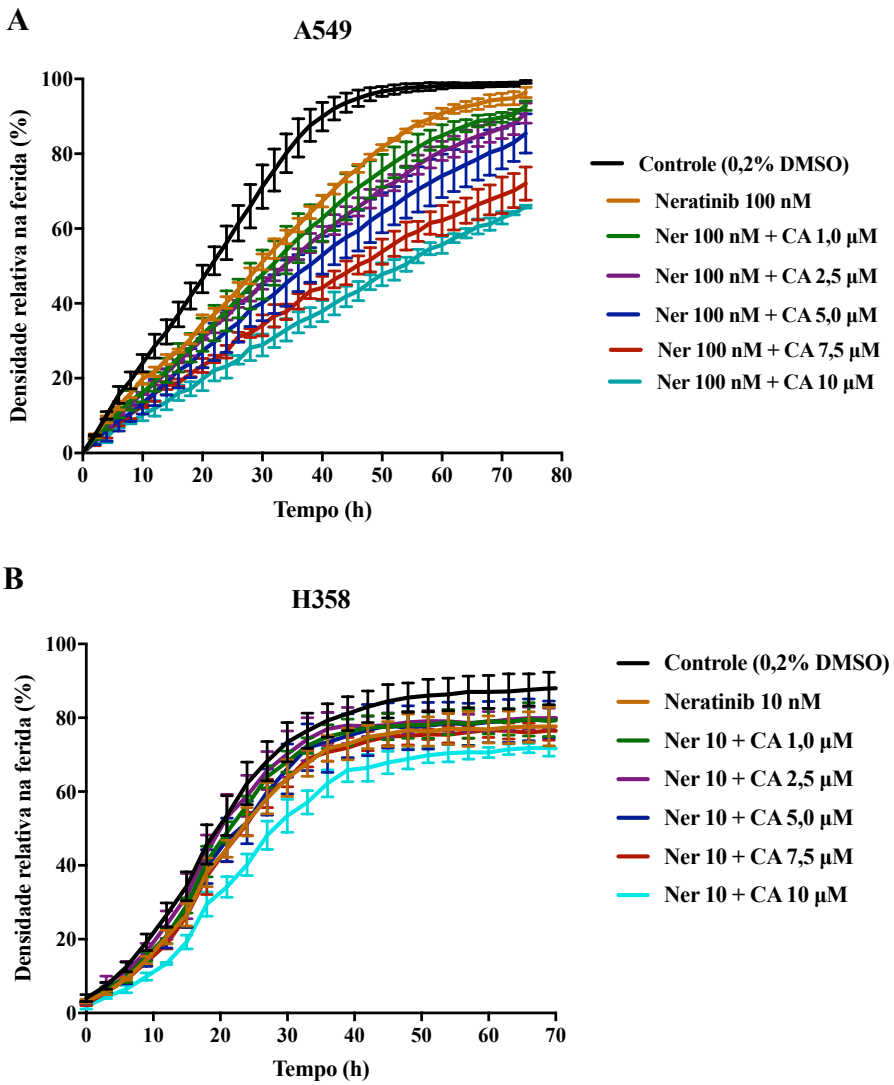


Figura 5.23. Inibição combinada da atividade de IKKβ e EGFR/ERBB2 reduz a migração de células A549 e H358 por experimento de wound-healing. (A) $5{,}0 \times 10^4$ células da linhagem A549 e **(B)** $7{,}5 \times 10^4$ células da linhagem H358 foram plaqueadas em placas de 96 poços. A ferida foi feita com o equipamento *IncuCyte® WoundMaker* e as células foram tratadas com DMSO 0,2% (controle) ou diferentes concentrações de Composto A (1–10 µM) com Neratinib (10 ou 100 nM). A migração celular foi avaliada por imageamento ao vivo através do equipamento *IncuCyte® Live-Cell Analysis System* por cerca de 70-80 horas e representada nos gráficos pelos valores de densidade relativa na ferida.

5.8. Inibição das vias da MAPK e da PI3K não afeta a atividade da quinase IKKβ em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS*

Finalmente, nós nos propusemos a investigar qual o mecanismo molecular que regula a atividade da quinase IKKβ em linhagens de adenocarcinoma pulmonar humano portadoras de mutação em KRAS. Alguns trabalhos sugerem que as vias RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT convergem para a ativar o complexo IKK **(Xia et al., 2014)**. Além disso, também há evidências de que o efetor de RAS, RAL-GDS, pode estar envolvido nesta ativação através da proteína TBK1 **(Xia et al., 2014)**, responsável por ativar o NF-κB. Por fim, foi demonstrado em câncer de pâncreas que RAS ativa o complexo IKK através da estabilização do complexo TAB1/TAK por GSK3α **(Bang et al., 2013)**. Com base nisto, nós utilizamos Trametinib, um inibidor de MEK, e NVP-BEZ235, um inibidor dual PI3K/mTOR para investigar se estas duas vias são capazes de regular a atividade de IKKβ. Nós mostramos que Trametinib inibe, de fato, a fosforilação de ERK e que NVP-BEZ235 inibe a fosforilação de AKT (Figura 5.24). Entretanto, não observamos nenhuma mudança na fosforilação de IκBα, indicando que a atividade de IKKβ não foi afetada pela inibição destas vias (Figura 5.24). Portanto, nossos resultados sugerem que em células A549 e H358 a atividade de IKKβ independe das vias RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT.

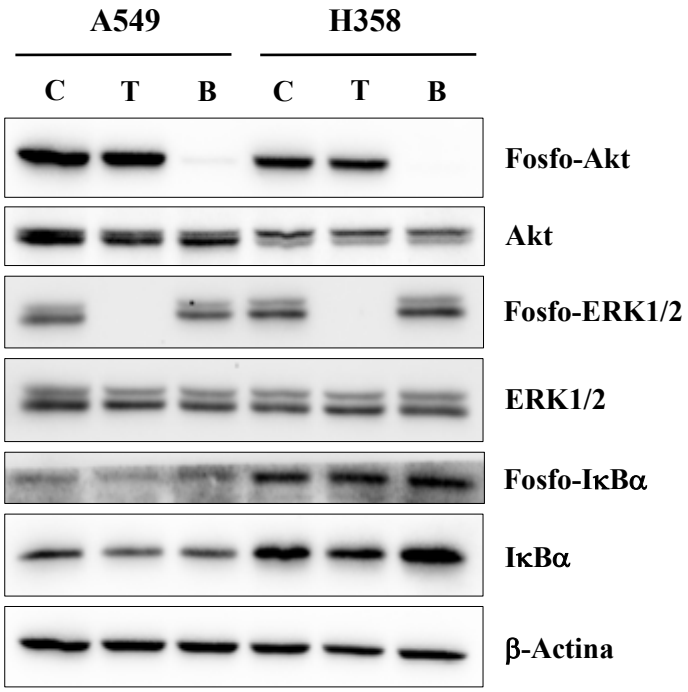


Figura 5.24. Atividade de IKKβ independe das vias da MAPK e PI3K em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS. $5x10^5$ células da linhagem A549 e H358 foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com 0,1% DMSO (C), 500 nM de Trametinib (T) ou 100 nM de NVP-BEZ235 (B) por 30 minutos e lisadas para extração de proteínas. 50 μg de proteínas totais foram utilizadas e avaliadas por Western Blot para a atividade de IKKβ. Os anticorpos utilizados estão indicados ao lado direito.

6. DISCUSSÃO

As alterações genéticas mais frequentes em câncer de pulmão são mutações pontuais que ativam o oncogene *KRAS*. Pacientes oncológicos portadores de mutação em *KRAS* até hoje não foram beneficiados com terapias molecularmente dirigidas, uma vez que a inibição direta da atividade de KRAS tem se mostrado um enorme desafio e apresentado pouca eficácia terapêutica na clínica **(Cox et al., 2014)**. Uma abordagem alternativa baseia-se na elucidação dos mecanismos moleculares induzidos por KRAS que contribuem para o fenótipo maligno a fim de se inibir KRAS indiretamente. Neste contexto, já foi demonstrado que KRAS ativa o NF-κB para promover a tumorigênese pulmonar e que esta ativação depende da quinase IKKβ **(Bassères et al., 2010)**. Adicionalmente, alguns grupos têm demonstrado que a inibição da quinase IKKβ diminui a proliferação de células tumorais pulmonares, reduz o volume tumoral e previne a progressão do câncer de pulmão para graus histológicos mais avançados **(Bassères et al., 2014; Xia et al., 2012)**. Entretanto, existem outras propriedades oncogênicas relevantes que limitam a melhora na sobrevida de pacientes com câncer de pulmão, como a aquisição de um fenótipo tronco-tumoral pelas células iniciadoras de tumor (CITs).

O modelo das células iniciadoras de tumor sugere uma organização celular hierárquica, na qual células tumorigênicas (CITs) são capazes de autorrenovação e de "se diferenciarem" em células não-tumorigênicas (não-CITs) **(Visvalder et al., 2012)**. De fato, vários trabalhos em câncer de pulmão demonstram que CITs são responsáveis pela tumorigênese, invasão e metástase, resistência à terapia e recidiva tumoral **(O'Flaherty et al., 2012; Alison et al., 2012; Levina et al., 2010; Liu et al., 2013; Barr et al., 2013)**. Desta forma, a identificação das diferenças funcionais e fenotípicas entre CITs e as demais células tumorais é capaz de trazer informações extremamente relevantes para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

Embora se saiba que KRAS desempenha um papel importante na manutenção e expansão de um fenótipo tronco-tumoral **(Mani et al., 2008; Kim et al., 2015; Kim et al., 2010; Jiang**

et al., 2014; Ali et al., 2016), pouco se sabe sobre seu papel no contexto de CITs pulmonares. Sendo a IKKβ um alvo de KRAS e uma vez que desempenha um papel importante na biologia de CITs mamárias e de próstata (**Kendellen et al., 2013; Zhang et al., 2016)**, nós nos propusemos a investigar se esta é uma via que contribui para a manutenção de um fenótipo tronco-tumoral no epitélio pulmonar e se este mecanismo molecular pode ser abordado terapeuticamente visando a eliminação destas CITs.

A hipótese central do nosso trabalho é de que a quinase IKKβ contribui para o fenótipo tronco-tumoral induzido por KRAS em câncer de pulmão. Desta forma, nós nos propusemos a avaliar se a inibição de IKKβ afeta a expressão de marcadores de CITs em células A549 e H358 (*Objetivo Específico 1*). Para isto, nós tivemos que, inicialmente, validar que a nossa cultura de tumoresfera está, de fato, enriquecendo para CITs pulmonares.

Uma abordagem comumente utilizada que tem sido promissora para o enriquecimento de CITs pulmonares em diferentes trabalhos se baseia na cultura de células em placas de baixa aderência com meio definido de células-tronco, denominada cultura de tumoresferas **(Eramo et al., 2008; Ali et al., 2016)**. Assim como mostramos neste trabalho, diferentes grupos já evidenciaram que este ensaio *in vitro* enriquece para células com diferenças funcionais e fenotípicas que se alinham ao que conhecemos como CITs. Nós mostramos que células de adenocarcinoma pulmonar induzidas por KRAS derivadas da cultura de tumoresfera apresentam maior expressão de genes associados a um fenótipo tronco e possuem maior crescimento clonogênico quando comparadas as células derivadas da cultura aderente (Figuras 5.2 e 5.3). Ali e colaboradores demonstraram que as células A549 e H358, as mesmas que utilizamos neste trabalho, formam tumoresferas enriquecidas para CITs também através da maior expressão de genes de *stemness* e maior crescimento clonogênico. Adicionalmente, eles elegantemente constatam que 100 células derivadas da cultura de tumoresferas são capazes de formar tumores em 5 de 5 animais, enquanto que 1 milhão de células derivadas da cultura

aderente formam tumores em apenas 3 de 5 animais **(Ali et al., 2016)**. Este resultado, portanto, apoia as nossas observações de que a cultura de tumoresferas realmente enrique para células mais tumorigênicas.

Uma vez que CITs possuem fenótipo tronco, um alvo anti-CITs deve, portanto, afetar negativamente a manutenção deste fenótipo através da redução da expressão de genes de *stemness*, da capacidade de autorrenovação e afetar a capacidade destas células de resistirem a drogas convencionais. Diminuir a expressão de genes de *stemness* leva a um fenótipo mais diferenciado e, desta forma, menos resistente e agressivo. De fato, um estudo elegante recente demonstrou que CITs de vários tumores primários apresentam baixa expressão da variante de histona H1.0 e que reconstituir a expressão de H1.0 nestas células inibe autorrenovação e leva a um fenótipo não-tronco, ou seja, mais "diferenciado" **(Torres et al., 2016)**. Neste contexto, nós demonstramos que inibição da atividade da IKKβ com Composto A leva à uma redução na expressão dos genes marcadores de CITs que se encontravam enriquecidos na cultura de tumoresfera (Figura 5.5). Este resultado é importante uma vez que a superexpressão de vários destes genes está relacionada a maior resistência à terapia e metástase, como é o caso de BMI-1 e CXCR4 **(Chatterjee et al., 2014; Paranjape et al., 2014)**. Adicionalmente, este resultado é consistente com a capacidade do NF-κB de regular a transcrição de genes que estão relacionados ao fenótipo tronco, como *SOX2* e *NANOG* **(Rinkenbaugh e Baldwin, 2016)**. Nosso experimento de inibição da expressão de IKKβ na linhagem A549 (Figura 5.6) vai de acordo com as observações realizadas pela inibição farmacológica.

Em nosso *Objetivo Específico 2*, nós nos propusemos a avaliar como a inibição da quinase IKKβ afeta a formação de tumoresferas. O ensaio de formação de tumoresferas é um experimento *in vitro* capaz de avaliar a atividade de CITs, uma vez que o número de tumoresferas formadas é proporcional ao número de CITs na população celular **(Cao et al., 2011)**. Entretanto, para avaliarmos se determinado tratamento está, de fato, reduzindo a

população de CITs na cultura não podemos utilizar concentrações que causam grande morte celular, pois obviamente menos esferas seriam formadas em decorrência das células que estão morrendo, e não porque o tratamento realmente afeta/reduz o número de CITs. Com isto em mente, nós mostramos que o tratamento com Composto A praticamente não causa morte celular na linhagem A549 (cerca de 0,5% na maior concentração, 10 μM) e causa pouca morte celular na linhagem H358, onde cerca de 10% da população morre naturalmente em cultura (Figura 5.11). A partir daí nós plaqueamos células para formação de tumoresferas na presença de Composto A e observamos que menos tumoresferas são formadas de forma dose-dependente (Figura 5.12). Este resultado sugere que a inibição da atividade de IKKβ afeta o número de CITs em cultura.

Novamente, fizemos uso da técnica de interferência de RNA para avaliarmos se a inibição da expressão de IKKβ também afeta a formação de tumoresferas. Isto é verdade para ambas as linhagens e também quando inibimos a expressão de KRAS (Figuras 5.19 e 5.20). Nós também demonstramos que a inibição da expressão de KRAS e IKKβ reduz a autorrenovação de tumoresferas geradas a partir das células A549 (Figura 5.19). Interessantemente, o *knock-down* de KRAS afetou a formação de tumoresferas e autorrenovação no mesmo grau que o *knock-down* de IKKβ, podendo isto sugerir que a ativação de IKKβ por KRAS possa ser a via mais crítica para a manutenção do fenótipo tronco-tumoral destas CITs pulmonares.

Interessantemente, um estudo recente demonstrou que a inibição da expressão de PKCι em células de adenocarcinoma pulmonar com mutação em KRAS diminui o crescimento de tumoresferas, a eficiência da expansão clonogênica e o potencial tumorigênico de células A549 e H358 derivadas da cultura de tumoresferas **(Ali et al., 2016)**. Adicionalmente, este grupo demonstra que 50 mil células derivadas da cultura de tumoresfera não são capazes de formar tumores em camundongos imunodecificientes quando a expressão de PKCι é inibida **(Ali et al., 2016)**. Este pode ser um resultado relevante para nós, uma vez que tem sido demonstrado que

PKCι é capaz de fosforilar IKKβ através da ativação mediada por TNFα **(Win e Acevedo-Duncan, 2008)**.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, algumas evidências indicando que a tumorigênese induzida por KRAS depende da ativação por retroalimentação positiva de vias *upstream* à KRAS **(Kruspig et al., 2018; Moll et al., 2018)** nos motivaram a adicionar um outro objetivo específico, que envolveu investigar a contribuição de EGFR e ERBB2 para a formação de tumoresferas de células de adenocarcinoma pulmonar humano induzidas por KRAS. Adicionalmente, nos propusemos a investigar se a inibição combinada (de um regulator *upstream* e um efetor *downstream* de KRAS) possui maior efeito na formação de tumoresferas.

O conceito de que mutações pontuais no oncogene KRAS levam à síntese de uma proteína que fica presa no estado ativo (ou ligado ao GTP) perdurou por muitos anos. Acreditava-se que por estar em um estado constitutivamente ativo, KRAS conferia independência de sinais *upstream* para ativação de vias de sinalização *downstream*. Entretanto, estudos recentes vêm redefinindo os mecanismos de ativação oncogênica das proteínas RAS. Dois estudos pré-clínicos independentes mostraram que KRAS necessita da ativação de ligantes *upstream* para promover a tumorigênese pulmonar **(Kruspig et al., 2018; Moll et al., 2018)**. Estes estudos mostraram que KRAS apresenta um mecanismo de retroalimentação através da regulação positiva da expressão de proteínas ligantes dos receptores tirosina-quinase ERBB, como epirregulina e anfirregulina **(Kruspig et al., 2018; Moll et al., 2018)**. Desta forma, uma vez que a via *upstream* de KRAS tem se mostrado relevante na tumorigênese pulmonar, nós resolvemos avaliar se EGFR e ERBB2 também desempenham um papel relevante na biologia destas CITs pulmonares.

Nos ensaios de proliferação celular nós percebemos que as células H358 são muito mais sensíveis ao tratamento com Neratinib e, por isto, nós utilizamos concentrações mais baixas do que as utilizadas para as células A549. Nós hipotetizamos que esta sensitividade pode ser

consequência do perfil genético desta linhagem: células H358 possuem mutação em KRAS em heterozigose, o que significa que uma cópia do cromossomo leva à síntese de KRAS selvagem, que por sua vez responde melhor aos seus sinais *upstream* (EGFR/ERBB2) do que KRAS mutada. Uma vez que células A549 possuem KRAS mutada em homozigose, estas células dependem menos dos sinais *upstream* a KRAS e, portanto, são mais resistentes a Neratinib.

Adicionalmente, nós avaliamos se a inibição combinada de IKKβ e EGFR/ERBB tem algum efeito na morte celular das linhagens A549 e H358. Para a maioria das concentrações utilizadas de Composto e Neratinib foi possível observar efeitos aditivos na morte celular da linhagem A549, sendo que em algumas concentrações mais elevadas a inibição combinada destes alvos resultou em efeito sinérgico, enquanto que para a linhagem H358 não foi observado efeito aditivo nem sinérgico (Figura 5.17). Mais uma vez, esta diferença pode estar relacionada ao perfil de mutações específicas para esta linhagem. É importante lembrar que alguns trabalhos vêm mostrando que variantes oncogênicas de KRAS possuem diferentes propriedades bioquímicas e tumorigênicas e que, portanto, podem causar perfis de respostas a inibidores totalmente diferentes **(Prior et al., 2012; Hunter et al., 2015)**. Este é o caso aqui, uma vez que a mutação em KRAS encontrada em células A549 é $KRAS^{G12S}$ e em H358 é $KRAS^{G12C}$. De qualquer forma, para ambas as linhagens o tratamento combinado de Composto A e Neratinib teve efeito aditivo na capacidade de formar tumoresferas, sugerindo que IKKβ e EGFR/ERBB possam regular o fenótipo tronco-tumoral nestas células por vias de sinalização distintas.

Diversos trabalhos mostram que as vias de sinalização reguladas pelas RTKs contribuem para a ativação do NF-κB para promoção de um fenótipo tronco-tumoral e de maior resistência à terapia **(Yang et al., 2012; Jiang et al., 2011; Blakely et al., 2015; Hinohara et al., 2012)**. Interessantemente, quando um alvo *upstream* (EGFR/ERBB2) e um alvo *downstream* de KRAS (IKKβ) são inibidos nós observamos um efeito aditivo na formação de tumoresferas (Figura 5.18) e na migração celular (Figura 5.23). Desta forma, nós podemos considerar duas hipóteses:

1) é provável que EGFR/ERBB2 ative NF-κB de maneira independente de IKKβ ou 2) que os efeitos observados são consequência de outros substratos de IKKβ que são NF-κB-independentes. Nossos resultados indicam que EGFR/ERBB2 não regulam a atividade da quinase IKKβ em células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS, uma vez que o tratamento com Neratinib não causou mudanças na fosforilação de IKKβ (Figura 5.9). Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de alguns dos efeitos observados serem consequência de outros alvos de IKKβ.

Finalmente, nós nos dedicamos a avaliar se a quinase IKKβ desempenha um papel importante para manutenção do fenótipo tronco-tumoral das CITs pulmonares portadoras de mutação em *KRAS* (*Objetivo Específico 3*).

De uma forma ou de outra, IKKβ parece desempenhar um papel importante em CITs, uma vez que células derivadas da cultura de tumoresferas possuem maior atividade da IKKβ (Figura 5.4). Entretanto, este não é um resultado surpreendente. Embora a IKKβ possa fosforilar outros substratos **(Xia et al., 2009; Sakamoto et al., 2013; Hu et al., 2004)**, é muito provável que boa parte da atividade de IKKβ em CITs pulmonares deva estar relacionada à várias propriedades que o NF-κB desempenha na manutenção do fenótipo tronco. Rinkenbaugh e colaboradores demonstraram que células de glioblastoma CD133 positivas, um marcador de superfície bem caracterizado para CITs nestes tumores, possuem maior fosforilação de p65, que é um indício de maior atividade transcricional de NF-κB, bem como a fosforilação de IκBα **(Rinkenbaugh et al., 2016)**.

Para avaliar se inibição de IKKβ é realmente uma estratégia anti-CITs nós comparamos o crescimento clonogênico de células aderentes tratadas com Composto A e de tumoresferas crescidas na presença de Composto A. De fato, o crescimento clonogênico de células derivadas da cultura de tumoresferas é muito menor do quando comparado à condição controle, enquanto

que células derivadas da cultura aderente possuem o mesmo grau de clonogenicidade (Figura 5.7). Em células derivadas da cultura aderente, o tamanho das colônias foi menor (Figura 5.7), condizente com trabalhos que abordam o efeito anti-proliferativo da inibição de IKKβ em células tumorais induzidas por KRAS **(Bassères et al., 2014; Xia et al., 2012)**. Para complementar estes resultados, nós realizamos ensaios de proliferação celular por imageamento ao vivo e, de fato, a proliferação de células oriundas da cultura de tumoresfera são preferencialmente afetadas pela inibição de IKKβ (Figura 5.8). Um resultado também obtido neste ensaio é de que células derivadas da cultura de tumoresferas possuem menor taxa de proliferação celular. Esta observação está de acordo com dados na literatura que mostram que CITs são menos proliferativas do que células não-CITs, e por isso são mais resistentes a quimioterápicos, que tem como alvo células de alta taxa de proliferação **(Holohan et al., 2013; Advani et al., 2015; Lau et al., 2015; Liau et al., 2017)**.

Nós também observamos que a inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA diminui a capacidade de autorrenovação de células oriundas da cultura de tumoresferas na linhagem A549 (Figura 5.19). Uma vez que a capacidade de autorrenovação é uma característica marcante de CITs **(Li et al., 2007; Visvader e Lindeman, 2012)**, este resultado sugere que IKKβ possui a capacidade de regular esta propriedade. Embora saibamos que a inibição por siRNA é transiente, o efeito na capacidade de autorrenovação observado persistiu ao longo de quase cinquenta dias de experimento. Portanto, se inibição genética de IKKβ é capaz de reduzir a autorrenovação de células derivadas da cultura de tumoresferas, nós concluímos que, de fato, IKKβ desempenha um papel importante para manutenção do fenótipo tronco-tumoral das CITs pulmonares portadoras de mutação em *KRAS*.

Desde o início deste trabalho tivemos como foco a identificação de um marcador de superfície que pudesse permitir a rápida purificação de células com o fenótipo tronco por citometria de fluxo. Entretanto, tais marcadores ainda são bastante controversos para tumores

pulmonares **(Alamgeer et al., 2013)** e muitas vezes nos deparamos com resultados conflitantes aos encontrados na literatura. Com o objetivo de validar um marcador dentro do nosso laboratório, nós mostramos que CD24 e CD44 estão enriquecidos em células derivadas da cultura de tumoresferas de células A549 e H358, respectivamente (Figura 5.22). A maior prova de que estas são, de fato, CITs deve vir através de ensaios de formação de tumoresferas e ensaios para avaliar a oncogenicidade destas células purificadas em camundongos imunodeficientes. Embora estes resultados sejam promissores, nosso laboratório recentemente começou a investigar também a possibilidade de utilizar o marcador CD90 (Thy-1) na purificação de CITs pulmonares. CD90 é uma glicoproteína expressa principalmente em leucócitos e está envolvida em interações célula-célula e célula-matriz **(Rege e Hagood, 2006)**. Yan e colaboradores demonstraram que células A549 e H446 $CD90^{+}$ apresentam maior crescimento clonogênico, expressam maiores quantidades de genes como *OCT4* e *SOX2* e são mais tumorigênicas quando comparadas às células A549 e H446 $CD90^{-}$ **(Yan et al., 2013)**.

Uma observação que tem sido bastante relacionada ao fenótipo tronco-tumoral é uma capacidade aumentada de migração celular por células derivadas da cultura de tumoresferas **(Thomas et al., 2014; Ray et al. 2017)**. Embora ainda não tenhamos consigo obter estes dados para nossas células pulmonares, nós demonstramos que inibição da quinase IKKβ diminui a migração de células A549 e H358 derivadas da cultura aderente por ensaios de *wound-healing* (Figura 5.23). Este resultado ainda se mostrou dose-dependente. Adicionalmente, nós combinamos a inibição da atividade de IKKβ com inibição da atividade de EGFR/ERBB2 e percebemos que o efeito observado é aditivo (Figura 5.24). De fato, é interessante que embora KRAS esteja mutada nestas células, inibição de seus reguladores *upstream* inibam migração celular.

Por fim, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares que resultam na ativação de IKKβ por KRAS. Duran e colaboradores demonstraram que esta ativação depende da

proteína adaptadora p62, que por sua vez induz ubiquitinação de TRAF6 **(Duran et al., 2008)**. Enquanto alguns trabalhos sugerem que a via das MAPK atua na ativação do NF-κB através da IKKβ **(Mizumoto et al., 2011; Lin et al., 2012)**, outros apontam que as vias das MAPK e PI3K/Akt convergem para ativação do complexo IKK e, consequentemente, do NF-κB **(Pak e Miyamoto, 2013)**. Adicionalmente, também foi evidenciado que RAS ativa o complexo IKK através de efetores da via RALGEFs **(Chien et al., 2006; Henry et al., 2000; Harris et al., 2006)**. Neste contexto, nós demonstramos que células de adenocarcinoma pulmonar humano com mutação em KRAS independe das vias da MAPK e/ou PI3K/Akt para a atividade de IKKβ.

7. CONCLUSÕES

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

a. A cultura de tumoresferas das linhagens A549 e H358 leva ao enriquecimento de uma população com fenótipo tronco-tumoral e com maior atividade da quinase IKKβ;
b. A inibição farmacológica de IKKβ em células A549 e H358 reduz a expressão de genes marcadores de CITs;
c. A inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA em células A549 reduz a expressão de genes marcadores de CITs;
d. A inibição farmacológica de EGFR/ERBB2 causa pouca morte celular, reduz a proliferação e diminui a formação de tumoresferas em células A549 e H358;
e. Inibição farmacológica combinada de IKKβ e de EGFR/ERBB2 tem efeito aditivo e sinérgico na morte celular de células A549 (dependendo da concentração dos inibidores) e tem efeito aditivo na proliferação e formação de tumoresferas em células A549 e H358;
f. Inibição por interferência de RNA de IKKβ reduz a autorrenovação de células A549;
g. Inibição por interferência de RNA de IKKβ reduz a formação de tumoresferas em células H358;
h. O marcador CD24 enriquece para CITs em células A549 e o marcador CD44 enriquece para CITs em células H358;
i. Inibição farmacológica de IKKβ reduz a migração de células A549 e H358;
j. Inibição farmacológica combinada de IKKβ e EGFR/ERBB2 tem efeito aditivo na migração de células A549 e H358;
k. As vias da MAPK e PI3K/Akt não contribuem para a atividade da quinase IKKβ em células A549 e H358.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNZO, M.; ROMANO, G.; NIGITA, G.; VENEZIANO, D.; FATTORE, L.; LAGANÀ, A.; ZANESI, N.; FADDA, P.; FASSAN, M.; RIZZOTTO, L.; KLADNEY, R.; COPPOLA, V.; CROCE, C. M. Selective targeting of point-mutated KRAS through artificial microRNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 21, p. E4203–E4212, 23 maio 2017.

ADVANI, S. J.; CAMARGO, M. F.; SEGUIN, L.; MIELGO, A.; ANAND, S.; HICKS, A. M.; AGUILERA, J.; FRANOVIC, A.; WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Kinase-independent role for CRAF-driving tumour radioresistance via CHK2. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8154, 3 dez. 2015.

AHEARN, I. M.; HAIGIS, K.; BAR-SAGI, D.; PHILIPS, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 39–51, 1 jan. 2012.

AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Cancer stem cells in solid tumors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 460–466, out. 2007.

ALAMGEER, M.; PEACOCK, C. D.; MATSUI, W.; GANJU, V.; WATKINS, D. N. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 18, n. 5, p. 757–64, jul. 2013.

ALI, S. A.; JUSTILIEN, V.; JAMIESON, L.; MURRAY, N. R.; FIELDS, A. P. Protein Kinase Cι Drives a NOTCH3-dependent Stem-like Phenotype in Mutant KRAS Lung Adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 367–378, 14 mar. 2016.

ALISON, M. R.; LIN, W.-R.; LIM, S. M. L.; NICHOLSON, L. J. Cancer stem cells: In the line of fire. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 589–598, out. 2012.

ANDREYEV, H. J. N.; NORMAN, A. R.; CUNNINGHAM, D.; OATES, J.; DIX, B. R.; IACOPETTA, B. J.; YOUNG, J.; WALSH, T.; WARD, R.; HAWKINS, N.; BERANEK, M.; JANDIK, P.; BENAMOUZIG, R.; JULLIAN, E.; LAURENT-PUIG, P.; OLSCHWANG, S.; MULLER, O.; HOFFMANN, I.; RABES, H. M.; ZIETZ, C.; TROUNGOS, C.; VALAVANIS, C.; YUEN, S. T.; HO, J. W. C.; CROKE, C. T.; O'DONOGHUE, D. P.; GIARETTI, W.; RAPALLO, A.; RUSSO, A.; BAZAN, V.; TANAKA, M.; OMURA, K.; AZUMA, T.; OHKUSA, T.; FUJIMORI, T.; ONO, Y.; PAULY, M.; FABER, C.; GLAESENER, R.; GOEIJ, A. F. P. M. de; ARENDS, J. W.; ANDERSEN, S. N.; LÖVIG, T.; BREIVIK, J.; GAUDERNACK, G.; CLAUSEN, O. P. F.; ANGELIS, P. De; MELING, G. I.; ROGNUM, T. O.; SMITH, R.; GOH, H.-S.; FONT, A.; ROSELL, R.; SUN, X. F.; ZHANG, H.; BENHATTAR, J.; LOSI, L.; LEE, J. Q.; WANG, S. T.; CLARKE, P. A.; BELL, S.; QUIRKE, P.; BUBB, V. J.; PIRIS, J.; CRUICKSHANK, N. R.; MORTON, D.; FOX, J. C.; AL-MULLA, F.; LEES, N.; HALL, C. N.; SNARY, D.; WILKINSON, K.; DILLON, D.; COSTA, J.; PRICOLO, V. E.; FINKELSTEIN, S. D.; THEBO, J. S.; SENAGORE, A. J.; HALTER, S. A.; WADLER, S.; MALIK, S.; KRTOLICA, K.; UROSEVIC, N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 5, p. 692–696, 28 ago. 2001.

AVIEL-RONEN, S.; BLACKHALL, F. H.; SHEPHERD, F. A.; TSAO, M.-S. K-ras Mutations in Non-Small-Cell Lung Carcinoma: A Review. **Clinical Lung Cancer**, v. 8, n. 1, p. 30–38, jul. 2006.

BAINES, A. T.; XU, D.; DER, C. J. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 14, p. 1787–1808, out. 2011.

BALDWIN, A. S. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-κB: critical mechanisms in immune function and cancer. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 327–345, mar. 2012.

BANG, D.; WILSON, W.; RYAN, M.; YEH, J. J.; BALDWIN, A. S. GSK-3α Promotes Oncogenic KRAS Function in Pancreatic Cancer via TAK1–TAB Stabilization and Regulation of Noncanonical NF-κB. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 6, p. 690–703, jun. 2013.

BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 18 dez. 2006.

BARBIE, D. A.; TAMAYO, P.; BOEHM, J. S.; KIM, S. Y.; MOODY, S. E.; DUNN, I. F.; SCHINZEL, A. C.; SANDY, P.; MEYLAN, E.; SCHOLL, C.; FRÖHLING, S.; CHAN, E. M.; SOS, M. L.; MICHEL, K.; MERMEL, C.; SILVER, S. J.; WEIR, B. A.; REILING, J. H.; SHENG, Q.; GUPTA, P. B.; WADLOW, R. C.; LE, H.; HOERSCH, S.; WITTNER, B. S.; RAMASWAMY, S.; LIVINGSTON, D. M.; SABATINI, D. M.; MEYERSON, M.; THOMAS, R. K.; LANDER, E. S.; MESIROV, J. P.; ROOT, D. E.; GILLILAND, D. G.; JACKS, T.; HAHN, W. C. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. **Nature**, v. 462, n. 7269, p. 108–112, 21 nov. 2009.

BARR, M. P.; GRAY, S. G.; HOFFMANN, A. C.; HILGER, R. A.; THOMALE, J.; O'FLAHERTY, J. D.; FENNELL, D. A.; RICHARD, D.; O'LEARY, J. J.; O'BYRNE, K. J. Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54193, 17 jan. 2013.

BASSÈRES, D. S.; BALDWIN, A. S. Nuclear factor-κB and inhibitor of κB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6817–6830, 30 out. 2006.

BASSERES, D. S.; EBBS, A.; LEVANTINI, E.; BALDWIN, A. S. Requirement of the NF- B Subunit p65/RelA for K-Ras-Induced Lung Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 70, n. 9, p. 3537–3546, 1 maio 2010.

BASSÈRES, D. S.; EBBS, A.; COGSWELL, P. C.; BALDWIN, A. S. IKK is a therapeutic target in KRAS-induced lung cancer with disrupted p53 activity. **Genes & Cancer**, v. 5, n. 1–2, p. 41, 21 abr. 2014.

BAZAN, V.; MIGLIAVACCA, M.; ZANNA, I.; TUBIOLO, C.; GRASSI, N.; LATTERI, M. A.; LA FARINA, M.; ALBANESE, I.; DARDANONI, G.; SALERNO, S.; TOMASINO, R. M.; LABIANCA, R.; GEBBIA, N.; RUSSO, A. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 13, n. 9, p. 1438–46, set. 2002.

BEG, A. A.; BALTIMORE, D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5288, p. 782–4, 1 nov. 1996.

BERNDT, N.; HAMILTON, A. D.; SEBTI, S. M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 775–791, 1 nov. 2011.

BIRNIE, R.; BRYCE, S. D.; ROOME, C.; DUSSUPT, V.; DROOP, A.; LANG, S. H.; BERRY, P. A.; HYDE, C. F.; LEWIS, J. L.; STOWER, M. J.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. **Genome Biology**, v. 9, n. 5, p. R83, 2008.

BLAKELY, C. M.; PAZARENTZOS, E.; OLIVAS, V.; ASTHANA, S.; YAN, J. J.; TAN, I.; HRUSTANOVIC, G.; CHAN, E.; LIN, L.; NEEL, D. S.; NEWTON, W.; BOBB, K.; FOUTS, T.; MESHULAM, J.; GUBENS, M. A.; JABLONS, D. M.; JOHNSON, J. R.; BANDYOPADHYAY, S.; KROGAN, N. J.; BIVONA, T. G. NF-κB activating complex engaged in response to EGFR oncogene inhibition drives tumor cell survival and residual disease in lung cancer. **Cell reports**, v. 11, n. 1, p. 98, 2015.

BLASCO, R. B.; FRANCOZ, S.; SANTAMARÍA, D.; CAÑAMERO, M.; DUBUS, P.; CHARRON, J.; BACCARINI, M.; BARBACID, M. c-Raf, but Not B-Raf, Is Essential for Development of K-

Ras Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Carcinoma. **Cancer Cell**, v. 19, n. 5, p. 652–663, 17 maio 2011.

BODEMANN, B. O.; WHITE, M. A. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p. 133–140, 1 fev. 2008.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, 1 jul. 1997.

BORIACK-SJODIN, P. A.; MARGARIT, S. M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 337–343, 23 jul. 1998.

BOS, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer research**, v. 49, n. 17, p. 4682–9, 1 set. 1989.

BOUTIN, A. T.; LIAO, W.-T.; WANG, M.; HWANG, S. S.; KARPINETS, T. V.; CHEUNG, H.; CHU, G. C.; JIANG, S.; HU, J.; CHANG, K.; VILAR, E.; SONG, X.; ZHANG, J.; KOPETZ, S.; FUTREAL, A.; WANG, Y. A.; KWONG, L. N.; DEPINHO, R. A. Oncogenic *Kras* drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. **Genes & Development**, v. 31, n. 4, p. 370–382, 15 fev. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BROWN, K.; GERSTBERGER, S.; CARLSON, L.; FRANZOSO, G.; SIEBENLIST, U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 267, n. 5203, p. 1485–8, 10 mar. 1995.

CAO, L.; ZHOU, Y.; ZHAI, B.; LIAO, J.; XU, W.; ZHANG, R.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, L.; QIAN, H.; WU, M.; YIN, Z. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 71, 14 dez. 2011.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 261–274, 1 mar. 2011.

CASTELLANO, E.; SANTOS, E. Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but So Different. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 216–231, 1 mar. 2011.

CHATTERJEE, S.; BEHNAM AZAD, B.; NIMMAGADDA, S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. In: **Advances in cancer research**. [s.l: s.n.]124p. 31–82, 2014.

CHEN, C. C.; ER, T. K.; LIU, Y. Y.; HWANG, J. K.; BARRIO, M. J.; RODRIGO, M.; GARCIA-TORO, E.; HERREROS-VILLANUEVA, M. Computational Analysis of KRAS Mutations: Implications for Different Effects on the KRAS p.G12D and p.G13D Mutations. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 2013. Epub, 20 fev. 2013.

CHEN, Q.; TANG, Z.; YE, Y.-B.; CHEN, Q. NF-κB activity is downregulated by KRAS knockdown in SW620 cells via the RAS-ERK-IκBα pathway. **Oncology Reports**, v. 27, n. 5, p. 1527–34, 2 fev. 2012.

CHEN, Z. J.; PARENT, L.; MANIATIS, T. Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 853–62, 22 mar. 1996.

CHERFILS, J.; ZEGHOUF, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 269–309, jan. 2013.

CHIEN, Y.; KIM, S.; BUMEISTER, R.; LOO, Y.-M.; KWON, S. W.; JOHNSON, C. L.; BALAKIREVA, M. G.; ROMEO, Y.; KOPELOVICH, L.; GALE, M.; YEAMAN, C.; CAMONIS, J. H.; ZHAO, Y.; WHITE, M. A. RalB GTPase-Mediated Activation of the IκB Family Kinase TBK1 Couples Innate Immune Signaling to Tumor Cell Survival. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 157–170, 6 out. 2006.

CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10689–92, 16 abr. 1999.

CLARKE, S. Protein Isoprenylation and Methylation at Carboxyl-Terminal Cysteine Residues. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 355–386, jun. 1992.

CLAUDIO, E.; BROWN, K.; PARK, S.; WANG, H.; SIEBENLIST, U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-κB2 in maturing B cells. **Nature Immunology**, v. 3, n. 10, p. 958–965, 23 out. 2002.

COLLINS, A. T.; BERRY, P. A.; HYDE, C.; STOWER, M. J.; MAITLAND, N. J. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 10946–10951, 1 dez. 2005.

COLLISSON, E. A.; CAMPBELL, J. D.; BROOKS, A. N.; (…) (The Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 543–550, 9 jul. 2014.

COLLISSON, E. A.; TREJO, C. L.; SILVA, J. M.; GU, S.; KORKOLA, J. E.; HEISER, L. M.; CHARLES, R.-P.; RABINOVICH, B. A.; HANN, B.; DANKORT, D.; SPELLMAN, P. T.; PHILLIPS, W. A.; GRAY, J. W.; MCMAHON, M. A Central Role for RAF→MEK→ERK Signaling in the Genesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 8, p. 685–693, ago. 2012.

COOPE, H. J.; ATKINSON, P. G. P.; HUHSE, B.; BELICH, M.; JANZEN, J.; HOLMAN, M. J.; KLAUS, G. G. B.; JOHNSTON, L. H.; LEY, S. C. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. **The EMBO journal**, v. 21, n. 20, p. 5375–85, 15 out. 2002.

CORCORAN, R. B.; EBI, H.; TURKE, A. B.; COFFEE, E. M.; NISHINO, M.; COGDILL, A. P.; BROWN, R. D.; DELLA PELLE, P.; DIAS-SANTAGATA, D.; HUNG, K. E.; FLAHERTY, K. T.; PIRIS, A.; WARGO, J. A.; SETTLEMAN, J.; MINO-KENUDSON, M.; ENGELMAN, J. A. EGFR-Mediated Reactivation of MAPK Signaling Contributes to Insensitivity of *BRAF* -Mutant Colorectal Cancers to RAF Inhibition with Vemurafenib. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 3, p. 227–235, mar. 2012.

COURTOIS, G.; GILMORE, T. D. Mutations in the NF-κB signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6831–6843, 30 out. 2006.

COX, A. D.; DER, C. J. Ras history. **Small GTPases**, v. 1, n. 1, p. 2–27, 27 jul. 2010.

COX, A. D.; FESIK, S. W.; KIMMELMAN, A. C.; LUO, J.; DER, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 828–851, 17 nov. 2014.

CRESPO, P.; LEÓN, J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 57, n. 11, p. 1613–36, out. 2000.

DALERBA, P.; DYLLA, S. J.; PARK, I.-K.; LIU, R.; WANG, X.; CHO, R. W.; HOEY, T.; GURNEY, A.; HUANG, E. H.; SIMEONE, D. M.; SHELTON, A. A.; PARMIANI, G.; CASTELLI, C.; CLARKE, M. F. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 24, p. 10158–10163, 12 jun. 2007.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12–27, 6 jul. 2012.

DEJARDIN, E.; DROIN, N. M.; DELHASE, M.; HAAS, E.; CAO, Y.; MAKRIS, C.; LI, Z.-W.; KARIN, M.; WARE, C. F.; GREEN, D. R. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. **Immunity**, v. 17, n. 4, p. 525–35, out. 2002.

DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; CHEN, Y.; KARIN, M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5412, p. 309–13, 9 abr. 1999.

DIBBLE, R.; LANGEBURG, W.; BAIR, S.; WARD, J.; AKERLEY, W. Natual history of non-small cell lung cancer in non-smokers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16_suppl, p. 7252–7252, 12 jun. 2005.

DIDONATO, J.; MERCURIO, F.; ROSETTE, C.; WU-LI, J.; SUYANG, H.; GHOSH, S.; KARIN, M. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 4, p. 1295–304, abr. 1996.

DIDONATO, J. A.; HAYAKAWA, M.; ROTHWARF, D. M.; ZANDI, E.; KARIN, M. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 548–554, 7 ago. 1997.

DIEHN, M.; CHO, R. W.; LOBO, N. A.; KALISKY, T.; DORIE, M. J.; KULP, A. N.; QIAN, D.; LAM, J. S.; AILLES, L. E.; WONG, M.; JOSHUA, B.; KAPLAN, M. J.; WAPNIR, I.; DIRBAS, F. M.; SOMLO, G.; GARBEROGLIO, C.; PAZ, B.; SHEN, J.; LAU, S. K.; QUAKE, S. R.; BROWN, J. M.; WEISSMAN, I. L.; CLARKE, M. F. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 780–783, 9 abr. 2009.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, jan. 2003.

DURAN, A.; LINARES, J. F.; GALVEZ, A. S.; WIKENHEISER, K.; FLORES, J. M.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J. The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF-κB Mediator in Tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 13, n. 4, p. 343–354, abr. 2008.

ERAMO, A.; LOTTI, F.; SETTE, G.; PILOZZI, E.; BIFFONI, M.; DI VIRGILIO, A.; CONTICELLO, C.; RUCO, L.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 3, p. 504–514, 30 mar. 2008.

ERAMO, A.; LOTTI, F.; SETTE, G.; PILOZZI, E.; BIFFONI, M.; DI VIRGILIO, A.; CONTICELLO, C.; RUCO, L.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 3, p. 504–514, 30 mar. 2008.

FILCHTINSKI, D.; SHARABI, O.; RÜPPEL, A.; VETTER, I. R.; HERRMANN, C.; SHIFMAN, J. M. What Makes Ras an Efficient Molecular Switch: A Computational, Biophysical, and Structural Study of Ras-GDP Interactions with Mutants of Raf. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 3, p. 422–435, 11 jun. 2010.

FINCO, T. S.; WESTWICK, J. K.; NORRIS, J. L.; BEG, A. A.; DER, C. J.; BALDWIN, A. S. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24113–6, 26 set. 1997.

FORBES, S. A.; BINDAL, N.; BAMFORD, S.; COLE, C.; KOK, C. Y.; BEARE, D.; JIA, M.; SHEPHERD, R.; LEUNG, K.; MENZIES, A.; TEAGUE, J. W.; CAMPBELL, P. J.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database issue, p. D945-50, jan. 2011.

FRELIN, C.; IMBERT, V.; GRIESSINGER, E.; PEYRON, A.-C.; ROCHET, N.; PHILIP, P.; DAGEVILLE, C.; SIRVENT, A.; HUMMELSBERGER, M.; BÉRARD, E.; DREANO, M.; SIRVENT, N.; PEYRON, J.-F. Targeting NF- B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 804–811, 15 jan. 2005.

FRIDAY, B. B.; ADJEI, A. A. K-ras as a target for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1756, n. 2, p. 127–144, 25 nov. 2005.

FUJIOKA, S.; SCLABAS, G. M.; SCHMIDT, C.; NIU, J.; FREDERICK, W. A.; DONG, Q. G.; ABBRUZZESE, J. L.; EVANS, D. B.; BAKER, C.; CHIAO, P. J. Inhibition of constitutive NF-κB activity by IκBαM suppresses tumorigenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 9, p. 1365–1370, 5 mar. 2003.

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. **Molecular carcinogenesis**, v. 14, n. 4, p. 286–93, dez. 1995.

GARCIA-ROSTAN, G.; ZHAO, H.; CAMP, R. L.; POLLAN, M.; HERRERO, A.; PARDO, J.; WU, R.; CARCANGIU, M. L.; COSTA, J.; TALLINI, G. *ras* Mutations Are Associated With Aggressive Tumor Phenotypes and Poor Prognosis in Thyroid Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3226–3235, 1 set. 2003.

GARNER, J. M.; FAN, M.; YANG, C. H.; DU, Z.; SIMS, M.; DAVIDOFF, A. M.; PFEFFER, L. M. Constitutive Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Nuclear Factor κB Signaling in Glioblastoma Cancer Stem Cells Regulates the Notch Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 36, p. 26167–26176, 6 set. 2013.

GAY, L. J.; MALANCHI, I. The sleeping ugly: Tumour microenvironment's act to make or break the spell of dormancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 231–238, ago. 2017.

GOLDFARB, M.; SHIMIZU, K.; PERUCHO, M.; WIGLER, M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. **Nature**, v. 296, n. 5856, p. 404–409, 1 abr. 1982.

GONZÁLEZ-GARCÍA, 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**, v. 7, n. 3, p. 219–226, mar. 2005.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. **Annual Review of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 615–627, fev. 2002.

GRETEN, F. R.; ECKMANN, L.; GRETEN, T. F.; PARK, J. M.; LI, Z.-W.; EGAN, L. J.; KAGNOFF, M. F.; KARIN, M. IKKβ Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 285–296, 6 ago. 2004.

GUZMAN, M. L.; NEERING, S. J.; UPCHURCH, D.; GRIMES, B.; HOWARD, D. S.; RIZZIERI, D. A.; LUGER, S. M.; JORDAN, C. T. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2301–7, 15 out. 2001.

HADJIMICHAEL, C.; CHANOUMIDOU, K.; PAPADOPOULOU, N.; ARAMPATZI, P.; PAPAMATHEAKIS, J.; KRETSOVALI, A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 9, p. 1150–84, 26 out. 2015.

HALL, A.; MARSHALL, C. J.; SPURR, N. K.; WEISS, R. A. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. **Nature**, v. 303, n. 5916, p. 396–400, 2 jun. 1983.

HAMMERSCHMIDT, S.; WIRTZ, H. Lung Cancer. **Deutsches Aerzteblatt Online**, v. 106, n. 49, p. 809- 18; quiz 819-20, 4 dez. 2009.

HAN, M.-E.; JEON, T.-Y.; HWANG, S.-H.; LEE, Y.-S.; KIM, H.-J.; SHIM, H.-E.; YOON, S.; BAEK, S.-Y.; KIM, B.-S.; KANG, C.-D.; OH, S.-O. Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 21, p. 3589–3605, 30 nov. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HANCOCK, J. F. Ras proteins: different signals from different locations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 373–385, 1 maio 2003.

HARRIS, J.; OLIÈRE, S.; SHARMA, S.; SUN, Q.; LIN, R.; HISCOTT, J.; GRANDVAUX, N. Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 4, p. 2527–35, 15 ago. 2006.

HARVEY, J. J. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. **Nature**, v. 204, n. 4963, p. 1104–1105, 12 dez. 1964.

HATZIVASSILIOU, G.; SONG, K.; YEN, I.; BRANDHUBER, B. J.; ANDERSON, D. J.; ALVARADO, R.; LUDLAM, M. J. C.; STOKOE, D.; GLOOR, S. L.; VIGERS, G.; MORALES, T.; ALIAGAS, I.; LIU, B.; SIDERIS, S.; HOEFLICH, K. P.; JAISWAL, B. S.; SESHAGIRI, S.; KOEPPEN, H.; BELVIN, M.; FRIEDMAN, L. S.; MALEK, S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 431–435, 18 mar. 2010.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & Development**, v. 26, n. 3, p. 203–234, 1 fev. 2012.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF-κB Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 8 fev. 2008.

HE, G.; YU, G.-Y.; TEMKIN, V.; OGATA, H.; KUNTZEN, C.; SAKURAI, T.; SIEGHART, W.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; LEFFERT, H. L.; KARIN, M. Hepatocyte IKKβ/NF-κB Inhibits Tumor Promotion and Progression by Preventing Oxidative Stress-Driven STAT3 Activation. **Cancer Cell**, v. 17, n. 3, p. 286–297, 16 mar. 2010.

HEIDORN, S. J.; MILAGRE, C.; WHITTAKER, S.; NOURRY, A.; NICULESCU-DUVAS, I.; DHOMEN, N.; HUSSAIN, J.; REIS-FILHO, J. S.; SPRINGER, C. J.; PRITCHARD, C.; MARAIS, R. Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 209–221, 22 jan. 2010.

HENRY, D. O.; MOSKALENKO, S. A.; KAUR, K. J.; FU, M.; PESTELL, R. G.; CAMONIS, J. H.; WHITE, M. A. Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF-kappaB. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 21, p. 8084–92, nov. 2000.

HEZEL, A. F.; KIMMELMAN, A. C.; STANGER, B. Z.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes & Development**, v. 20, n. 10, p. 1218–1249, 15 maio 2006.

HIDESHIMA, T.; NERI, P.; TASSONE, P.; YASUI, H.; ISHITSUKA, K.; RAJE, N.; CHAUHAN, D.; PODAR, K.; MITSIADES, C.; DANG, L.; MUNSHI, N.; RICHARDSON, P.; SCHENKEIN, D.; ANDERSON, K. C. MLN120B, a Novel I B Kinase Inhibitor, Blocks Multiple Myeloma Cell Growth In vitro and In vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 19, p. 5887–5894, 1 out. 2006.

HINOHARA, K.; KOBAYASHI, S.; KANAUCHI, H.; SHIMIZU, S.; NISHIOKA, K.; TSUJI, E. -i.; TADA, K. -i.; UMEZAWA, K.; MORI, M.; OGAWA, T.; INOUE, J. -i.; TOJO, A.; GOTOH, N. ErbB receptor tyrosine kinase/NF- B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 17, p. 6584–6589, 24 abr. 2012.

HINZ, M.; SCHEIDEREIT, C. The IκB kinase complex in NF-κB regulation and beyond. **EMBO reports**, v. 15, n. 1, p. 46–61, jan. 2014.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 1 out. 2013.

HU, M. C.-T.; LEE, D.-F.; XIA, W.; GOLFMAN, L. S.; OU-YANG, F.; YANG, J.-Y.; ZOU, Y.; BAO, S.; HANADA, N.; SASO, H.; KOBAYASHI, R.; HUNG, M.-C. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 225–37, 16 abr. 2004.

HUNTER, J. C.; MANANDHAR, A.; CARRASCO, M. A.; GURBANI, D.; GONDI, S.; WESTOVER, K. D. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. **Molecular Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 1325–1335, 1 set. 2015.

ISRAEL, A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- B Activation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 3, p. a000158–a000158, 1 mar. 2010.

ITO, K.; HIRAO, A.; ARAI, F.; MATSUOKA, S.; TAKUBO, K.; HAMAGUCHI, I.; NOMIYAMA, K.; HOSOKAWA, K.; SAKURADA, K.; NAKAGATA, N.; IKEDA, Y.; MAK, T. W.; SUDA, T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 997–1002, 21 out. 2004.

IZAR, B.; ZHOU, H.; HEIST, R. S.; AZZOLI, C. G.; MUZIKANSKY, A.; SCRIBNER, E. E. F.; BERNARDO, L. A.; DIAS-SANTAGATA, D.; IAFRATE, A. J.; LANUTI, M. The Prognostic Impact of KRAS, Its Codon and Amino Acid Specific Mutations, on Survival in Resected Stage I Lung Adenocarcinoma. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 9, n. 9, p. 1363–1369, 1 set. 2014.

JACKSON, E. L.; WILLIS, N.; MERCER, K.; BRONSON, R. T.; CROWLEY, D.; MONTOYA, R.; JACKS, T.; TUVESON, D. A. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. **Genes & Development**, v. 15, n. 24, p. 3243–3248, 15 dez. 2001.

JACKSON, J. H.; COCHRANE, C. G.; BOURNE, J. R.; SOLSKI, P. A.; BUSS, J. E.; DER, C. J. Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 8, p. 3042–6, abr. 1990.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12730–4, 20 dez. 1994.

JAMES, G. L.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; RAWSON, T. E.; SOMERS, T. C.; MCDOWELL, R. S.; CROWLEY, C. W.; LUCAS, B. K.; LEVINSON, A. D.; MARSTERS, J. C. Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5116, p. 1937–42, 25 jun. 1993.

JANES, M. R.; ZHANG, J.; LI, L.-S.; HANSEN, R.; PETERS, U.; GUO, X.; CHEN, Y.; BABBAR, A.; FIRDAUS, S. J.; DARJANIA, L.; FENG, J.; CHEN, J. H.; LI, S.; LI, S.; LONG, Y. O.; THACH, C.; LIU, Y.; ZARIEH, A.; ELY, T.; KUCHARSKI, J. M.; KESSLER, L. V.; WU, T.; YU, K.; WANG, Y.; YAO, Y.; DENG, X.; ZARRINKAR, P. P.; BREHMER, D.; DHANAK, D.; LORENZI, M. V.; HU-LOWE, D.; PATRICELLI, M. P.; REN, P.; LIU, Y. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 578–589.e17, 25 jan. 2018.

JIANG, R.; LI, Y.; ZHANG, A.; WANG, B.; XU, Y.; XU, W.; ZHAO, Y.; LUO, F.; LIU, Q. The acquisition of cancer stem cell-like properties and neoplastic transformation of human keratinocytes induced by arsenite involves epigenetic silencing of let-7c via Ras/NF-κB. **Toxicology Letters**, v. 227, n. 2, p. 91–98, 5 jun. 2014.

JIANG, T.; GRABINER, B.; ZHU, Y.; JIANG, C.; LI, H.; YOU, Y.; LANG, J.; HUNG, M.-C.; LIN, X. CARMA3 is crucial for EGFR-induced activation of NF-κB and tumor progression. **Cancer research**, v. 71, n. 6, p. 2183, 2011.

JOHN, J.; SOHMEN, R.; FEUERSTEIN, J.; LINKE, R.; WITTINGHOFER, A.; GOODY, R. S. Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. **Biochemistry**, v. 29, n. 25, p. 6058–65, 26 jun. 1990.

JOHNSON, L.; MERCER, K.; GREENBAUM, D.; BRONSON, R. T.; CROWLEY, D.; TUVESON, D. A.; JACKS, T. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1111–1116, 26 abr. 2001.

KASHATUS, D. F. Ral GTPases in tumorigenesis: Emerging from the shadows. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 15, p. 2337–2342, 10 set. 2013.

KELLEY, G. G.; REKS, S. E.; ONDRAKO, J. M.; SMRCKA, A. V. Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. **The EMBO journal**, v. 20, n. 4, p. 743–54, 15 fev. 2001.

KENDELLEN, M. F.; BRADFORD, J. W.; LAWRENCE, C. L.; CLARK, K. S.; BALDWIN, A. S. Canonical and non-canonical NF-κB signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. **Oncogene**, v. 33, n. 10, p. 1297–1305, 11 mar. 2014.

KERR, E. M.; GAUDE, E.; TURRELL, F. K.; FREZZA, C.; MARTINS, C. P. Mutant Kras copy number defines metabolic reprogramming and therapeutic susceptibilities. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. 110–113, 24 mar. 2016.

KHUDER, S. A. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 31, n. 2–3, p. 139–48, 2001.

KIM, B.-Y.; GAYNOR, R. B.; SONG, K.; DRITSCHILO, A.; JUNG, M. Constitutive activation of NF-κB in Ki-ras-transformed prostate epithelial cells. **Oncogene**, v. 21, n. 29, p. 4490–4497, 27 jul. 2002.

KIM, C. F. B.; JACKSON, E. L.; WOOLFENDEN, A. E.; LAWRENCE, S.; BABAR, I.; VOGEL, S.; CROWLEY, D.; BRONSON, R. T.; JACKS, T. Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. **Cell**, v. 121, n. 6, p. 823–835, 17 jun. 2005.

KIM, H. S.; MENDIRATTA, S.; KIM, J.; PECOT, C. V.; LARSEN, J. E.; ZUBOVYCH, I.; SEO, B. Y.; KIM, J.; ESKIOCAK, B.; CHUNG, H.; MCMILLAN, E.; WU, S.; DE BRABANDER, J.; KOMUROV, K.; TOOMBS, J. E.; WEI, S.; PEYTON, M.; WILLIAMS, N.; GAZDAR, A. F.; POSNER, B. A.; BREKKEN, R. A.; SOOD, A. K.; DEBERARDINIS, R. J.; ROTH, M. G.; MINNA, J. D.; WHITE, M. A. Systematic identification of molecular subtype-selective vulnerabilities in non-small-cell lung cancer. **Cell**, v. 155, n. 3, p. 552–66, 24 out. 2013.

KIM, R.-K.; SUH, Y.; YOO, K.-C.; CUI, Y.-H.; KIM, H.; KIM, M.-J.; GYU KIM, I.; LEE, S.-J. Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 1, p. e137–e137, 30 jan. 2015.

KIM, R.-J.; KIM, S.-R.; ROH, K.-J.; PARK, S.-B.; PARK, J.-R.; KANG, K.-S.; KONG, G.; TANG, B.; YANG, Y.; KOHN, E. A.; WAKEFIELD, L. M.; NAM, J.-S. Ras activation contributes to the maintenance and expansion of Sca-1pos cells in a mouse model of breast cancer. **Cancer Letters**, v. 287, n. 2, p. 172–181, 28 jan. 2010.

KIRSTEN, W. H.; MAYER, L. A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 39, n. 2, p. 311–35, ago. 1967.

KLEFFEL, S.; SCHATTON, T. Tumor Dormancy and Cancer Stem Cells: Two Sides of the Same Coin? In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]734p. 145–179. KOHL, N. E.; MOSSER, S. D.; DESOLMS, S. J.; GIULIANI, E. A.; POMPLIANO, D. L.; GRAHAM, S. L.; SMITH, R. L.; SCOLNICK, E. M.; OLIFF, A.; GIBBS, J. B. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5116, p. 1934–7, 25 jun. 1993.

KORTLEVER, R. M.; SODIR, N. M.; WILSON, C. H.; BURKHART, D. L.; PELLEGRINET, L.; BROWN SWIGART, L.; LITTLEWOOD, T. D.; EVAN, G. I. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. **Cell**, v. 171, n. 6, p. 1301–1315.e14, 30 nov. 2017.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell stem cell**, v. 14, n. 3, p. 275–91, 6 mar. 2014.

KREUZER, M.; KREIENBROCK, L.; MÜLLER, K. M.; GERKEN, M.; WICHMANN, E. Histologic types of lung carcinoma and age at onset. **Cancer**, v. 85, n. 9, p. 1958–65, 1 maio 1999.

KRUSPIG, B.; MONTEVERDE, T.; NEIDLER, S.; HOCK, A.; KERR, E.; NIXON, C.; CLARK, W.; HEDLEY, A.; LAING, S.; COFFELT, S. B.; LE QUESNE, J.; DICK, C.; VOUSDEN, K.; MARTINS, C. P.; MURPHY, D. J. The ERBB network facilitates KRAS-driven lung tumorigenesis. **Science translational medicine**, v. 10, n. 446, p. eaao2565, 20 jun. 2018.

KUMAR, M. S.; HANCOCK, D. C.; MOLINA-ARCAS, M.; STECKEL, M.; EAST, P.; DIEFENBACHER, M.; ARMENTEROS-MONTERROSO, E.; LASSAILLY, F.; MATTHEWS, N.; NYE, E.; STAMP, G.; BEHRENS, A.; DOWNWARD, J. The GATA2 Transcriptional Network Is Requisite for RAS Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 642–655, 27 abr. 2012.

LAU, J.; ILKHANIZADEH, S.; WANG, S.; MIROSHNIKOVA, Y. A.; SALVATIERRA, N. A.; WONG, R. A.; SCHMIDT, C.; WEAVER, V. M.; WEISS, W. A.; PERSSON, A. I. STAT3 Blockade Inhibits Radiation-Induced Malignant Progression in Glioma. **Cancer Research**, v. 75, n. 20, p. 4302–4311, 15 out. 2015.

LEE, H. J.; CHOE, G.; JHEON, S.; SUNG, S.-W.; LEE, C.-T.; CHUNG, J.-H. CD24, a Novel Cancer Biomarker, Predicting Disease-Free Survival of Non-small Cell Lung Carcinomas: A Retrospective Study of Prognostic Factor Analysis from the Viewpoint of Forthcoming (Seventh) New TNM Classification. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 5, p. 649–657, maio 2010.

LEIZER, A. L.; ALVERO, A. B.; FU, H. H.; HOLMBERG, J. C.; CHENG, Y.-C.; SILASI, D.-A.; RUTHERFORD, T.; MOR, G. Regulation of Inflammation by the NF-κB Pathway in Ovarian Cancer Stem Cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 4, p. 438–447, abr. 2011.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 25 jun. 2010.

LEUNG, E. L.-H.; FISCUS, R. R.; TUNG, J. W.; TIN, V. P.-C.; CHENG, L. C.; SIHOE, A. D.-L.; FINK, L. M.; MA, Y.; WONG, M. P. Non-Small Cell Lung Cancer Cells Expressing CD44 Are Enriched for Stem Cell-Like Properties. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e14062, 19 nov. 2010.

LEVINA, V.; MARRANGONI, A.; WANG, T.; PARIKH, S.; SU, Y.; HERBERMAN, R.; LOKSHIN, A.; GORELIK, E. Elimination of Human Lung Cancer Stem Cells through Targeting of the Stem Cell Factor-c-kit Autocrine Signaling Loop. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 338–346, 1 jan. 2010.

LI, C.; HEIDT, D. G.; DALERBA, P.; BURANT, C. F.; ZHANG, L.; ADSAY, V.; WICHA, M.; CLARKE, M. F.; SIMEONE, D. M. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 3, p. 1030–1037, 1 fev. 2007.

LI, F.; TIEDE, B.; MASSAGUÉ, J.; KANG, Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. **Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 3–14, 19 jan. 2007.

LI, Q.; LU, Q.; HWANG, J. Y.; BÜSCHER, D.; LEE, K. F.; IZPISUA-BELMONTE, J. C.; VERMA, I. M. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. **Genes & development**, v. 13, n. 10, p. 1322–8, 15 maio 1999.

LI, Q.; VAN ANTWERP, D.; MERCURIO, F.; LEE, K. F.; VERMA, I. M. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5412, p. 321–5, 9 abr. 1999.

LI, W.; MA, H.; ZHANG, J.; ZHU, L.; WANG, C.; YANG, Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13856, 23 dez. 2017.

LI, Z. W.; CHU, W.; HU, Y.; DELHASE, M.; DEERINCK, T.; ELLISMAN, M.; JOHNSON, R.; KARIN, M. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB

activation and prevention of apoptosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 11, p. 1839–45, 7 jun. 1999.

LIAU, B. B.; SIEVERS, C.; DONOHUE, L. K.; GILLESPIE, S. M.; FLAVAHAN, W. A.; MILLER, T. E.; VENTEICHER, A. S.; HEBERT, C. H.; CAREY, C. D.; RODIG, S. J.; SHAREEF, S. J.; NAJM, F. J.; VAN GALEN, P.; WAKIMOTO, H.; CAHILL, D. P.; RICH, J. N.; ASTER, J. C.; SUVÀ, M. L.; PATEL, A. P.; BERNSTEIN, B. E. Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 2, p. 233–246.e7, 2 fev. 2017.

LING, J.; KANG, Y.; ZHAO, R.; XIA, Q.; LEE, D.-F.; CHANG, Z.; LI, J.; PENG, B.; FLEMING, J. B.; WANG, H.; LIU, J.; LEMISCHKA, I. R.; HUNG, M.-C.; CHIAO, P. J. KrasG12D-Induced IKK2/β/NF-κB Activation by IL-1α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 21, n. 1, p. 105–120, 17 jan. 2012.

LING, L.; CAO, Z.; GOEDDEL, D. V. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3792–7, 31 mar. 1998.

LITO, P.; SOLOMON, M.; LI, L.-S.; HANSEN, R.; ROSEN, N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. **Science**, v. 351, n. 6273, p. 604–608, 5 fev. 2016.

LITO, P.; ROSEN, N.; SOLIT, D. B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1401–1409, 1 nov. 2013.

LIU, A. Y.; TRUE, L. D.; LATRAY, L.; NELSON, P. S.; ELLIS, W. J.; VESSELLA, R. L.; LANGE, P. H.; HOOD, L.; VAN DEN ENGH, G. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10705–10, 30 set. 1997.

LIU, F.; XIA, Y.; PARKER, A. S.; VERMA, I. M. IKK biology. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 239–253, mar. 2012.

LIU, M.; SJOGREN, A.-K. M.; KARLSSON, C.; IBRAHIM, M. X.; ANDERSSON, K. M. E.; OLOFSSON, F. J.; WAHLSTROM, A. M.; DALIN, M.; YU, H.; CHEN, Z.; YANG, S. H.; YOUNG, S. G.; BERGO, M. O. Targeting the protein prenyltransferases efficiently reduces tumor development in mice with K-RAS-induced lung cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 14, p. 6471–6476, 6 abr. 2010.

LIU, R.; WANG, X.; CHEN, G. Y.; DALERBA, P.; GURNEY, A.; HOEY, T.; SHERLOCK, G.; LEWICKI, J.; SHEDDEN, K.; CLARKE, M. F. The Prognostic Role of a Gene Signature from Tumorigenic Breast-Cancer Cells. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 217–226, 18 jan. 2007.

LIU, S.; MISQUITTA, Y. R.; OLLAND, A.; JOHNSON, M. A.; KELLEHER, K. S.; KRIZ, R.; LIN, L. L.; STAHL, M.; MOSYAK, L. Crystal Structure of a Human IκB Kinase β Asymmetric Dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22758–22767, 2 ago. 2013.

LIU, Y.-P.; YANG, C.-J.; HUANG, M.-S.; YEH, C.-T.; WU, A. T. H.; LEE, Y.-C.; LAI, T.-C.; LEE, C.-H.; HSIAO, Y.-W.; LU, J.; SHEN, C.-N.; LU, P.-J.; HSIAO, M. Cisplatin Selects for Multidrug-Resistant CD133+ Cells in Lung Adenocarcinoma by Activating Notch Signaling. **Cancer Research**, v. 73, n. 1, p. 406–416, 1 jan. 2013.

LUO, J.; EMANUELE, M. J.; LI, D.; CREIGHTON, C. J.; SCHLABACH, M. R.; WESTBROOK, T. F.; WONG, K.-K.; ELLEDGE, S. J. A Genome-wide RNAi Screen Identifies Multiple Synthetic Lethal Interactions with the Ras Oncogene. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 835–848, 29 maio 2009.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823–837, 6 mar. 2009.

MACALUSO, M.; RUSSO, G.; CINTI, C.; BAZAN, V.; GEBBIA, N.; RUSSO, A. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 2, p. 125–130, ago. 2002.

MALANCHI, I.; SANTAMARIA-MARTÍNEZ, A.; SUSANTO, E.; PENG, H.; LEHR, H.-A.; DELALOYE, J.-F.; HUELSKEN, J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. **Nature**, v. 481, n. 7379, p. 85–89, 7 jan. 2012.

MANI, S. A.; GUO, W.; LIAO, M.-J.; EATON, E. N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A. Y.; BROOKS, M.; REINHARD, F.; ZHANG, C. C.; SHIPITSIN, M.; CAMPBELL, L. L.; POLYAK, K.; BRISKEN, C.; YANG, J.; WEINBERG, R. A. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–715, 16 maio 2008.

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. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 1, p. 131–139, 14 jan. 2005.

MATSUO, Y.; CAMPBELL, P. M.; BREKKEN, R. A.; SUNG, B.; OUELLETTE, M. M.; FLEMING, J. B.; AGGARWAL, B. B.; DER, C. J.; GUHA, S. K-Ras Promotes Angiogenesis Mediated by Immortalized Human Pancreatic Epithelial Cells through Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 799–808, 1 jun. 2009.

MAY, M. J.; LARSEN, S. E.; SHIM, J. H.; MADGE, L. A.; GHOSH, S. A Novel Ubiquitin-like Domain in IκB Kinase β Is Required for Functional Activity of the Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45528–45539, 29 out. 2004.

MAYO, M. W.; WANG, C. Y.; COGSWELL, P. C.; ROGERS-GRAHAM, K. S.; LOWE, S. W.; DER, C. J.; BALDWIN, A. S. Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5344, p. 1812–5, 5 dez. 1997.

MCCORMICK, F. KRAS as a Therapeutic Target. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 8, p. 1797–1801, 15 abr. 2015.

MEDEMA, J. P. Cancer stem cells: The challenges ahead. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 338–344, 1 abr. 2013.

MERCURIO, F.; ZHU, H.; MURRAY, B. W.; SHEVCHENKO, A.; BENNETT, B. L.; LI, J.; YOUNG, D. B.; BARBOSA, M.; MANN, M.; MANNING, A.; RAO, A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5339, p. 860–6, 31 out. 1997.

MIRZOEVA, O. K.; DAS, D.; HEISER, L. M.; BHATTACHARYA, S.; SIWAK, D.; GENDELMAN, R.; BAYANI, N.; WANG, N. J.; NEVE, R. M.; GUAN, Y.; HU, Z.; KNIGHT, Z.; FEILER, H. S.; GASCARD, P.; PARVIN, B.; SPELLMAN, P. T.; SHOKAT, K. M.; WYROBEK, A. J.; BISSELL, M. J.; MCCORMICK, F.; KUO, W.-L.; MILLS, G. B.; GRAY, J. W.; KORN, W. M. Basal Subtype and MAPK/ERK Kinase (MEK)-Phosphoinositide 3-Kinase Feedback Signaling Determine Susceptibility of Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 565–572, 15 jan. 2009.

MITIN, N.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. Signaling Interplay in Ras Superfamily Function. **Current Biology**, v. 15, n. 14, p. R563–R574, 26 jul. 2005.

MIZUMOTO, Y.; KYO, S.; KIYONO, T.; TAKAKURA, M.; NAKAMURA, M.; MAIDA, Y.; MORI, N.; BONO, Y.; SAKURAI, H.; INOUE, M. Activation of NF- B Is a Novel Target of KRAS-Induced Endometrial Carcinogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 6, p. 1341–1350, 15 mar. 2011.

MOLL, H. P.; PRANZ, K.; MUSTEANU, M.; GRABNER, B.; HRUSCHKA, N.; MOHRHERR, J.; AIGNER, P.; STIEDL, P.; BRCIC, L.; LASZLO, V.; SCHRAMEK, D.; MORIGGL, R.; EFERL,

R.; MOLDVAY, J.; DEZSO, K.; LOPEZ-CASAS, P. P.; STOIBER, D.; HIDALGO, M.; PENNINGER, J.; SIBILIA, M.; GYŐRFFY, B.; BARBACID, M.; DOME, B.; POPPER, H.; CASANOVA, E. Afatinib restrains K-RAS-driven lung tumorigenesis. **Science translational medicine**, v. 10, n. 446, p. eaao2301, 20 jun. 2018.

MONTERO-CONDE, C.; RUIZ-LLORENTE, S.; DOMINGUEZ, J. M.; KNAUF, J. A.; VIALE, A.; SHERMAN, E. J.; RYDER, M.; GHOSSEIN, R. A.; ROSEN, N.; FAGIN, J. A. Relief of Feedback Inhibition of *HER3* Transcription by RAF and MEK Inhibitors Attenuates Their Antitumor Effects in *BRAF* -Mutant Thyroid Carcinomas. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 5, p. 520–533, maio 2013.

MOORE, K. A.; LEMISCHKA, I. R. Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 311, n. 5769, p. 1880–1885, 31 mar. 2006.

NAKANISHI, T.; ROSS, D. D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. **Chinese Journal of Cancer**, v. 31, n. 2, p. 73–99, 5 fev. 2012.

NEEL, N. F.; MARTIN, T. D.; STRATFORD, J. K.; ZAND, T. P.; REINER, D. J.; DER, C. J. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 275–287, 1 mar. 2011.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 194, n. 4260, p. 23–8, 1 out. 1976.

O'FLAHERTY, J. D.; BARR, M.; FENNELL, D.; RICHARD, D.; REYNOLDS, J.; O'LEARY, J.; O'BYRNE, K. The Cancer Stem-Cell Hypothesis: Its Emerging Role in Lung Cancer Biology and Its Relevance for Future Therapy. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 7, n. 12, p. 1880–1890, dez. 2012.

OHTAKI, Y.; SHIMIZU, K.; KAKEGAWA, S.; NAGASHIMA, T.; NAKANO, T.; ATSUMI, J.; ENOKIDA, Y.; IGAI, H.; IBE, T.; SUGANO, M.; KAMIYOSHIHARA, M.; KAWASHIMA, O.; KAIRA, K.; SUNAGA, N.; TAKEYOSHI, I. Postrecurrence survival of surgically resected pulmonary adenocarcinoma patients according to EGFR and KRAS mutation status. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 2, n. 2, p. 187–196, mar. 2014.

OSTREM, J. M. L.; SHOKAT, K. M. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 11, p. 771–785, 29 nov. 2016.

OSTREM, J. M.; PETERS, U.; SOS, M. L.; WELLS, J. A.; SHOKAT, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. **Nature**, v. 503, n. 7477, p. 548–551, 20 nov. 2013.

PAGE, A.; NAVARRO, M.; SUÁREZ-CABRERA, C.; BRAVO, A.; RAMIREZ, A. Context-Dependent Role of IKKβ in Cancer. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 376, 8 dez. 2017.

PAK, C.; MIYAMOTO, S. A new alpha in line between KRAS and NF-κB activation? **Cancer discovery**, v. 3, n. 6, p. 613–5, jun. 2013.

PARADA, L. F.; WEINBERG, R. A. Presence of a Kirsten murine sarcoma virus ras oncogene in cells transformed by 3-methylcholanthrene. **Molecular and cellular biology**, v. 3, n. 12, p. 2298–301, dez. 1983.

PARANJAPE, A. N.; BALAJI, S. A.; MANDAL, T.; KRUSHIK, E. V.; NAGARAJ, P.; MUKHERJEE, G.; RANGARAJAN, A. Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 785, 28 dez. 2014.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74–108, 1 mar. 2005.

PATGIRI, A.; YADAV, K. K.; ARORA, P. S.; BAR-SAGI, D. An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 9, p. 585–587, 17 set. 2011.

PATRICELLI, M. P.; JANES, M. R.; LI, L.-S.; HANSEN, R.; PETERS, U.; KESSLER, L. V.; CHEN, Y.; KUCHARSKI, J. M.; FENG, J.; ELY, T.; CHEN, J. H.; FIRDAUS, S. J.; BABBAR, A.; REN, P.; LIU, Y. Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 3, p. 316–329, 1 mar. 2016.

PERI, F.; AIROLDI, C.; COLOMBO, S.; MARTEGANI, E.; VAN NEUREN, A. S.; STEIN, M.; MARINZI, C.; NICOTRA, F. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Sugar-Derived Ras Inhibitors. **ChemBioChem**, v. 6, n. 10, p. 1839–1848, 7 out. 2005.

PERUCHO, M.; GOLDFARB, M.; SHIMIZU, K.; LAMA, C.; FOGH, J.; WIGLER, M. Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. **Cell**, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 467–76, dez. 1981.

PETERS, R. L.; RABSTEIN, L. S.; VANVLECK, R.; KELLOFF, G. J.; HUEBNER, R. J. Naturally occurring sarcoma virus of the BALB/cCr mouse. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 6, p. 1725–9, dez. 1974.

POLLEY, S.; HUANG, D.-B.; HAUENSTEIN, A. V.; FUSCO, A. J.; ZHONG, X.; VU, D.; SCHRÖFELBAUER, B.; KIM, Y.; HOFFMANN, A.; VERMA, I. M.; GHOSH, G.; HUXFORD, T. A Structural Basis for IκB Kinase 2 Activation Via Oligomerization-Dependent Trans Auto-Phosphorylation. **PLoS Biology**, v. 11, n. 6, p. e1001581, 11 jun. 2013.

POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265–273, 5 abr. 2009.

PONTI, D.; COSTA, A.; ZAFFARONI, N.; PRATESI, G.; PETRANGOLINI, G.; CORADINI, D.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M. A.; DAIDONE, M. G. Isolation and *In vitro* Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5506–5511, 1 jul. 2005.

POULIKAKOS, P. I.; ZHANG, C.; BOLLAG, G.; SHOKAT, K. M.; ROSEN, N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 427–430, 18 mar. 2010.

PRIOR, I. A.; LEWIS, P. D.; MATTOS, C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2457–2467, 15 maio 2012.

PULCIANI, S.; SANTOS, E.; LAUVER, A. V; LONG, L. K.; ROBBINS, K. C.; BARBACID, M. Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 9, p. 2845–9, maio 1982.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, 13 nov. 2011.

QUINTANA, E.; SHACKLETON, M.; SABEL, M. S.; FULLEN, D. R.; JOHNSON, T. M.; MORRISON, S. J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. **Nature**, v. 456, n. 7222, p. 593–598, 4 dez. 2008.

RASHEED, S.; GARDNER, M. B.; HUEBNER, R. J. In vitro isolation of stable rat sarcoma viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 6, p. 2972–6, jun. 1978.

RAY, A.; SLAMA, Z. M.; MORFORD, R. K.; MADDEN, S. A.; PROVENZANO, P. P. Enhanced Directional Migration of Cancer Stem Cells in 3D Aligned Collagen Matrices. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 5, p. 1023–1036, 14 mar. 2017.

REGALA, R. P.; DAVIS, R. K.; KUNZ, A.; KHOOR, A.; LEITGES, M.; FIELDS, A. P. Atypical Protein Kinase C Is Required for Bronchioalveolar Stem Cell Expansion and Lung Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 69, n. 19, p. 7603–7611, 1 out. 2009.

REGE, T. A.; HAGOOD, J. S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 8, p. 1045–1054, jun. 2006.

RÉGNIER, C. H.; SONG, H. Y.; GAO, X.; GOEDDEL, D. V; CAO, Z.; ROTHE, M. Identification and characterization of an IkappaB kinase. **Cell**, v. 90, n. 2, p. 373–83, 25 jul. 1997.

REISS, Y.; GOLDSTEIN, J. L.; SEABRA, M. C.; CASEY, P. J.; BROWN, M. S. Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. **Cell**, v. 62, n. 1, p. 81–8, 13 jul. 1990.

RESH, M. D. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. **Sub-cellular biochemistry**, v. 37, p. 217–32, 2004.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105–111, 1 nov. 2001.

RINKENBAUGH, A. L.; BALDWIN, A. S. The NF-κB Pathway and Cancer Stem Cells. **Cells**, v. 5, n. 2, 6 abr. 2016. RINKENBAUGH, A. L.; COGSWELL, P. C.; CALAMINI, B.; DUNN, D. E.; PERSSON, A. I.; WEISS, W. A.; LO, D. C.; BALDWIN, A. S. IKK/NF-κB signaling contributes to glioblastoma stem cell maintenance. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 69173–69187, 25 out. 2016.

RODRIGUEZ-VICIANA, P.; TETSU, O.; ODA, K.; OKADA, J.; RAUEN, K.; MCCORMICK, F. Cancer Targets in the Ras Pathway. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 70, n. 0, p. 461–467, 1 jan. 2005.

ROSKOSKI, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological Research**, v. 79, p. 34–74, jan. 2014.

ROTHWARF, D. M.; ZANDI, E.; NATOLI, G.; KARIN, M. IKK-γ is an essential regulatory subunit of the IκB kinase complex. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 297–300, 17 set. 1998.

RYAN, D. P.; HONG, T. S.; BARDEESY, N. Pancreatic Adenocarcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 11, p. 1039–1049, 11 set. 2014.

SAKAMOTO, K.; HIKIBA, Y.; NAKAGAWA, H.; HIRATA, Y.; HAYAKAWA, Y.; KINOSHITA, H.; NAKATA, W.; SAKITANI, K.; TAKAHASHI, R.; AKANUMA, M.; KAMATA, H.; MAEDA, S. Promotion of DNA repair by nuclear IKKβ phosphorylation of ATM in response to genotoxic stimuli. **Oncogene**, v. 32, n. 14, p. 1854–1862, 21 abr. 2013.

SALGIA, R.; SKARIN, A. T. Molecular abnormalities in lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 1207–1217, mar. 1998.

SANCLEMENTE, M.; FRANCOZ, S.; ESTEBAN-BURGOS, L.; BOUSQUET-MUR, E.; DJUREC, M.; LOPEZ-CASAS, P. P.; HIDALGO, M.; GUERRA, C.; DROSTEN, M.; MUSTEANU, M.; BARBACID, M. c-RAF Ablation Induces Regression of Advanced Kras/Trp 53 Mutant Lung Adenocarcinomas by a Mechanism Independent of MAPK Signaling. **Cancer Cell**, v. 33, n. 2, p. 217–228.e4, 12 fev. 2018.

SANTOS, E.; MARTIN-ZANCA, D.; REDDY, E. P.; PIEROTTI, M. A.; DELLA PORTA, G.; BARBACID, M. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. **Science (New York, N.Y.)**, v. 223, n. 4637, p. 661–4, 17 fev. 1984.

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. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 25, p. 14701–4, 5 set. 1990.

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 (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5324, p. 333–8, 18 jul. 1997.

SCHEIDEREIT, C. IκB kinase complexes: gateways to NF-κB activation and transcription. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6685–6705, 30 out. 2006.

SEABRA, M. C. Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. **Cellular signalling**, v. 10, n. 3, p. 167–72, mar. 1998.

SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241–253, 19 abr. 2010.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 611–629, 11 abr. 2017.

SHIELDS, J. M.; PRUITT, K.; MCFALL, A.; SHAUB, A.; DER, C. J. Understanding Ras: 'it ain't over "til it's over". **Trends in cell biology**, v. 10, n. 4, p. 147–54, abr. 2000.

SHIH, C.; SHILO, B. Z.; GOLDFARB, M. P.; DANNENBERG, A.; WEINBERG, R. A. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 11, p. 5714–8, nov. 1979.

SHIH, C.; WEINBERG, R. A. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. **Cell**, v. 29, n. 1, p. 161–9, maio 1982.

SHIH, C.; PADHY, L. C.; MURRAY, M.; WEINBERG, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. **Nature**, v. 290, n. 5803, p. 261–264, 19 mar. 1981.

SHIMA, F.; YOSHIKAWA, Y.; YE, M.; ARAKI, M.; MATSUMOTO, S.; LIAO, J.; HU, L.; SUGIMOTO, T.; IJIRI, Y.; TAKEDA, A.; NISHIYAMA, Y.; SATO, C.; MURAOKA, S.; TAMURA, A.; OSODA, T.; TSUDA, K. -i.; MIYAKAWA, T.; FUKUNISHI, H.; SHIMADA, J.; KUMASAKA, T.; YAMAMOTO, M.; KATAOKA, T. In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8182–8187, 14 maio 2013.

SHIMIZU, K.; GOLDFARB, M.; PERUCHO, M.; WIGLER, M. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 2, p. 383–7, jan. 1983.

SHIOZAWA, Y.; NIE, B.; PIENTA, K. J.; MORGAN, T. M.; TAICHMAN, R. S. Cancer stem cells and their role in metastasis. **Pharmacology & therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 285–93, maio 2013.

SINGH, S. K.; HAWKINS, C.; CLARKE, I. D.; SQUIRE, J. A.; BAYANI, J.; HIDE, T.; HENKELMAN, R. M.; CUSIMANO, M. D.; DIRKS, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396–401, 18 nov. 2004.

SOLIT, D. B.; ROSEN, N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 8, p. 772–774, 24 fev. 2011.

STEPHEN, A. G.; ESPOSITO, D.; BAGNI, R. K.; MCCORMICK, F. Dragging ras back in the ring. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 272–81, 17 mar. 2014.

SUBRAMANIAM, D.; HE, A. R.; HWANG, J.; DEEKEN, J.; PISHVAIAN, M.; HARTLEY, M. L.; MARSHALL, J. L. Irreversible multitargeted ErbB family inhibitors for therapy of lung and breast cancer. **Current cancer drug targets**, v. 14, n. 9, p. 775–93, 2015.

SUETSUGU, A.; NAGAKI, M.; AOKI, H.; MOTOHASHI, T.; KUNISADA, T.; MORIWAKI, H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 351, n. 4, p. 820–824, 29 dez. 2006.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-Binding Proteins. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 153–208, jan. 2001.

TANG, X.; LIU, D.; SHISHODIA, S.; OZBURN, N.; BEHRENS, C.; LEE, J. J.; HONG, W. K.; AGGARWAL, B. B.; WISTUBA, I. I. Nuclear factor-κB (nf-κB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. **Cancer**, v. 107, n. 11, p. 2637–2646, 1 dez. 2006.

TAVERAS, A. G.; REMISZEWSKI, S. W.; DOLL, R. J.; CESARZ, D.; HUANG, E. C.; KIRSCHMEIER, P.; PRAMANIK, B. N.; SNOW, M. E.; WANG, Y. S.; DEL ROSARIO, J. D.; VIBULBHAN, B.; BAUER, B. B.; BROWN, J. E.; CARR, D.; CATINO, J.; EVANS, C. A.; GIRIJAVALLABHAN, V.; HEIMARK, L.; JAMES, L.; LIBERLES, S.; NASH, C.; PERKINS, L.; SENIOR, M. M.; TSARBOPOULOS, A.; WEBBER, S. E. Ras oncoprotein inhibitors: the discovery of potent, ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 5, n. 1, p. 125–33, jan. 1997.

THOMAS, D.; THIAGARAJAN, P. S.; RAI, V.; REIZES, O.; LATHIA, J.; EGELHOFF, T. Increased cancer stem cell invasion is mediated by myosin IIB and nuclear translocation. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 47586–47592, 26 jul. 2016.

TOH, C.-K.; GAO, F.; LIM, W.-T.; LEONG, S.-S.; FONG, K.-W.; YAP, S.-P.; HSU, A. A. L.; ENG, P.; KOONG, H.-N.; THIRUGNANAM, A.; TAN, E.-H. Never-Smokers With Lung Cancer: Epidemiologic Evidence of a Distinct Disease Entity. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 15, p. 2245–2251, 20 maio 2006.

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. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 12, p. 4381–92, jun. 2000.

TURKE, A. B.; SONG, Y.; COSTA, C.; COOK, R.; ARTEAGA, C. L.; ASARA, J. M.; ENGELMAN, J. A. MEK Inhibition Leads to PI3K/AKT Activation by Relieving a Negative Feedback on ERBB Receptors. **Cancer Research**, v. 72, n. 13, p. 3228–3237, 1 jul. 2012.

VALENT, P.; BONNET, D.; DE MARIA, R.; LAPIDOT, T.; COPLAND, M.; MELO, J. V.; CHOMIENNE, C.; ISHIKAWA, F.; SCHURINGA, J. J.; STASSI, G.; HUNTLY, B.; HERRMANN, H.; SOULIER, J.; ROESCH, A.; SCHUURHUIS, G. J.; WÖHRER, S.; AROCK, M.; ZUBER, J.; CERNY-REITERER, S.; JOHNSEN, H. E.; ANDREEFF, M.; EAVES, C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 11, p. 767–775, 11 nov. 2012.

VALLE, S.; MARTIN-HIJANO, L.; ALCALÁ, S.; ALONSO-NOCELO, M.; SAINZ JR., B. The Ever-Evolving Concept of the Cancer Stem Cell in Pancreatic Cancer. **Cancers**, v. 10, n. 2, p. 33, 26 jan. 2018.

VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299–1304, 9 nov. 2001.

VIGIL, D.; CHERFILS, J.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 12, p. 842–857, 24 dez. 2010.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. **Cell stem cell**, v. 10, n. 6, p. 717–28, 14 jun. 2012.

WADDELL, N.; PAJIC, M.; PATCH, A.-M.; CHANG, D. K.; KASSAHN, K. S.; BAILEY, P.; JOHNS, A. L.; MILLER, D.; NONES, K.; QUEK, K.; QUINN, M. C. J.; ROBERTSON, A. J.; FADLULLAH, M. Z. H.; BRUXNER, T. J. C.; CHRIST, A. N.; HARLIWONG, I.; IDRISOGLU, S.; MANNING, S.; NOURSE, C.; NOURBAKHSH, E.; WANI, S.; WILSON, P. J.; MARKHAM, E.; CLOONAN, N.; ANDERSON, M. J.; FINK, J. L.; HOLMES, O.;

KAZAKOFF, S. H.; LEONARD, C.; NEWELL, F.; POUDEL, B.; SONG, S.; TAYLOR, D.; WADDELL, N.; WOOD, S.; XU, Q.; WU, J.; PINESE, M.; COWLEY, M. J.; LEE, H. C.; JONES, M. D.; NAGRIAL, A. M.; HUMPHRIS, J.; CHANTRILL, L. A.; CHIN, V.; STEINMANN, A. M.; MAWSON, A.; HUMPHREY, E. S.; COLVIN, E. K.; CHOU, A.; SCARLETT, C. J.; PINHO, A. V.; GIRY-LATERRIERE, M.; ROOMAN, I.; SAMRA, J. S.; KENCH, J. G.; PETTITT, J. A.; MERRETT, N. D.; TOON, C.; EPARI, K.; NGUYEN, N. Q.; BARBOUR, A.; ZEPS, N.; JAMIESON, N. B.; GRAHAM, J. S.; NICLOU, S. P.; BJERKVIG, R.; GRÜTZMANN, R.; AUST, D.; HRUBAN, R. H.; MAITRA, A.; IACOBUZIO-DONAHUE, C. A.; WOLFGANG, C. L.; MORGAN, R. A.; LAWLOR, R. T.; CORBO, V.; BASSI, C.; FALCONI, M.; ZAMBONI, G.; TORTORA, G.; TEMPERO, M. A.; GILL, A. J.; ESHLEMAN, J. R.; PILARSKY, C.; SCARPA, A.; MUSGROVE, E. A.; PEARSON, J. V.; BIANKIN, A. V.; GRIMMOND, S. M.; GRIMMOND, S. M. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 495–501, 26 fev. 2015.

WAINWRIGHT, E. N.; SCAFFIDI, P. Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. **Trends in cancer**, v. 3, n. 5, p. 372–386, 2017.

WANG, W.; ABBRUZZESE, J. L.; EVANS, D. B.; LARRY, L.; CLEARY, K. R.; CHIAO, P. J. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 1, p. 119–27, jan. 1999.

WEISS, B.; BOLLAG, G.; SHANNON, K. Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. **American journal of medical genetics**, v. 89, n. 1, p. 14–22, 26 mar. 1999.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 5, p. 843–846, 1 mar. 2005.

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. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14459–64, 30 maio 1997.

WIESMÜLLER, L.; WITTINGHOFER, F. Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. **Cellular signalling**, v. 6, n. 3, p. 247–67, mar. 1994.

WIGLER, M.; PELLICER, A.; SILVERSTEIN, S.; AXEL, R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. **Cell**, v. 14, n. 3, p. 725–31, jul. 1978.

WIN, H. Y.; ACEVEDO-DUNCAN, M. Atypical protein kinase C phosphorylates IKKαβ in transformed non-malignant and malignant prostate cell survival. **Cancer Letters**, v. 270, n. 2, p. 302–311, 8 nov. 2008.

WINTERS, I. P.; CHIOU, S.-H.; PAULK, N. K.; MCFARLAND, C. D.; LALGUDI, P. V.; MA, R. K.; LISOWSKI, L.; CONNOLLY, A. J.; PETROV, D. A.; KAY, M. A.; WINSLOW, M. M. Multiplexed in vivo homology-directed repair and tumor barcoding enables parallel quantification of Kras variant oncogenicity. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 2053, 12 dez. 2017.

WITTINGHOFER, A. (ed.). **Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1**. Vienna: Springer Vienna, 2014. WORONICZ, J. D.; GAO, X.; CAO, Z.; ROTHE, M.; GOEDDEL, D. V. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5339, p. 866–9, 31 out. 1997.

WRIGHT, L. P.; PHILIPS, M. R. *Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications* CAAX modification and membrane targeting of Ras. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 5, p. 883–891, maio 2006.

WU, Y.; ZHUANG, Y.; HAN, M.; XU, T.; DENG, K. Ras promotes cell survival by antagonizing both JNK and Hid signals in the Drosophila eye. **BMC Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 53, 20 out. 2009.

XIA, Y.; PADRE, R. C.; DE MENDOZA, T. H.; BOTTERO, V.; TERGAONKAR, V. B.; VERMA, I. M. Phosphorylation of p53 by IκB kinase 2 promotes its degradation by β-TrCP. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2629–2634, 24 fev. 2009.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF-κB, an active player in human cancers. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 9, p. 823–30, set. 2014.

XIA, Y.; YEDDULA, N.; LEBLANC, M.; KE, E.; ZHANG, Y.; OLDFIELD, E.; SHAW, R. J.; VERMA, I. M. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 257–265, 12 mar. 2012.

XU, G.; LO, Y.-C.; LI, Q.; NAPOLITANO, G.; WU, X.; JIANG, X.; DREANO, M.; KARIN, M.; WU, H. Crystal structure of inhibitor of κB kinase β. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 325–330, 20 abr. 2011.

XUE, W.; DAHLMAN, J. E.; TAMMELA, T.; KHAN, O. F.; SOOD, S.; DAVE, A.; CAI, W.; CHIRINO, L. M.; YANG, G. R.; BRONSON, R.; CROWLEY, D. G.; SAHAY, G.; SCHROEDER, A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G.; JACKS, T. Small RNA combination therapy for lung cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. E3553-61, 26 ago. 2014.

YAMAOKA, S.; COURTOIS, G.; BESSIA, C.; WHITESIDE, S. T.; WEIL, R.; AGOU, F.; KIRK, H. E.; KAY, R. J.; ISRAËL, A. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. **Cell**, v. 93, n. 7, p. 1231–40, 26 jun. 1998.

YAN, X.; LUO, H.; ZHOU, X.; ZHU, B.; WANG, Y.; BIAN, X. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. **Oncology Reports**, v. 30, n. 6, p. 2733–2740, dez. 2013.

YANG, J.; SPLITTGERBER, R.; YULL, F. E.; KANTROW, S.; AYERS, G. D.; KARIN, M.; RICHMOND, A. Conditional ablation of Ikkb inhibits melanoma tumor development in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 7, p. 2563–2574, 1 jul. 2010.

YANG, W.; XIA, Y.; CAO, Y.; ZHENG, Y.; BU, W.; ZHANG, L.; YOU, M. J.; KOH, M. Y.; COTE, G.; ALDAPE, K.; LI, Y.; VERMA, I. M.; CHIAO, P. J.; LU, Z. EGFR-Induced and PKCε Monoubiquitylation-Dependent NF-κB Activation Upregulates PKM2 Expression and Promotes Tumorigenesis. **Molecular Cell**, v. 48, n. 5, p. 771–784, 14 dez. 2012.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 15–33, 24 jun. 2009.

YUAN, T. L.; FELLMANN, C.; LEE, C.-S.; RITCHIE, C. D.; THAPAR, V.; LEE, L. C.; HSU, D. J.; GRACE, D.; CARVER, J. O.; ZUBER, J.; LUO, J.; MCCORMICK, F.; LOWE, S. W. Development of siRNA Payloads to Target KRAS-Mutant Cancer. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 10, p. 1182–1197, 1 out. 2014.

ZANDI, E.; ROTHWARF, D. M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 243–52, 17 out. 1997.

ZHANG, Y.; LAPIDUS, R. G.; LIU, P.; CHOI, E. Y.; ADEDIRAN, S.; HUSSAIN, A.; WANG, X.; LIU, X.; DAN, H. C. Targeting IκB Kinase β/NF-κB Signaling in Human Prostate Cancer by a Novel IκB Kinase β Inhibitor CmpdA. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, n. 7, p. 1504–1514, jul. 2016.

ZHOU, B.-B. S.; ZHANG, H.; DAMELIN, M.; GELES, K. G.; GRINDLEY, J. C.; DIRKS, P. B. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 10, p. 806–823, 1 out. 2009.

ZHOU, S.; SCHUETZ, J. D.; BUNTING, K. D.; COLAPIETRO, A.-M.; SAMPATH, J.; MORRIS, J. J.; LAGUTINA, I.; GROSVELD, G. C.; OSAWA, M.; NAKAUCHI, H.; SORRENTINO, B. P. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. **Nature Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1028–1034, 1 set. 2001.

ZIEGELBAUER, K.; GANTNER, F.; LUKACS, N. W.; BERLIN, A.; FUCHIKAMI, K.; NIKI, T.; SAKAI, K.; INBE, H.; TAKESHITA, K.; ISHIMORI, M.; KOMURA, H.; MURATA, T.; LOWINGER, T.; BACON, K. B. A selective novel low-molecular-weight inhibitor of I κ B kinase-β (IKK-β) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 178–192, maio 2005.

ZORDE KHVALEVSKY, E.; GABAI, R.; RACHMUT, I. H.; HORWITZ, E.; BRUNSCHWIG, Z.; ORBACH, A.; SHEMI, A.; GOLAN, T.; DOMB, A. J.; YAVIN, E.; GILADI, H.; RIVKIN, L.; SIMERZIN, A.; ELIAKIM, R.; KHALAILEH, A.; HUBERT, A.; LAHAV, M.; KOPELMAN, Y.; GOLDIN, E.; DANCOUR, A.; HANTS, Y.; ARBEL-ALON, S.; ABRAMOVITCH, R.; SHEMI, A.; GALUN, E. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 51, p. 20723–20728, 17 dez. 2013.

ZUBER, J.; TCHERNITSA, O. I.; HINZMANN, B.; SCHMITZ, A.-C.; GRIPS, M.; HELLRIEGEL, M.; SERS, C.; ROSENTHAL, A.; SCHÄFER, R. A genome-wide survey of RAS transformation targets. **Nature Genetics**, v. 24, n. 2, p. 144–152, fev. 2000.

SÚMULA CURRICULAR

Felipe Silva Rodrigues
Brasileiro, 24 anos, solteiro.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Recentemente aprovado no programa de doutorado do *Francis Crick Institute* / *University College London* (*UCL*) com início em setembro de 2018.

2016 – 2018 Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP
Orientadora: Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères
Período sanduíche (Jan/2018 – Jul/2018)
Beatson Institute for Cancer Research / University of Glasgow, UK
Supervisor do estágio no exterior: Dr. Daniel James Murphy

2012 – 2016 Graduação em Química
Habilitação em Biotecnologia, Agroindústria e Química Tecnológica
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP
Período sanduíche (Set/2014 – Ago/2015)
University of Nottingham, UK
Supervisora do estágio no exterior: Dra. Sally Paula Wheatley

2010 – 2011 Técnico em Química
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS

PUBLICAÇÕES

Artigos submetidos

CARNEIRO-LOBO, T. C.; SCALABRINI, L. C.; MAGALHÃES, L. S.; CARDEAL, L. B.; **RODRIGUES, F. S.**; dos SANTOS, E. O.; BALDWIN, A. S.; GIORDANO, R. J.; BASSÈRES, D. S. IKKβ targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: a potential anti-angiogenic therapeutic target.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2018 XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC), São Paulo, Brazil.

2018 Young Cancer Researchers Networking (YCRN), Translational Cancer Research Conference, Cork, Ireland.

2017 46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), São Paulo, Brazil.

2017 2nd Annual International Remote Conference: Science and Society, Beyond Sciences Initiative, Toronto, Canada.

2017 International Symposium of Frontiers of Knowledge in microRNA and RNA, São Paulo, Brazil.

PRÊMIOS

2018 *Crick PhD Programme Studentship – University tuition fees and tax-free stipend to cover the cost of living, University College London, UK.*

2018 *Vice-Chancellor's Scholarship for Research Excellence, University of Nottingham, UK.*

2017 *SBBq award* por melhor pôster apresentado na 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindoia, Brasil.

2017 *Best Oral Presentation, 2nd Annual International Remote Conference: Science and Society, University of Toronto, Canada.*

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS

2017 Monitor de Princípios do Desenvolvimento das Doenças. Faculdade de Medicina, FM-USP.

2017 Monitor do XII Curso de Inverno. Temas avançados em Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto de Química, IQ-USP.

2017 Monitor de Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo. Escola de Enfermagem, EE-USP.

2016 V Curso de Inverno. Respostas a danos no DNA: implicações em evolução, envelhecimento e câncer. Instituto de Ciências Biomédicas, ICB-USP.

2016 Monitor de Biologia Molecular. Departamento de Química, FFCLRP-USP.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado CAPES (Ago/2016 – Mar/2017), FAPESP (Processo n. 2016/22520-4, Abr/2017 – Set/2018) e FAPESP (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – Processo n. 2017/22125-0, Jan/2018 – Jul/2018).

IKKβ targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: a potential anti-angiogenic therapeutic target

Tatiana Correa Carneiro-Lobo[1], Luiza Coimbra Scalabrini[1], Leila da Silva[1] Magalhães[1], Laura B. Cardeal[1], Felipe Silva Rodrigues[1], Edmilson Ozorio dos Santos[1], Albert S. Baldwin[2], Ricardo J. Giordano[1], Daniela Sanchez Bassères[1*].

[1]Chemistry Institute, Department of Biochemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

[2]Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA.

[*] **Send correspondence to:** Daniela S. Bassères, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, Bloco 12 inferior, sala 1200, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. Phone: +1-55-11-3091-9805. FAX: +1-55-11-3091-2186. E-mail:basseres@iq.usp.br

Abstract

The ability of tumor cells to drive angiogenesis is an important cancer hallmark that positively correlates with metastatic potential and poor prognosis. Therefore, targeting angiogenesis is a rational therapeutic approach and dissecting proangiogenic pathways is important, particularly for malignancies driven by oncogenic KRAS, which are widespread and lack effective targeted therapies. Based on published studies showing that oncogenic RAS promotes angiogenesis by upregulating the proangiogenic NF-κB target genes IL-8 and VEGF, that NF-κB activation by KRAS requires the IKKβ kinase, and that targeting IKKβ reduces KRAS-induced lung tumor growth, we hypothesized that IKKβ inhibition would reduce KRAS-induced lung cancer angiogenesis. To test this hypothesis, we targeted IKKβ in KRAS-mutant lung cancer cell lines A549 and H358, both by siRNA-mediated transfection and by treatment with Compound A (CmpdA), a highly specific IKKβ inhibitor. Both pharmacological and siRNA-mediated IKKβ targeting reduced expression and secretion of NF-κB-regulated proangiogenic factors IL-8 and VEGF. Moreover, conditioned media from IKKβ-targeted lung cells reduced endothelial cell migration, invasion and tube formation *in vitro*. Furthermore, siRNA-mediated IKKβ inhibition reduced xenograft tumor growth and vascularity *in vivo*. Finally, IKKβ inhibition also affects endothelial cell function in a cancer-independent manner, as IKKβ inhibition reduced pathological retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. Taken together, these results indicate that IKKβ promotes KRAS-induced angiogenesis by both cancer cell-intrinsic and cancer cell-independent mechanisms, which strongly suggests IKKβ inhibition as a promising antiangiogenic approach to be explored for KRAS-induced lung cancer therapy.

Keywords

Angiogenesis, KRAS, IKKβ, lung cancer, IL-8, VEGF, Compound A

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide and KRAS-mutant lung cancers account for approximately 25% of non-small cell lung carcinomas (1 ,2). As with other KRAS-driven malignancies, KRAS-driven lung cancer lacks specific targeted therapies (3, 4). Most strategies currently being pursued to target KRAS involve inhibiting effectors that promote proliferation and survival, proteins that display synthetic lethality with mutant KRAS and proteins involved in mediating KRAS-induced metabolic changes (5, 6, 7). Interestingly, KRAS-targets involved in promoting tumor angiogenesis remain underexplored. This is surprising given the fact that the ability to drive angiogenesis is crucial, not only for primary tumor growth, but also for metastatic dissemination. Therefore, characterization of novel druggable targets involved in promoting KRAS-induced angiogenesis could lead to novel therapeutic alternatives for lung cancer, as well as other RAS-driven cancers.

Oncogenic Ras not only initiates tumor formation by stimulating proliferation, but also ensures tumor progression by promoting tumor angiogenesis (8, 9). Different pathways downstream of oncogenic Ras have been implicated in promoting tumor angiogenesis ultimately by leading to transcriptional upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXC chemokine interleukin-8 (IL-8) (8, 10-13). Both VEGF and IL-8 have been shown to play an essential role in tumor angiogenesis mediated by Ras (10, 14, 15). VEGF inhibition by antisense technology in KRAS-mutated colon cancer cell lines blocks their ability to form xenograft tumors, whereas VEGF expression in nontumorigenic KRAS wildtype isogenic cell lines partially restores their tumorigenicity (14). In addition, when compared to HRAS-transformed wildtype murine embryonic fibroblasts (MEFs), HRAS-transformed VEGF null MEFS display impaired ability to grow as fibrosarcomas *in vivo* due to reduced vascular density and permeability (15). Finally, inhibition of oncogenic Ras expression or administration of an IL-8 neutralizing antibody in $HRAS^{V12}$ Hela cell xenografts inhibits tumor vascularization and attenuates tumor growth (10). Interestingly, both VEGF and IL-8 are targets of the transcription factor NF-κB (16), which, in turn, is activated by oncogenic KRAS in lung tumors *in situ* and is required for KRAS-induced lung tumorigenesis (17, 18).

Canonical NF-κB activation under most circumstances is mediated by activation of the IkappaB kinase (IKK) complex, which is comprised of two catalytic subunits (IKKα and IKKβ) and a regulatory subunit (IKKγ). Once activated, the IKK complex phosphorylates the inhibitory protein IκBα (IκBα), which interacts with NF-κB and sequesters it in the cytoplasm. Upon phosphorylation by IKK, IκBα undergoes rapid ubiquitination and proteasome-mediated degradation, thereby releasing NF-κB to translocate to the nucleus where it regulates target gene transcription (16). Not surprisingly, NF-κB activation by oncogenic KRAS in the lung involves the IKK complex. In fact, Duran et al (19) showed that oncogenic KRAS activates the IKK complex through the signaling adaptor p62 and TRAF6. In addition, NF-κB activity in both murine and human KRAS-transformed lung cancer cells requires IKKβ kinase activity (18).

Based on this evidence, we hypothesized that targeting the IKKβ kinase, which is a druggable target in the KRAS-mediated NF-κB activation pathway, would limit lung tumor growth by inhibiting KRAS-induced angiogenesis. In support of this hypothesis, endothelial deletion of IKKβ during development leads to partial embryonic lethality due to impaired liver angiogenesis and formation of hypovascular placentae (20, 21). Adult mice with endothelial deletion of IKKβ display increased vascular permeability and decreased vascular migration capacity (21). Finally, we and others have shown that IKKβ targeting only minimally affects KRAS-mutant lung cell growth *in vitro*, nonetheless it significantly reduces KRAS-induced lung tumor growth *in situ* (22, 23).

Here, we show that VEGF and IL-8 secretion by KRAS-positive lung cancer cells requires IKKβ. Moreover, conditioned media from IKKβ-targeted KRAS-mutant lung cells reduces endothelial cell migration, invasion and tube formation *in vitro*. Furthermore, siRNA-mediated IKKβ inhibition reduces KRAS-positive lung cancer xenograft tumor growth and vascular density *in vivo*. Finally, we determined that IKKβ inhibition can affect endothelial cell function in a cancer-independent manner as well, as systemic IKKβ inhibition therapy reduces pathological retinal angiogenesis in a mouse model of neonatal retinopathy. Taken together, these results suggest that IKKβ is an important mediator of KRAS-induced angiogenesis, and that IKKβ promotes angiogenesis both by cancer cell-dependent and -independent mechanisms. Therefore, IKKβ inhibition therapy may provide a clinical therapeutic benefit for lung cancer patients harboring KRAS mutations.

Material and Methods

Cell Culture

Cell passages were kept to a minimum and no cells were passaged continuously for more than six months. Human non-small cell lung cancer cell lines harboring KRAS mutations A549 ($KRAS^{G12S}$; ATCC CCL-185) and H358 ($KRAS^{G12C}$; ATCC CRL-5807) were grown in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich). Cells were treated with the IKKβ inhibitor Compound A (CmpdA) (24) (Bayer) or vehicle control dimethyl sulfoxide (0.1% DMSO) as indicated (see figure legends). HUVEC Cells (Lonza Group) were cultured at 37°C, 5% (v/v) CO_2 in endothelial growth medium (EGM, Lonza Group) supplemented with epidermal growth factor (hEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), R3-insulin-like growth factor-1 (R3-IGF-1), ascorbic acid, hydrocortisone, human fibroblast growth factor β (hFGF-β), heparin, FBS, and gentamicin/amphotericin-B (GA).

siRNA Transfections

Cells were seeded in 6-well-plates at a density of 1 x 10^5 cells/well 12 hours before transfection and siRNA transfections were performed with 50 ηM of either a non-targeting siRNA control or siRNA smartpools targeting IKKβ or KRAS (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. Cells were collected for RNA analysis 72 hours after transfection and for protein analysis 96 hours after transfection.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol. To synthesize cDNA, 1 µg RNA and Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) were used, followed by real-time PCR analysis performed in a 7300 Real-Time PCR System Step (Applied Biosystems) using SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and 200 ηM gene-specific forward or reverse primers designed using Primer Express 3 software (Applied Biosystems). The sequences used for each primer pair were as follows: IKKβ (F, 5'-GCCCTTCCTCCCCAACTG-3' and R, 5'-TCTTCTGCCGCATTTTGAA-3'), KRAS (F, 5'-CCCAGGTGCGGGAGAGA-3' and R, 5'-CAGCTCCAACTACCACAAGTTT-3'), GAPDH (F, 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' and R, 5'-ACCGAGCCATTTCATTTCTG-3'), IL-8 (F, 5'-CTGGACCCCAAGGAAAACTG-3' and R, 5'-TGTGCCATCAACCTTACCAATAA-3'); and VEGF (F, 5'-AGTGGTGAAGTTCATGGATGT-3' and R, 5'-GCACACAGGATGGTTGAAGA-3)'. Relative quantitation was performed by the ΔΔCt method using GAPDH as endogenous control.

Western Blotting

Whole cell lysates were prepared using RIPA buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40) containing protease and phosphatase inhibitors (1 µg/mL leupeptin, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4). Lysates (25 µg protein/lane) were electrophoresed in 12 to 15% polyacrylamide minigels, using Mini-PROTEAN® vertical electrophoresis cell (Bio-Rad). Electrophoresis was conducted with running buffer containing 25 mM Tris, 190 mM glycine, and 0.1% SDS, at 120 V for 60-90 minutes. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), with Towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) at 30 V for 16 hours. Membranes were blocked with 5% BSA in TBST (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) for 1 hour. Finally, membranes were incubated with primary antibodies, followed by incubation with fluorescently labelled secondary antibodies. Fluorescence detection was performed using ODYSSEY (Li-Cor Biosciences). The following primary antibodies were used: anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actin (Sigma-Aldrich), anti-PanRAS (Merck Millipore), anti-IKKβ (Cell Signaling Technology), anti-phospho-$I\kappa B\alpha^{Ser32}$ (Cell Signaling Technology) and anti-IκBα (Cell Signaling Technology). Primary antibodies were used at a dilution of 1:1000 in TBST, containing 5% BSA and 0.1% NaN_3, and incubated for 16 hours at 4°C, with the exception of the anti-β-actin antibody, that was used at a 1:7000 dilution. The following secondary antibodies were used: anti-rabbit Alexa Fluor® 680 (Thermo Fisher Scientific) and anti-mouse Alexa Fluor® 680 (Thermo Fisher Scientific). All secondary antibodies were used at a dilution of 1:15000 in TBST and incubated for 1 hour at room temperature. Protein bands of interest were quantitated by densitometry using ImageJ software, expressed relative to the endogenous control (β-actin or GAPDH) and normalized to the reference sample as indicated in the figure legends.

ELISA Assay

A549 or H358 cells were transfected with siRNAs as previously described and at 96 hours post-transfection, the culture medium was replaced with serum-free medium for 24 hours and the culture medium was collected and stored at -80°C until analysis. IL-8 and VEGF protein levels in the culture medium were measured by ELISA assay using commercially available CytoSet Human IL-8/CXCL8 Quantikine kit and CytoSet Human VEGF Quantikine kit (R&D Systems), respectively, as described by the manufacturer.

Migration and Invasion Assays

Migration assays were performed using 24-well transwell inserts with 8 μm pore membrane filters (Corning) and invasion assays were performed using matrigel-coated 24-well transwell inserts with 8 μm pore membrane filters (Corning). For both assays, conditioned medium from A549 cells transfected with a non-targeting control siRNA (siCtrl) or with siRNA smartpools targeting KRAS (siKRAS) or IKKβ (siIKKβ) was collected at 96 hours post-transfection and 500 μl were added to the lower chamber to be used as chemoattractant. 1 x 10^5 HUVEC cells were resuspended in 500 μl serum-free medium, added to the upper chamber and incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO_2. Nonmigrating cells were scraped off the upper surface of the membrane with a cotton swab, and migrating cells on the bottom surface were stained with crystal violet. Images were obtained under an IX51 Inverted Microscope (Olympus). Cells from five random fields of view from three independent experiments were counted.

Tube Formation Assay

Formation of capillary-like structures (tubes) was assessed in a matrigel-coated 24-well plate. Briefly, 250 μl/well of reduced growth factor matrigel (BD Biosciences) were transferred to a 24-well plate on ice and allowed to gellify at 37° C for 30 minutes. A549 cells were transfected as described above with a non-targeting control siRNA (siCtrl) or with a siRNA smartpool targeting IKKβ (siIKKβ) and conditioned medium was collected at 96 hours post-transfection. HUVECs were resuspended in conditioned medium as indicated above and were seeded at a density of 1 x 10^5 cells per well in a final volume of 300 μL and incubated at 37°C for 6 hours. Capillary-like tube formation was observed, and images were obtained under an IX51 Inverted Microscope (Olympus). Numbers of closed capillary tubes were counted in five visual fields per condition from three independent experiments.

Tumor growth assay

siRNA-transfected A549 cells (1 x 10^6) were resuspended in 100 μl RPMI medium and subcutaneously inoculated into each flank of 6-week-old, male Balb/C nude mice in pathogen-free conditions at the University of São Paulo Chemistry Institute Animal Facility. Mice were monitored every 3 days for the appearance of tumors, and tumor volumes were determined by direct diameter measurement with a caliper. Animals were

sacrificed by CO_2 euthanasia 55 days after inoculation, and tumor weight was determined. Tumor volumes were calculated using the following equation: width^2 x length x 0.5.

Immunofluorescence

Xenograft tumors were dissected, incubated for 1 hour with 4% paraformaldehyde and allowed to soak in 30% sucrose overnight. Tumors were then embedded in OCT compound (Tissue-Tek) and processed into 14 µm sections using a cryostat (Microm HM 500 OMV Cryostat Microtome). Sections were air-dried for 2 hours at room temperature and stored at -80°C. On the day of the experiment, sections were rehydrated in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) for 10 minutes and blocked in PBS containing 0.2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 1 hour at room temperature. Next, sections were incubated overnight at 4°C with 1:10 dilution of the CD31 antibody (PECAM, rat monoclonal, clone MEC13.3, BD Pharmingen), washed with PBS and incubated for 2 hours at room temperature with 1:200 dilution of anti-mouse Alexa-647-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Finally, slides were mounted in gel/mount (Biomeda Corp) and analyzed under an Axioskop microscope equipped with Axiocam MRc5 camera (Zeiss).

Oxygen-induced retinopathy (OIR) model analysis

A well-established mouse model of oxygen-induced retinopathy was performed as reported (25, 26). Briefly, litters of newborn C57BL/6 mice on postnatal day 7 and their mothers were placed in an airtight incubator and exposed to an atmosphere of 75% O_2 (hyperoxia) for 5 days. Incubator temperature was maintained at 23°C, and O_2 was measured three times per day with an oxygen analyzer. On postnatal day 12, mice were returned to room air. CmpdA (10 mg/Kg body weight) was administered subcutaneously or intraperitoneally on postnatal days 12, 14 and 16. Vehicle alone (DMSO) or PBS were administered similarly as controls. Animals were sacrificed by CO_2 euthanasia on postnatal day 17, the eyes were removed with a curved forceps and were immediately fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes. Using a dissecting forceps, the cornea was cut and the retinas isolated. Retinas were then permeabilized for 30 minutes by incubation in PBS containing 0.5% Triton X-100 and stained with GS-IB4 isolectin conjugated to Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific) overnight at 4°C (10 µg/ml in PBS 0.5% Triton X-100). Under a dissecting microscope four incisions were made on the retina at 90-degree angles, forming four similarly sized quadrants united by the retina centre, the optic nerve region. The retinas were mounted on glass slides with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) and covered with cover slips. Images were obtained on a fluorescence zoom microscope Axio Zoom V16 (Zeiss). Quantitation of angiogenic vessels was made in Adobe Photoshop as described (25, 26). Briefly, using the polygonal lasso tool, the entire retina was selected and the total number of pixels was obtained in the histogram. Next, using the magic wand tool, the vascular area was selected, and the number of pixels was obtained. The angiogenic area was calculated as a percentage of the total retinal area as follows: number of pixels of angiogenic vessels / number of pixels of the entire retina x 100.

Statistical analysis

All values are presented either as average ± SD or as representative images of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using Prism 5 (GraphPad Software). All data have been evaluated for normality of distribution. In order to assess differences within groups, we used one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. For pairwise comparisons, we used a non-parametric Student's t test. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

Results

IKKβ targeting in KRAS-positive lung cells reduces IL-8 and VEGF expression and secretion.

Given our hypothesis that IKKβ promotes KRAS-induced angiogenesis, which relies on KRAS-induced VEGF and IL-8 secretion (10, 14), and given that VEGF and IL-8 are transcriptional targets of NF-κB (16), a transcription factor activated by oncogenic KRAS in the lung in an IKKβ-dependent manner (18), we decided to investigate whether IKKβ targeting would affect VEGF and IL-8 expression. In order to do that, we first tested whether Compound A (CmpdA), a highly specific IKKβ inhibitor, could inhibit IKKβ-mediated signaling in KRAS-mutant A549 and H358 cells. As can be seen in Fig. 1a, CmpdA treatment reduced phosphorylation of the IKKβ substrate IκBα while, at the same time, it increased total IκBα levels (Fig. 1a), thus confirming CmpdA's inhibitory activity. Next, we tested whether IKKβ targeting with CmpdA would reduce VEGF and IL-8 expression. In agreement with our hypothesis, IKKβ targeting with CmpdA in A549 and H358 cells significantly reduced VEGF and IL-8 expression (Fig. 1b). Next, we specifically targeted KRAS or IKKβ expression by siRNA-mediated transfection, which resulted in decreased RAS protein levels and led to undetectable levels of IKKβ protein (Fig. 1c). Because the antibody used to detect RAS, recognizes all three RAS isoforms (H-, K- and NRAS), we also used qPCR to evaluate the efficacy of our siRNA-mediated targeting. As can be seen in Fig. 1d, transfection of A549 and H358 cells with a siRNA smartpool targeting KRAS decreased KRAS mRNA levels by 96.5% and 88.7%, respectively. Transfection of A549 and H358 cells with a siRNA smartpool targeting IKKβ led to a similar reduction of IKKβ mRNA levels (of 84.7% and 60.87%, respectively) (Fig. 1d). These results indicate that our siRNA-mediated silencing approach was effective. As expected, KRAS silencing reduced IL-8 mRNA expression by 70.88% and 55.01% and VEGF mRNA expression by 30.95% and 20.78% in A549 and H358 cells respectively (Fig. 1e). Consistent with the idea that IKKβ mediates KRAS-induced IL-8 and VEGF expression, siRNA-mediated IKKβ silencing in A549 and H358 cells caused a reduction in IL-8 and VEGF expression that matched the one observed by KRAS silencing: a reduction of 69.29% and 61.35% in IL-8 mRNA levels and of 21.53% and 33.18% in VEGF mRNA levels in A549 and H358 cells respectively (Fig. 1f). More meaningfully, both KRAS and IKKβ siRNA-mediated silencing in KRAS-mutant cells led to reduced VEGF and IL-8 secretion (Fig. 1g). These results

indicate that IKKβ promotes KRAS-induced expression and secretion of proangiogenic factors VEGF and IL-8.

IKKβ targeting in KRAS-mutant lung cancer cells decreases endothelial cell migration, invasion and tube formation *in vitro*

For neovascularization to occur, such as during tumor angiogenesis, endothelial cells have to migrate in response to proangiogenic factors and have to self-organize into tubular structures that will give rise to new vessels (27). Since we have shown that IKKβ targeting in KRAS-positive cells reduces VEGF and IL-8 secretion, we decided to investigate how IKKβ targeting in KRAS-mutant cancer cells would affect endothelial cell migration, invasion and tube formation *in vitro*. For that purpose, we evaluated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) migration and invasion using transwell assays, where conditioned medium from A549 cells with siRNA-mediated inhibition of KRAS or IKKβ was used as chemoattractant. Compared to conditioned medium from A549 cells transfected with a nontargeting siRNA control, conditioned medium from KRAS- or IKKβ-targeted A549 cells reduced HUVEC migration (Fig. 2a) and invasion (Fig. 2b). Even though KRAS targeting was more effective than IKKβ targeting in reducing HUVEC migration (96.5% versus 68.19%, Fig. 2a), IKKβ targeting was more effective than KRAS targeting in reducing HUVEC invasion (60.1% versus 32.4%, Fig. 2b). Nonetheless, in both cases the reduction in HUVEC migration and invasion caused by IKKβ targeting was significant. In accordance, when compared to conditioned medium from A549 cells transfected with a nontargeting siRNA control, conditioned medium from IKKβ-targeted A549 cells decreased by 66.6% the ability of HUVEC cells to form tubular structures *in vitro* (Fig. 2c). Even though other IKKβ-independent pathways may contribute to KRAS-induced angiogenesis, our data indicate that IKKβ is an important mediator of KRAS-induced proangiogenic effects.

siRNA-mediated IKKβ targeting in KRAS-mutant lung cancer cells reduces tumor growth and angiogenesis *in vivo*

We have recently shown, using a mouse model of KRAS-induced lung cancer, that IKKβ targeting with CmpdA reduces lung tumor growth and vascular density *in situ* (23). However, as IKKβ was systemically targeted, the contribution of cancer cell-intrinsic IKKβ activity for tumor angiogenesis was not clear. More importantly, because mice do not have an IL-8 homolog (28), the contribution of this human-specific proangiogenic pathway, which is required for RAS-induced angiogenesis (10), cannot be addressed in this model. Therefore, to evaluate whether cancer cell-intrinsic IKKβ activity is required for KRAS-induced angiogenesis in human tumors, we performed xenograft studies with human A549 cells with siRNA-mediated IKKβ silencing. Even though IKKβ-targeted A549 cells still formed xenograft tumors in nude mice, when compared to A549 cells expressing a non-targeting siRNA control, IKKβ-targeted A549 cells formed smaller tumors (Fig. 3a). IKKβ targeting resulted in decreased tumor growth over time (Fig. 3b) and in reduced tumor weight at the endpoint (Fig. 3c). In addition, as assessed by immunofluorescence for CD31, a specific endothelial marker, IKKβ targeting reduced tumor vascular density by 52.8% (Fig. 3d). These results indicate that cancer cell-

intrinsic IKKβ activity contributes to KRAS-mutant human lung tumor growth and angiogenesis.

IKKβ also affects endothelial function by cancer cell-independent pathways

In order to determine whether IKKβ can affect pathological cancer cell-independent angiogenesis *in vivo*, we used a well-established model of oxygen-induced retinopathy (OIR) caused by pathological retinal neovascularization (29, 30). This model has been widely used to study the molecular mechanisms of blood vessel formation during relative hypoxia and to assess the effect of compounds on angiogenesis (25, 30, 31). To induce OIR, newborn mice are exposed to 75% oxygen from postnatal day 7 to postnatal day 12. Hyperoxia exposure causes vase-obliteration of immature retinal vessels and suppresses postnatal retinal angiogenesis, which is a natural process of murine vascular retinal maturation (32). Subsequently, mice are transferred back to normoxia. The relative reduction in oxygen levels leads to pathological retinal neovascularization, which is maximal at postnatal day 17, and regresses thereafter (25). To evaluate whether IKKβ targeting could reduce the pathological retinal neovascularization observed in this model, mice submitted to OIR were treated with CmpdA (10 mg/kg) subcutaneously or intraperitoneally at postnatal days 12, 14 and 16. As can be seen in Fig. 4, when compared with animals treated with DMSO or PBS, animals treated with CmpdA subcutaneously or intraperitoneally displayed retinas with markedly decreased vascular area. These results indicate that IKKβ targeting decreases pathological retinal neovascularization *in vivo*, which suggests that IKKβ also likely contributes to angiogenesis through cancer cell-independent pathways.

Discussion

Like normal cells, cancer cells require oxygen and nutrients to survive and proliferate. It is not surprising, therefore, that one of the hallmarks of cancer is the ability of cancer cells to drive tumor angiogenesis (33). This ability to continuously drive the sprouting of new vessels from pre-existing ones, not only sustains neoplastic growth of primary tumors, but is also a feature of invasive tumors, as it is required for metastatic tumor growth (34, 35). In fact, in a wide variety of malignancies, tumor vascular density positively correlates with increased metastatic potential and poor prognosis (35). Considering that metastatic disease is the main cause of cancer mortality, targeting angiogenesis is a rational approach to prevent both primary tumor growth and malignant progression, thus improving survival.

Nonetheless, even though several antiangiogenic therapeutic targets have been identified, safe and effective antiangiogenic strategies to treat cancer patients have not yet been translated into the clinic (34). For example, tumor response to therapies targeting the VEGF signaling pathway is short-lived and limited by development of resistance followed by restoration of tumor growth and progression, likely due to activation of alternative proangiogenic pathways (36). In that sense, dissecting the proangiogenic pathways induced by dominant oncogenes might uncover upstream signaling nodes that

may control different proangiogenic pathways and provide better and more specific avenues to target tumor angiogenesis.

Dissection of proangiogenic pathways is particularly important for malignancies driven by the RAS oncogene, not only because oncogenic RAS is known to induce tumor angiogenesis, but also because RAS-driven malignancies are widespread and lack effective targeted therapies (3, 4).

RAS-induced angiogenesis relies on the upregulation of proangiogenic factors VEGF and IL-8. In fact, VEGF or IL-8 targeting reduces RAS-induced angiogenesis and tumor growth (10, 14, 15). Interestingly, VEGF and IL-8 have also been shown to be upregulated by the transcription factor NF-κB to promote glioblastoma angiogenesis (37), and we and others have shown that NF-κB activation by KRAS is required for KRAS-induced lung tumorigenesis (17, 18). Given that we had previously shown that NF-κB activation by KRAS in the lung requires the IKKβ kinase (18), and that systemic IKKβ targeting reduced KRAS-induced lung tumor growth (23), we hypothesized that IKKβ, which is a druggable target in the KRAS-induced NF-κB activation pathway, would be involved in mediating KRAS-induced angiogenesis.

To test our hypothesis, we first investigated whether IKKβ targeting would interfere with IL-8 and VEGF expression and secretion downstream of oncogenic KRAS. IKKβ has been shown to promote VEGF and IL-8 expression in different studies (38-44). For example, Lee et al (38) have found that IKKβ promotes both transcriptional upregulation of VEGF expression, but also enhanced VEGF translation via mTOR. In addition, IKKβ deletion in hematopoietic cells prevents hypoxia-induced HIF-1α and VEGF expression (39) and decreased VEGF expression is also observed in IKKβ null MEFS (40). Moreover, conditional IKKβ deletion in the airway epithelium leads to impaired alveolar maturation associated with decreased VEGF expression (41) and the IKKβ inhibitor IMD-0354 suppresses VEGF production from ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* (42). IKKβ has also been shown to promote IL-8 expression by binding to its promoter via interactions with p65 and EGR1 (43) and, in ovarian cancer cells, pharmacological IKKβ targeting reduces bortezomib-induced IL-8 expression (44). Finally, we have previously shown that IL-8 expression is induced in primary immortalized lung epithelial cells transformed by KRAS, and that IKKβ targeting with CmpdA in these cells blocks KRAS-induced IL-8 expression (18). Here we show, not only that siRNA-mediated KRAS targeting reduces expression and secretion of IL-8 and VEGF in KRAS-mutant A549 and H358 cells as expected, but also that targeting IKKβ pharmacologically or by RNA interference in these cells similarly reduces both VEGF and IL-8 expression and secretion (Fig. 1). These results, coupled with the abovementioned findings, corroborate our hypothesis that, in lung cancer, KRAS upregulates VEGF and IL-8 via IKKβ. And understanding this pathway is important considering that, in NSCLC, expression of both IL-8 and VEGF is associated with angiogenesis, lymph node metastasis, and unfavorable outcome (45, 46, 47).

Furthermore, conditioned medium from KRAS- or IKKβ-targeted cells reduced the ability of endothelial HUVEC cells to migrate, invade and form tubular structures *in vitro*

(Fig. 2) and siRNA-mediated IKKβ targeting reduced KRAS-positive lung xenograft tumor vascular density *in vivo* (Fig. 3). Even though IKKβ activity in endothelial cells is important for endothelial cell activation and vasculogenesis,[21] and even though systemic IKKβ inhibition reduces ovarian xenograft tumor vascular density (42), our results show, for the first time, that efficient tumor angiogenesis in KRAS-mutant lung tumor xenografts requires cancer cell-intrinsic IKKβ activity. This supports our hypothesis that KRAS-induced IKKβ activation in cancer cells promotes lung tumor angiogenesis.

Even though murine cells express a homolog of the IL-8 receptor, which responds to human IL-8, mice do not have an IL-8 homolog (28). Therefore, considering that IL-8 is a critical mediator of RAS-induced angiogenesis (10), this important RAS-induced proangiogenic pathway can only be investigated in human models. Previously, we have shown that systemic treatment of murine KRAS-induced lung tumors with CmpdA was, not only able to block IKKβ activity in lung tumor cells *in situ*, but also reduced tumor vascular density (23). Here, we show that IKKβ targeting also reduces vascular density of IL-8-secreting human lung tumor xenografts, thereby further validating IKKβ as an antiangiogenic therapeutic target for human KRAS-induced lung cancer.

In parallel to reducing vascular density, siRNA-mediated IKKβ targeting in KRAS-mutant A549 cells reduced lung tumor xenograft growth (Fig. 3), corroborating many studies that clearly show an important role for IKKβ in promoting oncogenesis (38, 48-54). For example, conditional loss of IKKβ prevents tumorigenesis in mouse models of colitis-associated cancer (48) and KRAS-induced pancreatic cancer (54). IKKβ is overexpressed in breast cancers (52), where it, not only activates mTOR, thereby promoting tumor angiogenesis, but its expression correlates with poor clinical outcome (38). Ribozyme-mediated IKKβ targeting in a melanoma mouse model reduces tumor growth and prolongs survival (53). More importantly, our results with human xenograft tumors also corroborate previous murine tumor studies showing that genetic or pharmacological IKKβ targeting reduces murine KRAS-induced lung tumor growth (22, 23, 55), thereby further underscoring IKKβ inhibition as a promising approach for KRAS-induced lung cancer therapy.

Nonetheless, when considering systemic antiangiogenic cancer therapies, one must consider how target inhibition in normal cells, such as the ones present in the tumour microenvironment, might affect therapeutic outcome. The studies described above, where IKKβ was targeted systemically, cannot answer this question, because these studies cannot distinguish the effects of IKKβ inhibition in other cell types from cancer cell-intrinsic IKKβ inhibition. Interestingly, studies where IKKβ was specifically inhibited in different cell types show that, whereas IKKβ activity in endothelial cells is important for vasculogenesis (21) and myeloid-specific IKKβ activity promotes colon tumorigenesis (48), IKKβ activity in cancer-associated fibroblasts seems to actually have the opposite effect, suppressing angiogenesis and tumor growth (56). Nonetheless, these studies also have limitations as they study IKKβ inhibition in specific cell compartments and do not take into account how simultaneous IKKβ targeting of these normal compartments would affect angiogenesis. Here we show, using a cancer cell-independent *in vivo* model of pathological angiogenesis, the oxygen-induced retinopathy (OIR) model (29, 30), that

systemic CmpdA therapy reduces pathological retinal neovascularization (Fig. 4). This observation is important for two reasons. First, it indicates that CmpdA crosses the blood-brain barrier and might be a promising stand-alone or coadjuvant therapeutic approach to treat retinal diseases related to abnormal angiogenesis, such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration (AMD). In support of this idea, IKKβ inhibition in a mouse model of diabetic retinopathy decreased vessel leakage, thus preserving vascular integrity (57). In addition, Lu et al have shown that conditional deletion of IKKβ in the retina or intravitreal or retrobulbar injection of TPCA-1, an IKKβ inhibitor, reduced laser-induced choroidal neovascularization, which mimics the aberrant angiogenesis associated with AMD (58). Contrary to TPCA-1, which was associated with significant toxicity (22), CmpdA is well tolerated in mice (23, 24, 59), and might therefore be a better option for AMD therapy.

Second and most important, our observation that systemic IKKβ targeting reduces pathological neovascularization in the OIR model suggests that systemic IKKβ inhibition might be an effective antiangiogenic therapy for KRAS-induced lung tumours, and maybe even for other KRAS-driven tumours, by acting both on cancer cells and on microenvironment cells to reduce angiogenesis.

In summary, we have identified IKKβ as a mediator of KRAS-induced angiogenesis in lung cancer in part by promoting secretion of proangiogenic factors VEGF and IL-8. More importantly, we have shown that siRNA-mediated IKKβ targeting in KRAS-positive lung cells decreases KRAS-induced tumor growth and angiogenesis *in vitro* and *in vivo* and that systemic IKKβ inhibition with CmpdA in an *in vivo* model of OIR also reduces pathological angiogenesis. Taken together, these results indicate that IKKβ promotes KRAS-induced angiogenesis by both cancer cell-intrinsic and cancer cell-independent mechanisms, which strongly suggests IKKβ inhibition as a promising antiangiogenic approach to be explored for KRAS-induced lung cancer therapy and possibly also for therapy of other KRAS-driven malignancies.

Ethics Statement

All animal studies were carried out in accordance with the guidelines and regulations for research and teaching involving animals of the National Counsil for Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA). The study protocols were approved by the Animal Use Ethics Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) of the Chemistry Institute of the University of São Paulo.

Data Availability

The materials and datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

This work was supported by a Young Investigator Grant (2010/52685-9) and a Research Grant (2016/19757-2) from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to D.S.B., a NIH grant (1R35CA197684) to A.S.B., by a FAPESP postdoctoral fellowship to T.C.C-L, by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Ph.D. fellowships to E.O.S. and L.C.S. This work was also supported by the graduate program in Biochemistry and Molecular Biology of the University of São Paulo, which is sponsored by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Authors' contributions

TCCL participated in the study design, performed most *in vitro* and *in vivo* studies, analyzed results and drafted the manuscript. LCS performed some of the migration and tube formation assays, analyzed results and helped to draft the manuscript. LSM and LBC performed the retina dissection and isolectin staining and analyzed the data; FSR performed the western blotting experiments with CmpdA treatment; EOS performed the western blotting experiments with siRNA-mediated transfection; ASB provided the inhibitor CmpdA for the study and holds the material transfer agreement with Bayer. RJG participated in the OIR model design and data analysis, and the retina dissection and staining were performed in his laboratory using his grant resources. DSB conceived of the study and participated in its design and coordination and helped to draft and revise the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be considered as potential conflict of interest.

References

1. Ohtaki Y, Shimizu K, Kakegawa S, Nagashima T, Nakano T, Atsumi J, et al. Postrecurrence survival of surgically resected pulmonary adenocarcionama patients according to EGFR and KRAS mutation status. *Mol Clin Oncol*. (2014) 2(2): 187-196. doi: 10.3892/mco.2013.237

2. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, Ostoros G, Raso E, Timar J, et al. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Sci Rep*. (2017) 7: 39721. doi: 10.1038/srep39721

3. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* (2014) 25(3): 272-281. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.017

4. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. (2014) 13(11): 828-851. doi: 10.1038/nrd4389

5. Downward, J. RAS synthetic lethal screens revisited: still seeking the elusive prize? *Clin Cancer Res*. (2015) 21(8): 1802-1809. doi: 10.1158/1078-0432

6. Kimmelman, A.C. Metabolic dependencies in RAS-driven cancers. *Clin Cancer Res*. (2015) 21(8): 1828-1834. doi: 10.1158/1078-0432

7. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS mutant pancreatic cancer: No lone path to an effective treatment. *Cancers* (Basel) (2016) 8(4): 45. doi: 10.3390/cancers8040045

8. Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim Biophys Acta*. (2004) 1654(1): 23-37. doi: 10.1016/j.bbcan.2003.09.004

9. Tang Y, Kim M, Carrasco D, Kung AL, Chin L, Weissleder R. In vivo assessment of RAS-dependent maintenance of tumor angiogenesis by real-time magnetic resonance imaging. *Cancer Res*. (2005) 65(18): 8324-8330. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0027

10. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* (2004) 6(5); 447-458. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.028

11. Matsuo Y, Campbell PM, Brekken RA, Sung B, Ouellette MM, Fleming JB, et al. K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized pancreatic epithelila cells through mitogen-activatd protein kinase signaling pathways. *Mol Cancer Res*. (2009) 7(6): 799-808. doi: 10.1158/1541-7786

12. Sunaga N, Imai H, Shimizu K, Shames DS, Kakegawa S, Girard L, et al. Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* (2012) 130(8): 1733-1744. doi: 10.1002/ijc.26164

13. Murillo MM, Zelenay S, Nye E, Castellano E, Lassailly F, Stamp G, et al. RAS interation with PI3K p11α is required for tumor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. (2014) 124(8): 3601-3611. doi: 10.1172/JCI74134

14. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95(7): 3609-3614

15. Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, Hanahan D, Johnson RS. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res*. (1999) 59(7): 1592-1598

16. Bassères DS, Baldwin, AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* (2006) 25(51); 6817-6830. doi: 10.1038/sj.onc.1209942

17. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, *et al.* Requirement for NF-kappaB signaling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* (2009) 462(7269): 104-107. doi: 10.1038/nature08462

18. Bassères DS1, Ebbs A, Levantini E, Baldwin AS. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RealA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res*. (2010) 70(9): 3537-3546. doi: 10.1158/0008-5472

19. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* (2008) 13(4): 343-354. doi: 10.1016/j.ccr.2008.02.001

20. Hou Y, Li F, Karin M, Ostrowski MC. Analysis of the IKKβ/NF-kappaB signaling pathway during embryonic angiogenesis. *Dev Dyn*. (2008) 237(10): 2926-2935. doi: 10.1002/dvdy.21723

21. Ashida N, Senbanerjee S, Kodama S, Foo SY, Coggins M, Spencer JA, et al. Ikkβ regulates essential functions of the vascular endothelium through kinase-dependent and independent pathways. *Nat Commun*. (2011) 2: 318. doi: 10.1038/ncomms1317

22. Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, Ke E, Zhang Y, Oldfield E et al. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat Cell Biol*. (2012) 14(3): 257-265. doi: 10.1038/ncb2428

23. Bassères DS, Ebbs A, Cogswell PC, Baldwin AS. IKK is a therapeutic target in KRAS-induced lung cancer with disrupted p53 activity. *Genes Cancer* (2014) 5(1-2): 41-55. doi: 10.18632/genesandcancer.5

24. Ziegelbauer K, Gantner F, Lukacs NW, Berlin A, Fuchikami K, Niki T, et al. A selective novel low-molecular-weight inhibitor of IkappaB Kinase-beta (IKKβ) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. *Br J Pharmacol*. (2005) 145(2): 178-192. doi: 10.1038/sj.bjp.0706176

25. Michaloski JS, Redondo AR, Magalhães LS, Cambui CC, Giordano RJ. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. *Sci Adv*. (2016) 2(10): e1600611. doi: 10.1126/sciadv.1600611

26. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI. et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc*. (2009) 4(11): 1565-1573. doi: 10.1038/nprot.2009.187

27. Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes Cancer* (2011) 2(12): 1085-1096. doi: 10.1177/1947601911432334

28. Modi WS, Yoshimura T. Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol Biol Evol.* (1999) 16(2): 180-193. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026101

29. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol. *Vis Sci*. (1994) 35(1): 101-111

30. Kim CB, D'Amore PA, Connor KM. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Eye Brain*. (2016) 8: 67-79. doi: 10.2147/EB.S94447

31. Giordano RJ, Cardó-Vila M, Salameh A, Anobom CD, Zeitlin BD, Hawke DH, et al. From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(11): 5112-5117. doi: 10.1073/pnas.0915141107

32. Sidman RL, Li J, Lawrence M, Hu W, Musso GF, Giordano RJ, et al. The peptidomimetic Vasotide targets two retinal VEGF receptors and reduces pathological angiogenesis in murine and nonhuman primate models of retinal

disease. *Sci Transl Med*. (2015) 7(309): 309ra165. doi: 10.1126/scitranslmed.aac4882

33. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmark of cancer: the next generation. *Cell* (2011) 144(5): 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

34. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. (2011) 17(11): 1359-1370. doi: 10.1038/nm.2537

35. Bielenberg DR, Zetter BR. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer J*. (2015) 21(4): 267-273. doi: 10.1097/PPO.0000000000000138

36. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistence to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* (2008) 8(8): 592-603. doi: 10.1038/nrc2442

37. Xie TX, Xia Z, Zhang N, Gong W, Huang S. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep*. (2010) 23(3): 725-732

38. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, et al. IKKβ suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* (2007) 130(3): 440-455. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.058

39. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* (2008) 453(7196): 807-811. doi: 10.1038/nature06905

40. Kuo HP, Lee DF, Xia W, Wei Y, Hung MC. TNFalpha induces HIF-1-alpha expression through of IKKβ. *Biochem Biophys Res Commun*. (2009) 389(4): 640-644. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.042

41. Londhe VA, Maisonet TM, Lopez B, Jeng JM, Xiao J, Li C et al. Conditional deletion of epithelial IKKβ impairs alveolar formation through apoptosis and decreased VEGF expression during early mouse lung morphogenesis. *Respir Res*. (2011) 12: 134. doi: 10.1186/1465-9921-12-134

42. Kinose Y, Sawada K, Makino H, Ogura T, Mizuno T, Suzuki N, et al. IKKβ regulates VEGF expression and is a potencial therapeutic target for ovarian cancer as an angiogenic treatment. *Mol Cancer Ther*. (2015) 14(4): 909-919. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0696

43. Singha B, Gatla HR, Manna S, Chang TP, Sanacora S, Poltoratsky V, et al. Proteasome inhibition increases recruitment of IκB Kinase (IKKβ), S536P-p65, and transcription factor EGR1 to interleukin-8 (IL-8) promoter, resulting in

increased IL-8 production in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*. (2014) 289(5): 2687-2700. doi: 10.1074/jbc.M113.502641

44. Singha B, Gatla HR, Phyo S, Patel A, Chen ZS, Vancurova I. IKK inhibition increase bortezomib effectiveness in ovarian cancer. *Oncotarget* (2015) 6(28): 26347-26358. doi: 10.18632/oncotarget.4613

45. Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, Shimizu J, Oda M, Hayashi Y, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res*. (1996) 2(8): 1411-1416

46. Ohta Y, Watanabe Y, Murakami S, Oda M, Hayashi Y, Nonomura A, et al. Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer* (1997) 76(8): 1041-1045

47. Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, et al. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. (2000) 162(5); 1957-1963. doi: 10.1164/ajrccm.162.5.2002108

48. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. Ikkβ links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* (2004) 118(3): 285-296

49. Makino K, Day CP, Wang SC, Li YM, Hung MC. Upregulation of IKKalpha/IKKbeta by integrin-linked kinase is required for HER2/neu-induced NF-kappaB antiapoptotic pathway. *Oncogene* (2004) 23(21): 3883-3887. doi: 10.1038/sj.onc.1207485

50. Frelin C, Imbert V, Griessinger E, Peyron AC, Rochet N, Philip P, et al. Targeting NF-kappab activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* (2005) 105(2): 804-811. doi: 10.1182/blood-2004-04-1463

51. Hideshima T, Neri P, Tassone P, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, et al. MLN120B, a novel Ikappab kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. (2006) 12(19): 5887-5894. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2501

52. Ping B, He X, Xia W, Lee DF, Wei Y, Yu D, et al. Cytoplasmic expression of p21CIP1/WAF1 is correlated with IKKβ overexpression in human breast cancers. *Int J Oncol* (2006) 29(5): 1103-1110

53. Yang J, Pan WH, Clawson GA, Richmond A. Systemic targeting inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth. *Cancer Res*. (2007) 67(7): 3127-3134. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3547

54. Ling J, Kang Y, Zhao R, Xia Q, Lee DF, Chang Z, et al. KrasG12D-induced IKK2/β/NF-κB activation by IL-1α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* (2012) 21(1): 105-120. doi: 10.1016/j.ccr.2011.12.006

55. Xue W, Meylan E, Oliver TG, Feldser DM, Winslow MM, Bronson R, et al. Response and resistence to NF-κB inhibitors in mouse models of lung adenocarcinoma. *Cancer Discov* (2011) 1(3): 236-247. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0073

56. Pallangyo CK, Ziegler PK, Greten FR. IKKβ acts as a tumor suppressor in cancer-associated fibroblasts during intestinal tumorigenesis. *J Exp Med*. (2015) 212(13): 2253-2266. doi: 10.1084/jem.20150576

57. Lennikov A, Hiraoka M, Abe A, Ohno S, Fujikawa T, Itai A, et al. IκB Kinase-β inhibitor IMD-0354 beneficially suppresses retinal vascular permeability in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (2014) 55(10): 6365-6373. doi: 10.1167/iovs.14-14671

58. Lu H, Lu Q, Gaddipati S, Kasetti RB, Wang W, Pasparakis M, et al. IKK2 inhibition attenuates laser-induced choroidal neovascularization. PLoS One (2014) 9(1): e87530. doi: 10.1371/journal.pone.0087530

59. Wysong A, Couch M, Shadfar S, Li L, Rodriguez JE, Asher S, et al. NF-κB inhibition protects again tumor-induced cardiac atrophy in vivo. *Am J Pathol.* (2011) 178(3): 1059-1068. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.12.009

Figure legends

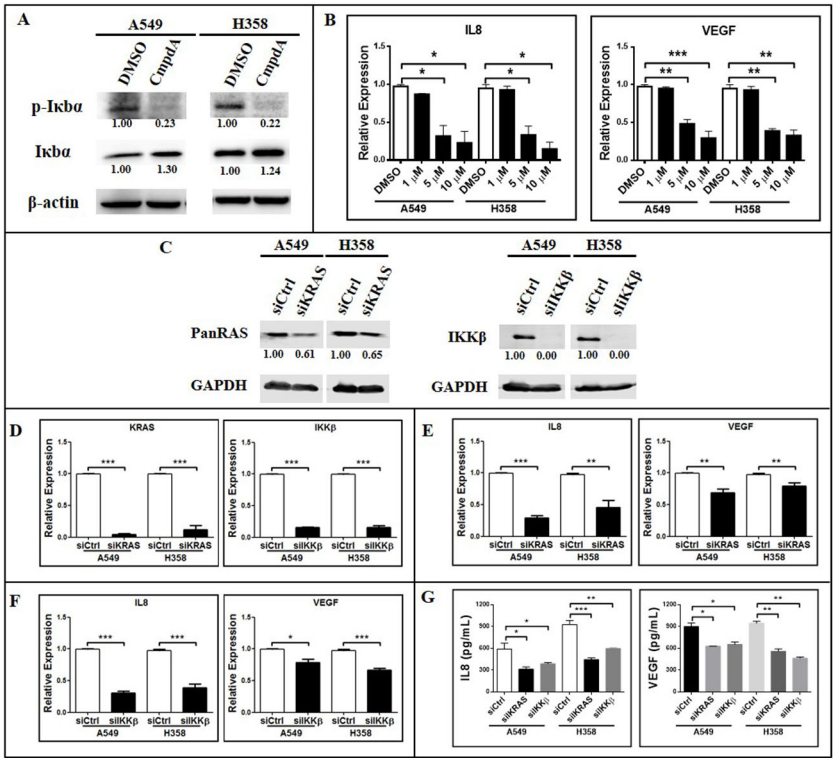
Figure 1. IKKβ inhibition reduces IL-8 and VEGF expression and secretion. (**a**) Western Blotting of A549 and H358 cells treated with 0.1% DMSO or 5uM CmpdA for 30 minutes. Antibodies used are indicated. Representative western blots are shown. Protein bands were quantitated and normalized to the reference samples (0.1% DMSO-treated samples). (**b**) A549 and H358 cells were treated with 0.1% DMSO or the indicated concentrations of CmpdA for 24 hours and IL-8 and VEGF gene expression was evaluated by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). (**c, d, e, f, g**) A549 and H358 cells were transfected with a non-targeting control siRNA (siCtrl) or with siRNA smartpools targeting KRAS (siKRAS) or IKKβ (siIKKβ). (**c**) Protein lysates were collected 96 hours post-transfection and evaluated by Western Blotting with the indicated antibodies. Protein bands were quantitated and normalized to the reference samples (siCtrl-transfected samples). (**d**) Expression of KRAS (left panel) or IKKβ (right panel) was analyzed 72 hours post-transfection by qRT-PCR. (**e, f**) Expression of IL-8 (left panel) or VEGF (right panel) was analyzed 72 hours post-transfection by qRT-PCR in cells transfected with siKRAS (**e**) or siIKKβ (**f**). (**g**) Conditioned culture media were collected 120 hours post-transfection and protein concentrations of IL-8 and VEGF were determined by ELISA. In all cases, bar graphs represent average ± 1s.d of three independent experiments. Statistical significance was measured by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (**b**, **g**) or by the Student's *t*-test (**d**, **e**, **f**) (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$) by comparing DMSO-treated groups with CmpdA-treated groups (**b**) or siCtrl-transfected groups with siKRAS- and/or siIKKβ-transfected groups (**d, e, f, g**). Groups being compared are indicated by horizontal bars.

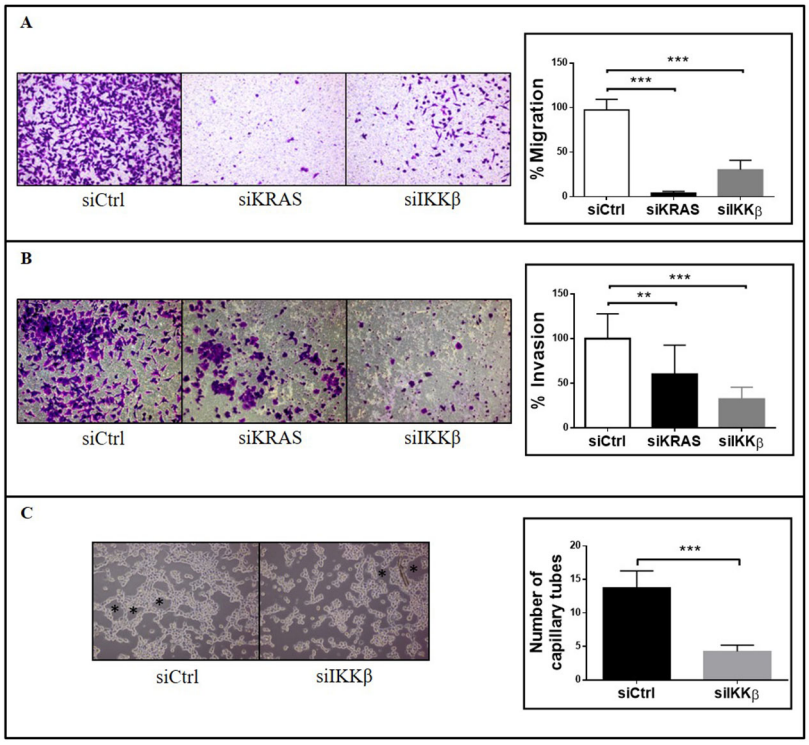
Figure 2. siRNA-mediated inhibition of IKKβ expression decreases HUVEC migration, invasion and tube formation *in vitro.* A549 cells were transfected with a non-targeting control siRNA (siCtrl) or with siRNA smartpools targeting KRAS (siKRAS) or IKKβ (siIKKβ) and conditioned medium was collected as described in methods. (**a**) Transwell migration assay of HUVEC cells was performed using conditioned medium from A549-transfected cells as chemoattractant as indicated. Images shown are representative of three independent experiments. (**b**) Transwell matrigel invasion assay of HUVEC cells was performed using conditioned medium from A549-transfected cells as chemoattractant as indicated. Images shown are representative of three independent experiments. (**c**) Endothelial cell tube formation assay. HUVEC cells were plated onto Matrigel in the presence of serum-free conditioned medium from A549-transfected cells as indicated. Images shown are representative of three independent experiments. In all cases, bar graphs represent average ± 1s.d. Statistical significance was measured by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (**$p<0.01$, ***$p<0.001$) by comparing siCtrl-transfected groups with siKRAS- and/or siIKKβ-transfected groups (**a, b**) or by the Student's *t*-test (***$p<0.001$) (**c**). Groups being compared are indicated by horizontal bars.

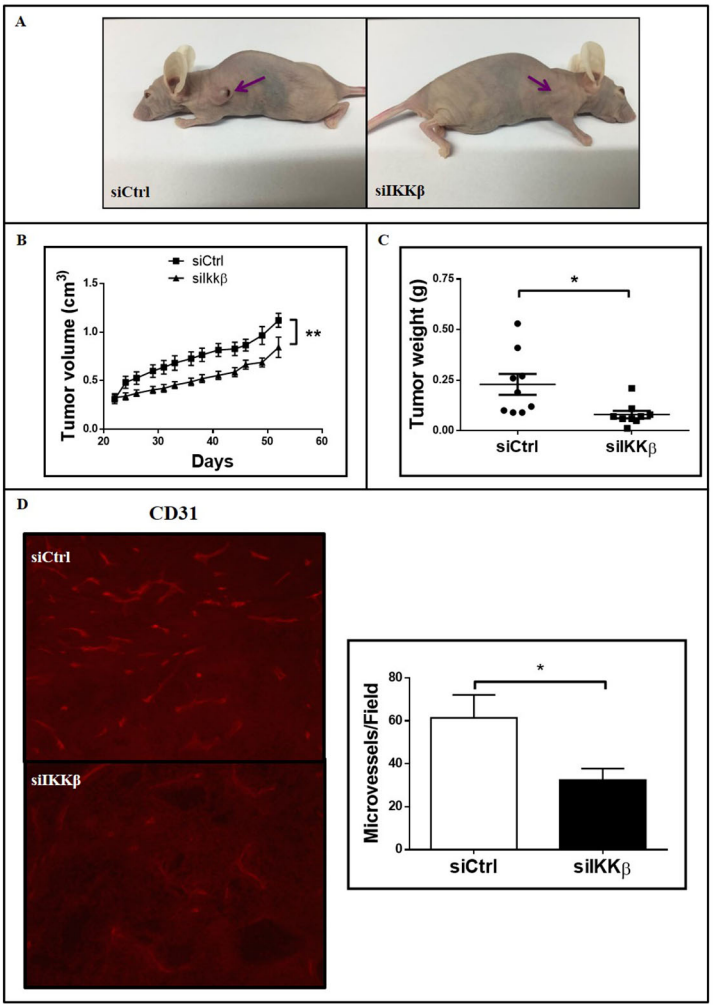
Figure 3. siRNA-mediated inhibition of IKKβ expression decreases tumor growth and angiogenesis *in vivo*. 1 x 10^6 A549 cells transfected with a non-targeting control siRNA

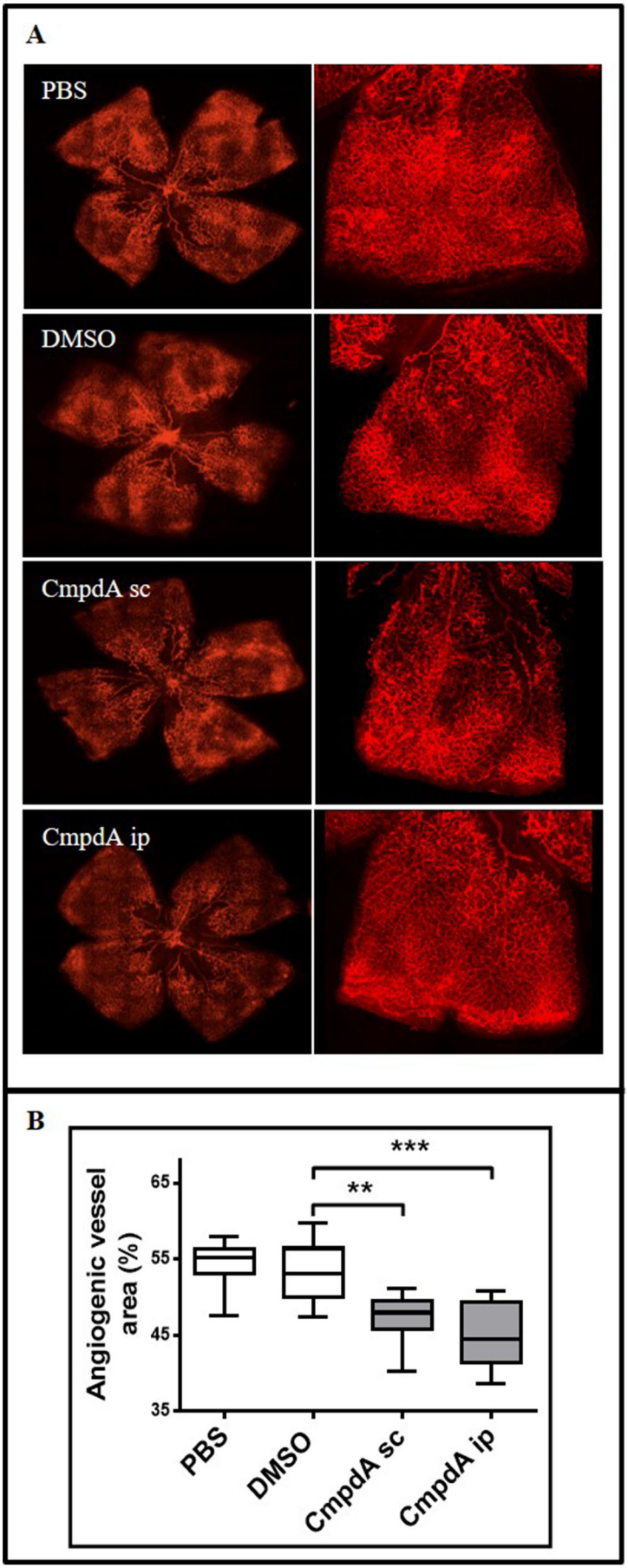
(siCtrl) or with a siRNA smartpool targeting IKKβ (siIKKβ) were injected subcutaneously into flanks of nude mice (n=9 per group). (**a**) Representative images of tumor-bearing nude mice 55 days after inoculation. (**b**) Tumor growth kinetics assessed by tumor volume measurements overtime as indicated. Each point represents average ± 1s.d. of each group. (**c**) Dot plot representing individual tumor weights 55 days after inoculation. Horizontal bars represent average weight in each group. (**d**) Vessel density was evaluated in tumor sections by immunofluorescence staining for CD31 as described in methods. Left) Representative images of stained tumor sections. Right) Quantitation of CD31-stained vessels. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (*$p<0.05$) and the significantly different comparisons are indicated by vertical (**b**) or horizontal (**c, d**) bars. Error bars represent average ± 1s.d.

Figure 4. IKKβ inhibition reduces pathological neovascularization in a cancer-independent oxygen-induced retinopathy (OIR) *in vivo* model. Newborn C57Black6 mice were submitted to the OIR protocol and treated with PBS (control), DMSO (vehicle control) or CmpdA as described in methods. Mice were euthanized at postnatal day 17 and their retinas were dissected and stained with GS-IB4 Isolectin, showing the neovascular tissue in different groups. (**a**) Representative images of Isolectin GS-IB4-stained retinas. High resolution images of retinal quadrants are depicted. (**b**) Quantitation of the isolectin GS-IB4-stained angiogenic area was performed as described in methods (n=10 per group). PBS) Control PBS-treated mice; DMSO) Vehicle control DMSO-treated mice; CmpdA-sc) Mice treated with 10 mg/Kg CmpdA subcutaneously; CmpdA-ip) Mice treated with 10 mg/Kg CmpdA intraperitoneally. Statistical significance was measured by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (**$p<0.01$, ***$p<0.001$). Error bars represent average ± 1s.d.


A
A549
H358
DMSO
CnpdA
p-Iκbα
Iκbα
β-actin
1.00
0.23
1.00
0.22
1.00
1.30
1.00
1.24
B
IL8
VEGF
Relative Expression
DMSO
1 μM
5 μM
10 μM
A549
H358
C
siCtrl
siKRAS
PanRAS
GAPDH
1.00
0.61
1.00
0.65
siIKKβ
IKKβ
1.00
0.00
1.00
0.00
D
KRAS
IKKβ
E
F
G
IL8 (pg/mL)
VEGF (pg/mL)


A
siCtrl
siKRAS
siIKKβ
% Migration
150
100
50
0
***
***
siCtrl
siKRAS
siIKKβ
B
siCtrl
siKRAS
siIKKβ
% Invasion
150
100
50
0
***
**
siCtrl
siKRAS
siIKKβ
C
siCtrl
siIKKβ
Number of capillary tubes
20
15
10
5
0
***
siCtrl
siIKKβ


A
siCtrl
siIKKβ
B
siCtrl
siIkkβ
Tumor volume (cm3)
1.5
1.0
0.5
0.0
20
30
40
50
60
Days
**
C
Tumor weight (g)
0.75
0.50
0.25
0.00
*
siCtrl
siIKKβ
D
CD31
siCtrl
siIKKβ
Microvessels/Field
80
60
40
20
0
*
siCtrl
siIKKβ


A
PBS
DMSO
CmpdA sc
CmpdA ip
B
Angiogenic vessel area (%)
65
55
45
35
***
**
PBS
DMSO
CmpdA sc
CmpdA ip

Subject: Frontiers: Your manuscript submission - 414885
From: "Frontiers Oncology Editorial Office" <oncology.editorial.office@frontiersin.org>
Date: 19/07/2018 13:01
To: basseres@iq.usp.br

Dear Dr Bassères,

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""IKKβ targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: a potential anti-angiogenic therapeutic target"" to be considered for publication in Frontiers in Oncology, section Cancer Molecular Targets and Therapeutics.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

With best regards,

Your Frontiers in Oncology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
131 Finsbury Pavement, EC2A 1NT London, United Kingdom
Office T 44 203 5144 082

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

----------MANUSCRIPT DETAILS----------
Manuscript title: IKKβ targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: a potential anti-angiogenic therapeutic target
Manuscript ID: 414885
Submitted By: Daniela Sanchez Bassères
Authors: Tatiana Correa Carneiro-Lobo, Luiza Coimbra Scalabrini, Leila da Silva Magalhães, Laura B. Cardeal, Felipe Silva Rodrigues, Edmilson Ozorio dos Santos, Albert S. Baldwin, Ricardo José Giordano, Daniela Sanchez Bassères
Journal: Frontiers in Oncology, section Cancer Molecular Targets and Therapeutics

Article type: Original Research
Submitted on: 19 Jul 2018

----------ADDITIONAL INFORMATION----------
In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:
http://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=151&name=cancer_molecular_targets_and_therapeutics

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: http://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf