

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas
(Bioquímica)

LUIZA COIMBRA SCALABRINI

Explorando a Quinase Aurora A como Alvo Terapêutico
em Células Iniciais de Tumor Pulmonares Induzidas
por *KRAS*

Versão original da Tese corrigida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
06/06/2022

LUIZA COIMBRA SCALABRINI

**Explorando a Quinase Aurora A como Alvo Terapêutico
em Células Iniciadoras de Tumor Pulmonares Induzidas
por *KRAS***

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

Tese de Doutorado

**Orientadora:
Prof. Dra. Daniela Sanchez Bassères**

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, 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

S281e Scalabrini, Luiza Coimbra
Explorando a Quinase Aurora A como Alvo
Terapêutico em Células Iniciadoras de Tumor
Pulmonares Induzidas por KRAS / Luiza Coimbra
Scalabrini. - São Paulo, 2022.
134 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Bassères, Daniela Sanchez

1. Biologia molecular. 2. Câncer de pulmão. 3.
Metástase. 4. KRAS. 5. Quinase Aurora A. I. T. II.
Bassères, Daniela Sanchez, orientador.



"Explorando a quinase aurora A como alvo terapêutico em células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas por *KRAS*"

LUIZA COIMBRA SCALABRINI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères
(Orientadora e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Claudiana Lameu Gomes
IQ - USP

Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis
UNIFESP

Profa. Dra. Maria Cristina Rodrigues Rangel
ICESP

SÃO PAULO
15 de agosto de 2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a *Deus*, por me acompanhar e me guiar durante essa jornada.

Agradeço à *Prof. Dra. Daniela Bassères*, que confiou em mim a continuação desse trabalho e me incentivou a fazer o meu melhor. Agradeço a parceria estabelecida e todo conhecimento compartilhado por todos esses anos.

Agradeço aos amigos do LBMC, *Tatiana, Sandro, Vanessa, Lutero, Felipe, Thalita, Gabriel, Edmilson, Amanda e Jéssica*, sem os quais essa jornada não teria sido a mesma. Agradeço a ajuda e colaboração dentro do laboratório, e a amizade fora. Vocês fizeram toda diferença!

Aos professores *Dr. Eduardo Reis* e *Dra. Deborah Schechtman* pela contribuição ao longo da condução deste trabalho.

Aos amigos do *LAPIC* pelos conselhos e discussões que tanto ajudaram neste trabalho, e pelas conversas descontraídas e risadas nos momentos da copinha.

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

À CNPq e FAPESP, pelo financiamento.

Às minhas amigas de Viçosa, *Gabi, Marcela e Isa*, que se tornaram minha família em São Paulo, me acompanham a tanto tempo, estiveram comigo nos momentos mais difíceis e sempre me apoiaram nessa trajetória.

À minha *família* e *amigos* de Belo Horizonte, que me recebem sempre com tanto carinho e estão sempre presentes, mesmo longe de casa.

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

Às minhas sobrinhas *Mel, Alice e Lis*, pela alegria que trouxe às nossas vidas, por serem a razão por sempre buscar o melhor.

Ao meu melhor amigo e companheiro de vida, *Leo*. Agradeço a parceria incondicional, a paciência durante esse período com altos e baixos, por ver em mim o meu melhor e me fazer acreditar em mim.

Por fim, mas não menos especiais, aos meus pais, *Maria Lúcia e Rogério*, pelo apoio absoluto, por acreditarem em mim e serem meu exemplo de luta, família e amor.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele torna com isso.”

John Ruskin

RESUMO

Scalabrini, L. C. Explorando a Quinase Aurora A como Alvo Terapêutico em Células Iniciadoras de Tumor Pulmonares Induzidas por KRAS. 2022. 133p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O câncer de pulmão é o câncer que mais mata no mundo todo, e um dos fenótipos mais importantes da oncogênese é a aquisição e conservação de um fenótipo tronco tumoral pelas células iniciadoras de tumor (CITs), que são definidas como células tumorais autorrenováveis capazes de iniciar a formação de tumores, sustentar o crescimento tumoral, conferir quimio e radiorresistência e são responsáveis pela disseminação tumoral. A aquisição do fenótipo tronco tumoral e metastático em células tumorais pulmonares é promovida pela ativação do oncogene KRAS, sendo que mutações ativadoras em KRAS são prevalentes no câncer de pulmão. No entanto, KRAS é um alvo terapêutico pouco drogável e as terapias direcionadas à KRAS oncogênica ainda são escassas e específicas para a mutação G12C. Portanto, a identificação de alvos de KRAS envolvidos em promover o fenótipo maligno é necessária. A quinase Aurora A (AURKA) promove a oncogenicidade e tumorigenicidade das células transformadas por KRAS e também tem sido implicada na aquisição do fenótipo tronco tumoral e metastático. Portanto, nosso objetivo foi avaliar como AURKA afeta o fenótipo tronco tumoral e metastático de CITs pulmonares portadoras de KRAS oncogênica. Para isso, utilizamos células tumorais pulmonares H1703 com indução (H1703 G12V) ou não (H1703 TrexB) da expressão de KRAS oncogênica e células de câncer de pulmão H358 e A549 portadoras de mutação oncogênica em KRAS. Para avaliar o fenótipo tronco tumoral, realizamos ensaios de formação tumoresferas que permitem o crescimento seletivo de CITs *in vitro* e observamos que no modelo induzível a inibição de AURKA reduz a capacidade de formação de tumoresferas de maneira KRAS-dependente e nas linhagens A549 e H358 a inibição de AURKA reduz a capacidade de autorrenovação das tumoresferas. Para purificar uma população altamente enriquecida para CITs, nós avaliamos marcadores de superfície de células tronco nessas linhagens, mas não identificamos marcadores que apresentassem uma correlação com o fenótipo tronco tumoral. Como alternativa geramos células H358 e A549 com expressão estável da construção repórter para células tronco tumorais SORE6-GFP, aonde a expressão de GFP é regulada por 6 cópias do elemento de resposta aos fatores de transcrição de célula tronco SOX2 e Oct4 (SORE6). Observamos uma maior proporção de células SORE6-GFP positivas na linhagem H358, indicando que essa linhagem apresenta maior fenótipo tronco tumoral. Células oriundas de tumoresferas enriquecidas para CITs destas linhagens apresentaram maior fenótipo migratório e invasivo, sendo que a inibição de AURKA reduziu a capacidade de migração e invasão tanto das células parentais quanto das populações enriquecidas em CITs. Além disso, a inibição de AURKA na linhagem H358 reduziu a expressão dos fatores pró-angiogênicos IL-8 e VEGF e a capacidade de células endoteliais HUVEC de formarem tubos angiogênicos. A inibição de AURKA na linhagem H358 também reduziu a capacidade migratória das células HUVEC de forma dependente de IL-8 e VEGF. Nossos resultados sugerem que a terapia de inibição de AURKA pode reduzir o fenótipo tronco tumoral e metastático de CITs pulmonares portadoras de KRAS oncogênica e, portanto, pode ser uma estratégia terapêutica atraente para reduzir a recorrência e a metástase no câncer de pulmão induzido por KRAS.

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

ABSTRACT

Scalabrini, L. C. Exploring Aurora A Kinase as a Therapeutic Target in *KRAS*-Induced Lung Tumor Initiating Cells. 2022. 133p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lung cancer is the the leading cause of cancer deaths worldwide, and one of the most important phenotypes of oncogenesis is the acquisition and maintenance of a cancer stem-like phenotype by tumor initiating cells (TICs), which are defined as self-renewing tumor cells capable of initiating tumor formation, sustaining tumor growth, promoting chemo and radioresistance, and are responsible for tumor spread. The acquisition of a cancer stem-like and metastatic phenotype by lung cancer cells is induced by activation of the *KRAS* oncogene, and *KRAS* activating mutations are prevalent in lung cancer. However, *KRAS* is a poorly druggable therapeutic target and *KRAS*-targeted therapies are scarce and sofar specific for the G12C mutation. Therefore, the identification of *KRAS* targets involved in promoting the malignant phenotype is warranted. Aurora A kinase (AURKA) promotes oncogenicity and tumorigenicity of *KRAS*-transformed cells. Furthermore, AURKA has also been implicated in the acquisition of cancer stem-like and metastatic phenotype. Therefore, our goal was to evaluate how AURKA affects the cancer stem-like and metastatic phenotype of pulmonary TICs harboring oncogenic *KRAS*. For that purpose, we utilized *KRAS*-inducible H1703 lung tumor cells with (H1703 G12V) or without (H1703 TrexB) induction of oncogenic *KRAS* and we also used *KRAS*-mutant H358 and A549 lung cancer cells. To evaluate the cancer stem-like phenotype, we performed tumorsphere formation assays, that allow for the selective growth of TICs *in vitro*, and observed that AURKA inhibition in the *KRAS*-inducible cell model reduces tumorsphere formation in a *KRAS*-dependent manner and AURKA inhibition in A549 and H358 cells reduces tumorsphere selfrenewal. To purify a population highly enriched for TICs, we analyzed stem cell surface markers in these cell lines, but we were unable to identify surface markers that correlated with the stem-like phenotype. As an alternative, we generated H358 and A549 cells stably expressing the SORE6-GFP stem cell reporter construct, where GFP expression is regulated by 6 copies of the stem cell transcription factors SOX2 and Oct4 response element (SORE6). We observed a higher percentage of SORE6-GFP positive cells in the H358 cell line, indicating that this cell line has a more pronounced stem-like phenotype. Tumorsphere-derived H358 and A549 cells enriched for TICs displayed enhanced migratory and invasive phenotype, and AURKA inhibition reduced migration and invasion of both parental and TIC-enriched cell populations. Furthermore, AURKA inhibition in H358 cells reduced expression of pro-angiogenic factors IL-8 and VEGF and the ability of HUVEC endothelial cells to form angiogenic tubes. AURKA inhibition in H358 cells also reduced HUVEC migration in an IL-8- and VEGF-dependent manner. Our results suggest that AURKA-inhibition therapy can reduce the stem-like and metastatic phenotype of lung TICs harboring oncogenic *KRAS* and, therefore, may represent a promising therapeutic strategy to reduce recurrence and metastasis in *KRAS*-induced lung cancer.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncer no mundo.	13
Figura 2 - Representação da frequência relativa dos principais alvos moleculares em NSCLC..	16
Figura 3 – Modelos de organização heterogênea dos tumores.....	18
Figura 4 – Transição epitelial-mesenquimal em células tumorais.	26
Figura 5 - Regulação de RAS.....	33
Figura 6 - Estrutura e domínios das Aurora quinases.....	39
Figura 7 - Localização da AURKA durante a divisão celular.	40
Figura 8 – Células pulmonares H1703-G12V apresentam aumento de expressão de AURKA e KRAS mutado.	58
Figura 9 – A expressão induzida de KRASG12V em células pulmonares leva ao aumento da expressão dos genes de stemness.	59
Figura 10 – A doxíciclina não interfere na formação de tumoresferas das células pulmonares H1703 TrexB.	60
Figura 11 – A inibição farmacológica de AURKA reduz preferencialmente a formação de tumoresferas de células pulmonares com KRAS oncogênica.	62
Figura 12 - A inibição da atividade de AURKA em células A549 e H358 mediada por Alisertib (MLN).....	64
Figura 13 – A inibição de AURKA leva à perda da capacidade de autorrenovação in vitro das células tumorais pulmonares A549 e H358.....	66
Figura 14 – As tumoresferas apresentam maior expressão dos marcadores de superfície CD24 e CD44.....	68
Figura 15 – As linhagens A549 e H358 apresentam alta marcação de superfície para os marcadores de stemness CD24 e CD44.....	69

Figura 16 – Tumoresferas oriundas da linhagem H358 não apresentam enriquecimento de células com dupla marcação para CD24/44.	70
Figura 17 - Citometria de fluxo para análise dos marcadores de stemness CXCR4, CD90 e CD326 nas células A549 e H358.....	71
Figura 18 – As tumoresferas das linhagens A549 e H358 apresentam maior expressão de CXCR4.	72
Figura 19 - Estratégia de purificação por citometria de fluxo das populações CXCR4+ e CXCR4- oriundas da linhagem H358.....	74
Figura 20 - Expressão gênica de genes de stemness e EMT é aumentada nas populações H358 CXCR4+.	75
Figura 21 - Redução da capacidade de formação de tumoresferas de células H358 CXCR4+.	76
Figura 22 - Células H358 CXCR4+ não dão origem a células CXCR4- após cultura de tumoresferas.	77
Figura 23 - Redução da capacidade de formação de colônias de células H358 CXCR4+.....	77
Figura 24 – A linhagem H358 apresenta uma proporção maior que a linhagem A549 de células SORE6-GFP+.	79
Figura 25 - Células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior expressão dos fatores de transcrição de stemness SOX2, Oct4 e Nanog.	80
Figura 26 – A inibição de AURKA em células H358 levam à redução da expressão de genes de stemness.	81
Figura 27 – Células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior capacidade migratória.	82
Figura 28 – Células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior capacidade invasiva.....	83
Figura 29 - Células oriundas de tumoresferas possuem maior expressão de genes de EMT na linhagem H358.	84

Figura 30 – Inibição de AURKA com RNA de interferência nas células A549 e H358.	86
Figura 31 – A inibição da expressão de AURKA promove uma diminuição da capacidade migratória das células A549.	87
Figura 32 – A inibição da expressão de AURKA promove uma diminuição da capacidade invasiva das células A549 e H358.	88
Figura 33 - A inibição da expressão de AURKA promove uma diminuição na expressão de genes de EMT nas linhagens A549 e H358.	89
Figura 34 – Inibição da atividade de AURKA em células A549 e H358 oriundas de tumoresferas promove uma diminuição da capacidade migratória.	90
Figura 35 - Inibição da atividade de AURKA em células A549 e H358 oriundas de tumoresferas promove uma diminuição da capacidade invasiva.	91
Figura 36 - A inibição da AURKA por interferência de RNA reduz a expressão de fatores pró-angiogênicos na linhagem H358.	93
Figura 37 – Meio condicionado de células H358 com inibição de KRAS por interferência de RNA reduz a capacidade das células HUVEC de formarem tubos angiogênicos in vitro.	94
Figura 38 - Meio condicionado de células H358 com inibição de AURKA por interferência de RNA reduz a capacidade das células HUVEC de formarem tubos angiogênicos in vitro.	95
Figura 39 - A inibição da expressão de KRAS em células H358 diminui a migração de HUVEC de uma maneira dependente de VEGF/IL-8.	96
Figura 40 - Meio condicionado de células H358 com inibição de AURKA por interferência de RNA reduz a capacidade migratória das células HUVEC de maneira dependente de VEGF/IL-8 in vitro.	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer de pulmão	13
1.2	Células iniciadoras de tumor (CITs).....	17
1.2.1	CITs e metástase	25
1.3	KRAS	30
1.3.1	GTPases RAS	30
1.3.2	Atividade de RAS	31
1.3.3	KRAS e os fenótipos tronco tumoral e metastático.....	34
1.3.4	KRAS como alvo terapêutico	36
1.4	A QUINASE AURORA A	38
1.4.1	Estrutura e função	38
1.4.2	AURKA e câncer	41
1.4.3	AURKA e os fenótipos tronco tumoral e metastático	42
2	OBJETIVOS.....	45
2.1	Objetivo geral	45
2.2	Objetivos específicos	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Linhagens celulares	46
3.2	Condições de cultura, subcultura e preservação das linhagens celulares	47
3.3	Ensaio de formação de tumoresferas	47
3.4	Inibição farmacológica de AURKA	48
3.5	Identificação de marcadores de superfície por citometria de fluxo.....	48
3.6	Purificação de células por citometria de fluxo	49
3.7	Geração de linhagens SORE6	49
3.8	Transfecção com siRNAs	50
3.9	Extração e quantificação de RNA	51
3.10	Síntese de cDNA	52
3.11	PCR em Tempo Real	53
3.12	Western Blotting.....	53

3.13	Ensaio de invasão e migração celular <i>transwell</i>	54
3.14	Ensaio de formação de tubos endoteliais	55
3.15	Análise estatística	56
4	RESULTADOS	57
4.1	A expressão de KRAS ^{G12V} em células tumorais pulmonares promove a expressão de AURKA e marcadores de <i>stemness</i>	57
4.2	A inibição de AURKA reduz a formação de tumoresferas em células tumorais pulmonares de maneira dependente do status de KRAS	60
4.3	Identificação de estratégias para purificação de células iniciadoras de tumor 67	
4.4	Tumoresferas de linhagens pulmonares possuem maior capacidade migratória e invasiva. 82	
4.5	Inibição da AURKA reduz o fenótipo migratório e invasivo.....	85
4.6	Inibição da AURKA reduz a angiogênese.....	92
5	DISCUSSÃO	99
6	CONCLUSÃO.....	111
7	REFERÊNCIAS	113
	SÚMULA CURRICULAR.....	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pulmão

O câncer é uma doença que atinge quase 20 milhões de pessoas em todo mundo (WHO 2021). O câncer de pulmão é atualmente o terceiro tipo de câncer com maior incidência entre homens e mulheres no mundo, ficando atrás somente do câncer de mama em mulheres e próstata em homens (**Figura 1**). Entretanto, o câncer pulmonar é o tipo de câncer que mais mata no mundo. Estima-se que cerca de 2 milhões de novos casos de câncer de pulmão e 1,8 milhões de mortes tenham ocorrido em 2020 em decorrência do câncer de pulmão. No Brasil, o câncer de pulmão é o terceiro tipo mais frequente entre os homens e o quarto tipo entre as mulheres, sendo responsável por 13,8% das mortes por câncer entre os homens e 11,4% entre as mulheres (INCA 2021b).

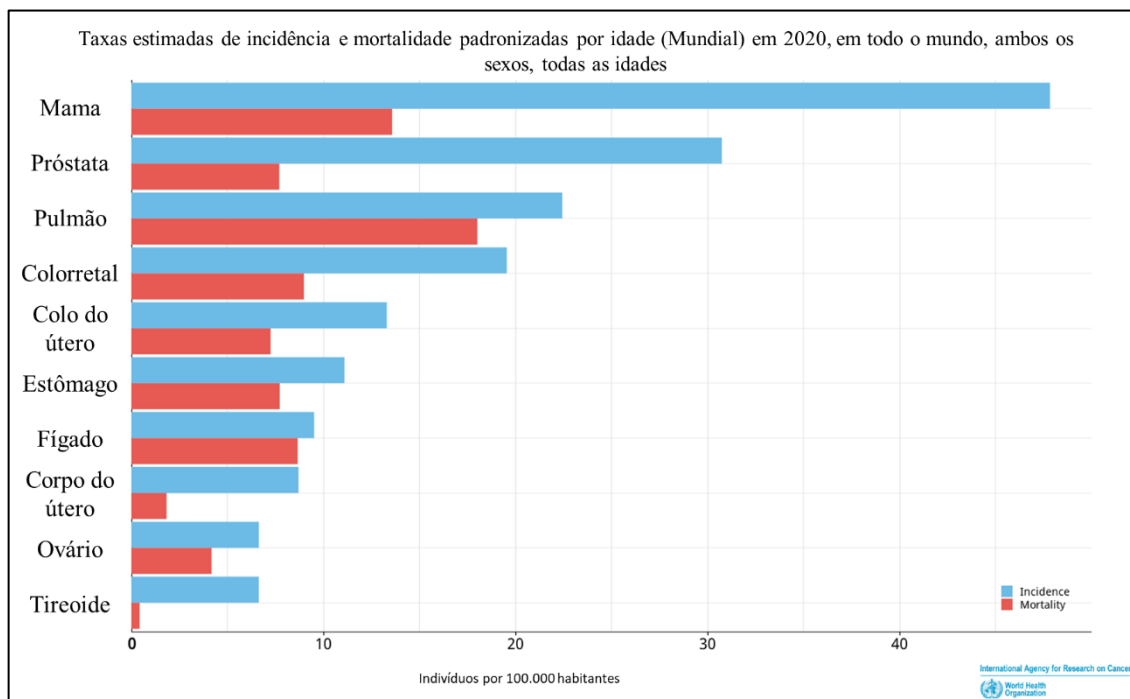


Figura 1 - Incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncer no mundo. Figura adaptada da International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (WHO 2021).

A taxa de sobrevivência em 5 anos de pacientes com câncer de pulmão é de aproximadamente 25%, variando entre tumores localizados, quando não há sinal de que o câncer se espalhou para fora do pulmão, regionais, quando o câncer se espalhou para fora do pulmão para estruturas próximas ou linfonodos, e distantes, quando o câncer se espalhou para partes distantes do corpo. A taxa de sobrevivência em 5 anos é relativamente alta para tumores localizados (63%), e baixa para tumores metastáticos (7%) (American Cancer Society 2021).

A alta taxa de mortalidade do câncer de pulmão se deve principalmente ao aparecimento tardio dos sintomas. Como os pulmões são órgãos internos, não podem ser examinados externamente, como é o caso do câncer de mama, e os sintomas ocorrem apenas quando o câncer já está em estágio avançado, o que torna extremamente difícil a detecção precoce do câncer de pulmão. Uma vez que a doença se espalha, o tratamento torna-se extremamente difícil (Detterbeck et al. 2017).

O uso de tabaco é um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento de câncer de pulmão. Aproximadamente 85% dos cânceres de pulmão são causados pelo uso de tabaco. Indivíduos fumantes tem um risco 9 a 10 vezes maior de câncer de pulmão do que não fumantes. Embora o tabagismo tenha sido associado ao câncer de pulmão, o tabagismo passivo, também chamado de tabagismo involuntário, foi associado ao maior risco de câncer de pulmão em indivíduos não fumantes expostos (Schwartz and Cote 2016). Em comparação com o tabagismo, a proporção de cânceres de pulmão associados a outros fatores, como infecção viral, exposição ocupacional a carcinógenos, dieta e obesidade, poluição do ar ambiental, história familiar de câncer de pulmão e carcinogênese induzida por estrogênio, é relativamente baixa. Entretanto, esses fatores desempenham um papel cada vez mais importante no desenvolvimento desta doença (Akhtar and Bansal 2017).

Diversas campanhas foram criadas em todo o mundo para conscientização sobre os riscos do tabagismo. Em 1986, no Brasil, foi criado o Dia Nacional de Combate ao Fumo, e no ano seguinte, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou em 1987 o Dia Mundial sem Tabaco. Como resultados dessas, e de outras campanhas, observou-se uma queda de 15,7 para 9,5% na prevalência de fumantes de 2006 para 2020 (INCA 2021a). No entanto, nesse mesmo período, a taxa de mortalidade aumentou de 9,98% para 13,47%, indicando que a causa de câncer de pulmão por outros fatores, que não o tabaco, tem crescido cada vez mais (INCA).

O câncer de pulmão pode ser classificado em dois tipos: câncer de pulmão de células pequenas (SCLC – *small cell lung cancer*) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC – *non-small cell lung cancer*). De maneira geral, o SCLC compreende aproximadamente 15% de todos os cânceres de pulmão e cerca de 95% dos pacientes possui histórico de exposição ao tabaco (Bernhardt and Jalal 2016).

O tipo NSCLC compreende aproximadamente 85% dos pacientes com câncer de pulmão e pode ser subdividido em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes. Dentre os 3 subtipos, o adenocarcinoma representa cerca de 40% dos casos de câncer de pulmão, e o carcinoma de células grandes é o menos frequente, representando cerca de 15% dos casos (Ruiz-Cordero and Devine 2020). É possível observar que os não fumantes e as mulheres são os mais afetados com o adenocarcinoma pulmonar, enquanto nos fumantes, o carcinoma de células escamosas é o mais frequente (Akhtar and Bansal 2017).

Entretanto, a classificação molecular do câncer de pulmão sugere que o mesmo é constituído por doenças heterogêneas do ponto de vista molecular, que não podem mais ser agrupadas de forma ampla. É necessário não apenas diferenciar entre os subtipos morfológicos, mas realizar um conjunto de testes moleculares para a escolha da terapia mais adequada para cada paciente e tumor (Ruiz-Cordero and Devine 2020).

As principais alterações moleculares observadas nos casos de câncer de pulmão NSCLC ocorrem nos genes EGFR e KRAS, entre outros (**Figura 2**). O EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) é um receptor da membrana plasmática envolvido na proliferação celular e no crescimento, e é superexpresso em aproximadamente 10% dos casos de NSCLC, ocorrendo mais frequentemente em mulheres não-fumantes (Rodriguez-Canales et al. 2016). Essas mutações aumentam a atividade da quinase do EGFR, levando à hiperativação das vias de sinalização de sobrevivência celular (Rodriguez-Canales et al. 2016).

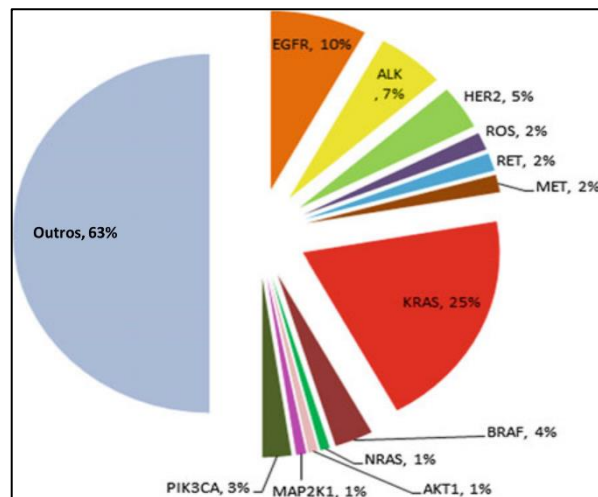


Figura 2 - Representação da frequência relativa dos principais alvos moleculares em NSCLC. Figura adaptada de (Rodriguez-Canales et al. 2016).

KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) é uma GTPase envolvida na sinalização de vias de proliferação e diferenciação celular (Rodriguez-Canales et al. 2016; Ruiz-Cordero and Devine 2020) e mutações oncogênicas em *KRAS* são detectadas em aproximadamente 25% a 36% dos pacientes com NSCLC, sendo mais comuns em fumantes (30-43%) e rara em não-fumantes (0-7%) (Subramanian and Govindan 2013).

O câncer de pulmão é caracterizado por uma heterogeneidade de células tumorais que exibem diferentes fenótipos celulares como resultado de sua sinalização celular distinta. Entre essas diferentes subpopulações tumorais, existe uma pequena população que possui

características de células-tronco, incluindo a capacidade de autorrenovação e diferenciação celular, contribuindo para o aumento da tumorigenicidade, capacidade de migração e invasão, e resistência quimioterápica (Maiuthed et al. 2018).

1.2 Células iniciadoras de tumor (CITs)

A tumorigênese é um processo proveniente de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem a transformação progressiva de células normais em células altamente malignas (Hanahan and Weinberg 2000). Uma característica importante na oncogênese é a aquisição de um fenótipo tronco tumoral pelas células iniciadoras de tumor (CITs). Essas células com fenótipo tronco tumoral foram inicialmente chamadas de "células iniciadoras do câncer", pois acreditava-se que o câncer se iniciava a partir delas. Agora se tornaram o foco principal da biologia celular do câncer, não só por sua característica iniciadora de tumor, bem como para manutenção tumoral e resistência a terapias antitumorais (Maiuthed et al. 2018).

Existem dois modelos principais, que não são mutuamente exclusivos, para descrever a organização heterogênea dos tumores, o modelo estocástico e o modelo hierárquico (**Figura 3**). O modelo estocástico é baseado na evolução clonal, o qual considera que o acúmulo de mutações genéticas resulta em uma população dominante do tumor com probabilidade igual de iniciar, manter e promover o crescimento do tumor (**Figura 3A**). Neste modelo, a tumorigênese ocorre a partir de células somáticas diferenciadas normais que aleatoriamente adquirem mutações oncogênicas resultando em no crescimento e proliferação tumoral (Reya et al. 2001; Visvader and Lindeman 2012; Melzer et al. 2017).

Já o modelo hierárquico sugere que o tumor se inicia a partir de uma célula que adquire um fenótipo tronco através de mutações genéticas e/ou alterações epigenéticas, originando uma

célula tronco tumoral, ou célula iniciadora de tumor (CIT) (**Figura 3B**). Essa teoria sugere que as CITs representam uma pequena população de células tumorais, não-diferenciadas, pouco proliferativas, com potencial de autorrenovação, que se encontram no topo da organização celular tumoral hierárquica, comprometidas com a expansão e diferenciação de células tumorais maduras altamente proliferativas, porém não tumorigênicas, ou seja, que não têm capacidade de iniciar um novo tumor (Reya et al. 2001; Quail et al. 2012; Visvader and Lindeman 2012; Melzer et al. 2017).

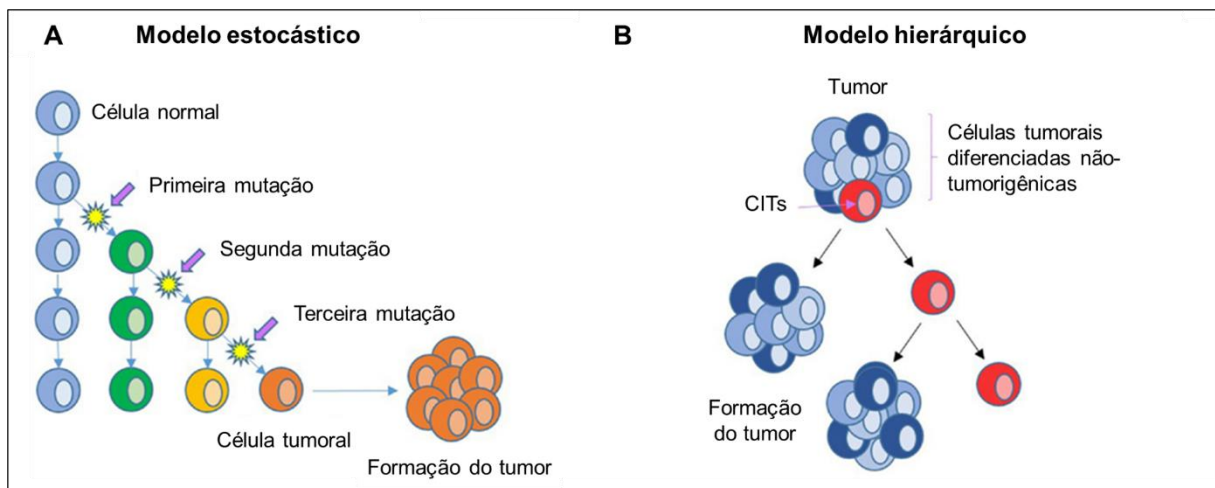


Figura 3 – Modelos de organização heterogênea dos tumores. (A) O modelo de evolução clonal supõe que uma célula normal sofre uma série de mutações para formar uma célula tumoral que se expande e forma a maior parte do tumor. (B) O modelo hierárquico de células iniciadoras de tumor (CITs) propõe que a formação tumoral se origina das CITs que são pluripotentes, autorrenováveis e altamente tumorigênicas, que se dividem assimetricamente para formar novas CITs e a células tumorais diferenciadas não-tumorigênicas. Adaptado de (Bradshaw et al. 2016).

A heterogeneidade tumoral tem se mostrado um importante fator para a recorrência e disseminação das células tumorais. O desenvolvimento da diversidade celular dentro de um tumor tem sido amplamente atribuído a esses dois modelos. No modelo hierárquico, as CITs podem se diferenciar em populações menos autorrenováveis de não-CITs que formam a maior parte do tumor (Cabrera et al. 2015). No entanto, mais recentemente, o conceito de que não-CITs também podem se converter em CITs vem sendo amplamente discutido (Chaffer et al.

2011; Gupta et al. 2019; Huang et al. 2020). Assim, o fenótipo tronco-tumoral pode ser estabelecido como um estado celular que pode ser reversivelmente “ativado” ou “desativado”, ou seja, a plasticidade celular pode permitir a interconversão recíproca entre CITs e não-CITs. Portanto, o modelo de plasticidade traz mais complexidade à maneira como as populações de células heterogêneas podem surgir dentro de um tumor (Thankamony et al. 2020).

Dessa forma, as CITs são definidas como uma pequena população de células tumorais autorrenováveis capazes de iniciar a formação de tumores e sustentar o crescimento tumoral heterogêneo (Reya et al. 2001). As células-tronco tumorais compartilham semelhanças genéticas e funcionais com as células-tronco normais, como a capacidade de autorrenovação e diferenciação em tipos de células de várias linhagens. As primeiras evidências de que as células tumorais compartilhavam características de células tronco foram observadas em cânceres do sistema hematopoiético, devido a sua capacidade de geração e regeneração dos sistemas hematopoiético e imunológico. Células hematopoiéticas expressam o antígeno CD34 em sua superfície e a expressão desse marcador está associada a reconstituição de longo e curto prazo da hematopoiese. Descobriu-se então que uma subpopulação de células de leucemia mieloide aguda CD34+ tinham potencial de reiniciar a leucemia *in vivo* (Reya et al. 2001).

Desde então, diversos marcadores de superfície de células tronco foram identificados em subpopulações de células de tumores sólidos que apresentam um fenótipo mais agressivo. O CD133 é uma proteína transmembrana glicosilada encontrada na superfície de células tronco normais e é um dos marcadores de superfície mais utilizados para purificação e caracterização de células tronco tumorais. Células tronco embrionárias perdem a expressão de CD133 durante a diferenciação celular (Sundberg et al. 2009). Ainda, células tumorais positivas para CD133 (CD133⁺) possuem maior potencial tumorigênico quando comparado a células que não expressam CD133 (CD133⁻) em tumores sólidos (Grosse-Gehling et al. 2013).

Outros dois marcadores de superfície amplamente utilizados para identificação de células tronco tumorais é a combinação do CD24 e do CD44. O CD44 é um receptor de ácido hialurônico e atua nos processos de migração, invasão e adesão de células tumorais através da interação com ácido hialurônico presente na matriz extracelular (Kim and Kumar 2014). Já o CD24 é um antígeno expresso em diversos tipos de tumores a perda de sua expressão está associada ao ganho do fenótipo tronco tumoral (Shi et al. 2010). A subpopulação de células tumorais de mama $CD44^+/CD24^{-/low}$ apresenta um fenótipo mais agressivo e está associada à ocorrência de metástases e quimiorresistência e ao aumento do fenótipo tronco tumoral (Abdoli Shadbad et al. 2021).

A evidência da plasticidade das células tronco tumorais é observada pela regulação dinâmica da expressão desses marcadores. Em câncer de mama, células mesenquimais caracterizadas como $CD24^-CD44^+$ são principalmente quiescentes e localizadas na frente invasiva do tumor, enquanto as células do tipo epitelial expressam ALDH, um aldeído desidrogenase, são proliferativas e estão localizadas mais centralmente. Células isoladas $CD24^-CD44^+$ e $ALDH^+$ geraram populações heterogêneas recapitulando a proporção de CITs $CD24^-CD44^+$ e $ALDH^+$ presentes na linhagem celular original (Liu et al. 2014).

Também são encontrados em células tronco tumorais os fatores de transcrição SOX2 (*SRY-box transcription factor 2*), Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) e Nanog, que são essenciais para o desenvolvimento embrionário e também para manutenção do fenótipo tronco em células tronco normais adultas. O Nanog é uma homeoproteína que mantém a capacidade de autorrenovação em células embrionárias através da regulação de diversas vias envolvidas na pluripotência, como a via de Dnmt1, uma DNA metiltransferase que reprime a expressão de genes associados à diferenciação celular. Essa regulação positiva ocorre pela ligação de Nanog e Oct4 ao promotor de Dnmt1 em células humana embrionárias (Tsai et al. 2012). O MYC é um fator de transcrição que, mediado por Nanog e SOX2, atua diretamente na

autorrenovação de células tronco tumorais e normais pela da regulação da bomba de efluxo ABCG2 (*ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*) e do fator indizível por hipóxia HIF-2 α (*hypoxia-inducible transcription factor-2 α*) (Das et al. 2019).

O SOX2 também está envolvido na resistência à apoptose. Em células tumorais pulmonares, observou-se que o silenciamento de SOX2 induz a expressão do marcador de autofagia LC3-II e dos marcadores apoptóticos PARP e caspase-3 clivados (Chou et al. 2013b). Em outro estudo, também realizado com células tumorais pulmonares, observou-se que a expressão do supressor tumoral p53 e de proteínas pró-apoptóticas, como Bax, Bad e citocromo c, aumentou após o silenciamento de SOX2, enquanto o nível de expressão das proteínas anti-apoptóticas XIAP e Survivina diminuiu (Chen et al. 2014).

Adicionalmente, as CITs possuem características tronco que conferem a essas células a capacidade formar tumores com um menor número de células, propriedade essencial para a ocorrência de recidiva em tumores. Mather et al (2013) mostraram que as CITs isoladas de pacientes com carcinoma pulmonar são capazes de recriar a morfologia original do carcinoma quando inoculadas em camundongos imunodeficientes a partir de clones de células únicas (Mather et al. 2013). Em células de câncer de pele, uma subpopulação selecionada a partir da expressão positiva de SOX2 mostrou uma capacidade muito maior de formar tumores xenográficos em camundongos imunodeficientes com diferentes diluições de células, de 10 a 10.000 células. Somente a subpopulação de células tronco tumorais SOX2⁺ foi capaz de formar tumor xenográfico com 10 células. Ainda, enquanto em quase 100% dos camundongos que foram inoculados com 10.000 células purificadas com fenótipo tronco tumoral observou-se formação e crescimento tumoral, em camundongos inoculados com a subpopulação não-tronco, a formação de tumores foi observada em menos de 1/4 dos camundongos (Boumahdi et al. 2014).

As terapias convencionais têm como alvo a inibição do crescimento e aumento da morte celular, restringindo a disseminação do câncer. Entretanto, as CITs são células pouco proliferativas, podendo permanecer quiescentes por longos períodos. A quiescência é um dos mecanismos das CITs envolvido na sobrevivência celular. Uma vez que as principais terapias antitumorais são baseadas na ação antiproliferativa, essas terapias induzem a dormência de CITs que, na maioria dos casos, são as principais responsáveis pela recidiva da doença, muitas vezes mais agressivas (Baudino 2015; Leon et al. 2016). De fato, existem evidências de que terapias convencionais, ao mesmo tempo em que reduzem drasticamente o crescimento e o número de células tumorais, também podem induzir o enriquecimento de células com fenótipo tronco tumoral. Arasada et al (2014) mostraram que a inibição de EGFR com erlotinibe em linhagens celulares de câncer de pulmão induz diretamente a sinalização Notch, que exerce um papel importante no desenvolvimento de células embrionárias e diferenciação celular. Além disso, esse efeito foi observado com EGFR mutado, constitutivamente ativado, e com EGFR selvagem (Arasada et al. 2014). Em outro estudo, também com linhagens celulares de câncer de pulmão, foi demonstrado que a cisplatina em baixas doses levou ao enriquecimento de células CD133+, aumentou a resistência cruzada à doxorrubicina e ao paclitaxel, mediado pela ativação da sinalização Notch (Liu et al. 2013). Em células de carcinoma de cabeça e pescoço foi observado que a dormência é mediada pelo NR2F1, um receptor nuclear envolvido na diferenciação de células da crista neural humana. O aumento da expressão de NR2F1 foi observado em células dormentes, quando comparadas com células proliferativas, e a sua inibição reduziu a expressão dos genes associados ao fenótipo tronco tumoral SOX2 e Nanog, dois fatores de transcrição envolvidos na manutenção da autorrenovação de células-tronco embrionárias indiferenciadas (Sosa et al. 2015).

Outros mecanismos estão associados à resistência das CITs a quimio e radioterápicos e sobrevivência celular. Assim como em células tronco normais, as bombas de efluxo também

são superexpressas em CITs (Abbott 2003). Células de câncer colorretal CD44⁺CD133⁺ tratadas com doxorubicina (DXR) mostraram a expressão aumentada da bomba de efluxo ABCB1 e o acúmulo intracelular diminuído de DXR (Goto et al. 2020). Em células de câncer de pulmão de células não pequenas CD133⁺ tratadas com DXR e paclitaxel, foi observado o aumento da expressão das bombas de efluxo ABCB1 e ABCG2, por meio da ativação da via de sinalização de Notch (Liu et al. 2013).

Outro mecanismo de CITs relacionado com a resistência à radioterapia é o aumento da capacidade de reparo de DNA, característica também presente em células tronco normais (Mani et al. 2020). A sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode induzir danos ao DNA e sensibilizar as células para a radioterapia, e as CITs têm sistemas eficientes de reparo de DNA que são capazes de combater os danos potenciais ao DNA após o acúmulo de ROS, através do aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de glutatona, um agente antioxidante envolvido no reparo de DNA (Diehn et al. 2009).

Existem duas teorias, que não são necessariamente mutuamente exclusivas, para explicar a formação de CITs. Uma delas pressupõe que as CITs se originam de mutações oncogênicas que causam transformação maligna de células tronco adultas ou de suas progenitoras. É provável que as mutações que iniciam o câncer surjam em células-tronco de tecidos primitivos, uma vez que estas se autorrenovam naturalmente e persistem por longo prazo, permitindo o acúmulo das mutações necessárias (Barker et al. 2009; Goldstein et al. 2010; Bajaj et al. 2020). Alternativamente, células diferenciadas podem sofrer eventos de transformação, como mutações, estímulos externos ou alterações epigenéticas, que conferem a essas células capacidade de autorrenovação (Das et al. 2020).

Existem alguns mecanismos associados com a aquisição desse fenótipo tronco tumoral. A hipóxia é uma das características mais comuns dos tumores sólidos. Fatores induzidos por

hipóxia (HIFs) são fatores de transcrição que estão envolvidos nas vias de sinalização de oxigênio das células. As CITs são dependentes dos fatores induzidos por hipóxia-1 (HIF-1) e 2 (HIF-2) para sobrevivência, autorrenovação, crescimento tumoral e manutenção do fenótipo tronco tumoral. Esses fatores de transcrição regulam a transcrição de fatores de *stemness* como SOX2, Oct4, c-MYC, ABCG2, entre outros, envolvidos na resistência a terapias antitumorais (Heddleston et al. 2010; Sun et al. 2020).

O microambiente tumoral também está envolvido na aquisição do fenótipo tronco tumoral. As células tumorais recrutam macrófagos associados a tumores (TAMs) para o microambiente tumoral, reprogramando os TAMs para seu próprio benefício. Macrófagos associados a tumores (TAMs), podem ter atividades pró-inflamatórias e antitumorais (M1) ou anti-inflamatórias e pro-tumorigênicas (M2), dependendo de suas interações com outras células imunes. O subtipo M2 promove a progressão tumoral através da secreção de citocinas de crescimento celular e fatores de sobrevivência, como IL-6, IL-1 e IL-8, que atuam aumentando sinais oncogênicos específicos, como as vias Stat3, Notch e Hedgehog, reforçando o fenótipo tronco tumoral (Jinushi et al. 2011; Huang et al. 2020).

Um importante mecanismo associado à aquisição do fenótipo tronco tumoral é a transição epitelial-mesenquimal (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*). Células diferenciadas transformadas podem adquirir propriedades tronco através da ativação epigenética de programas de expressão gênica como a EMT, que é um processo reversível que é caracterizado por desdiferenciação que converte células epiteliais polarizadas em células com fenótipo mesenquimal (Polyak and Weinberg 2009; Lamouille et al. 2014). A EMT está intimamente ligada à biologia das CITs, incluindo aquisição do fenótipo tronco tumoral, fuga do sistema imunológico e resistência à rádio e quimioterapia. Além disso, a EMT resulta em células com fenótipo mesenquimal migratório, sendo assim mais propensas a entrar na circulação e adquirir um destino metastático (Najafi et al. 2019).

1.2.1 CITs e metástase

A metástase é definida como o processo de disseminação tumoral, no qual células tumorais se soltam de um tumor primário, ou seja, um tumor que se inicia no próprio órgão, caem na circulação e invadem um novo tecido. Esse processo consiste em uma sequência de etapas, desde o escape de células tumorais do tumor primário, intravasamento para circulação sanguínea, manutenção de sobrevivência, extravasamento para um novo tecido e nova colonização (Majidpoor and Mortezaee 2021).

Para que esse processo ocorra, algumas células tumorais passam pela EMT (**Figura 4**). Nessa transição, a célula com fenótipo epitelial perde a capacidade de adesão célula-a-célula e a polaridade ápico-basal e adquire um fenótipo mesenquimal. As caderinas são glicoproteínas de superfície celular que medeiam a adesão célula-célula por meio de seus domínios extracelulares e se conectam ao citoesqueleto de actina por meio da associação de seu domínio citosólico com cateninas intracelulares. As duas caderinas mais bem estudadas são a E-caderina e a N-caderina. A troca da E-caderina por N-caderina é o principal marcador da EMT. Durante esse processo, a célula tem uma redução da expressão de E-caderina e aumento da expressão de N-caderina (Wheelock et al. 2008; Loh et al. 2019).

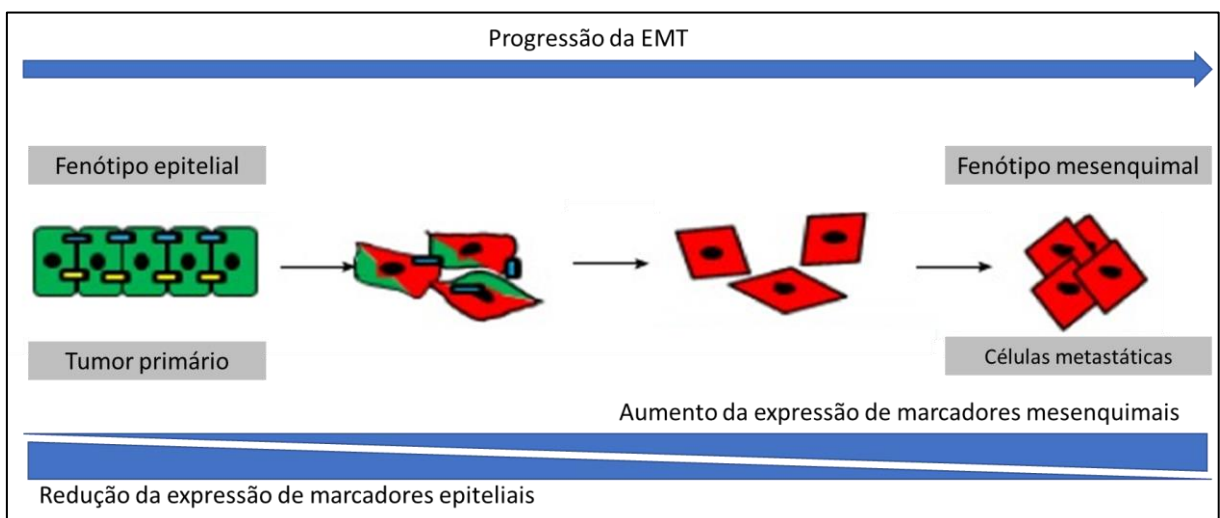


Figura 4 – Transição epitelial-mesenquimal em células tumorais. As células tumorais com fenótipo epitelial perdem o contato célula-célula e ganham habilidades migratórias e invasivas à medida que adquirem o fenótipo mesenquimal. Adaptado de (Garg 2017).

De fato, células de câncer de ovário com maior expressão de N-caderina possuem maior resistência à morte celular e maior capacidade de invasão, quando comparadas com células com maior expressão de E-caderina (Rosso et al. 2017). Em células de câncer de pulmão, a inibição da E-caderina não só levou ao aumento da expressão de genes de *stemness*, como levou ao aumento da capacidade de migração dessas células (Shu et al. 2019).

Esse processo de transição de fenótipos é um processo sequencial envolvendo fenótipos epiteliais híbridos intermediários e mesenquimais, resultando em células em estados intermediários que têm ambas as características epiteliais e mesenquimais. Essas células são plásticas e possuem capacidade de adotar tais fenótipos intermediários e mover-se rapidamente através de vários estados intermediários, que podem ser mais eficientes em atingir a circulação, colonizando e formando metástases (Taki et al. 2021).

De forma geral, após aquisição de um fenótipo mesenquimal, as células migratórias do tumor interagem com a matriz extracelular (ECM) através de integrinas presentes na superfície celular que interagem e se ligam a proteínas da ECM. Essa interação desencadeia uma série de eventos intracelulares essenciais que promove a degradação de proteínas da ECM e consequente migração das células tumorais. O principal mecanismo envolvido na degradação da ECM é a secreção pelas células tumorais de metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são enzimas secretadas em sua forma inativa e então ativadas fora das células pelas integrinas ou outras MMPs (Gálvez et al. 2002; Alizadeh et al. 2014).

Outro processo importante para formação de metástases é a formação de novos vasos, um processo chamado de angiogênese. Este processo é mediado por diversos fatores pró-

angiogênicos que são frequentemente produzidos pelas células tumorais. Dentre estes, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais bem caracterizado e age diretamente nas células endoteliais, através da ligação com receptores de VEGF, promovendo a proliferação, e migração de células endoteliais, induzindo assim a formação de novos vasos (Carmeliet 2005; Martin et al. 2009).

Após extravasarem para a circulação sanguínea, as células tumorais circulantes adotam um estado de dormência como um mecanismo de sobrevivência frente a fatores adversos, incluindo estresse oxidativo, forças de cisalhamento e ação do sistema imunológico (Lo et al. 2020). Outro mecanismo envolvido na capacidade de sobrevivência dessas células na circulação é através da regulação positiva de PD-L1, ligante do PD-1, uma proteína envolvida em diversas vias de respostas imunes induzidas por câncer. O eixo PD1/PD-L1 é identificado como um conjunto de checkpoint imunológico que medeia sinais co-inibitórios para ativação de células T e é utilizado como alvo terapêutico para bloqueio de checkpoint imunológico (Manjunath et al. 2019; Ghosh et al. 2021). Em pacientes com câncer de pulmão, esse marcador, e outro de EMT, se encontraram expressos em proporções significativamente maiores nas células circulantes do que em tecidos NSCLC, e ainda a expressão de PD-L1 e do marcador de EMT nas células circulantes é um preditor negativo de sobrevida para pacientes com NSCLC (Manjunath et al. 2019).

A interação entre as células tumorais circulantes e as células endoteliais no tecido do órgão alvo é essencial no processo de metástase. Moléculas de adesão celular, como a molécula de adesão de células epiteliais do soro (EpCAM) e a molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), promovem a adesão das células tumorais circulantes à parede microvascular, permitindo que essas células invadam o novo tecido (Alexiou et al. 2001; Karabulut et al. 2014).

Uma vez que as células tumorais circulantes invadem o novo órgão, a colonização nesse novo órgão depende de vias de sinalização celular que promovam a sobrevivência e proliferação dessas células heterólogas dentro do tecido saudável. Assim, as células mesenquimais reverterem ao fenótipo epitelial em uma reversão da EMT, chamada de transição mesenquimal epitelial (MET), aumentando a sobrevivência da célula cancerígena metastática. Nesse processo, observa-se o aumento da expressão da E-caderina. Uma vez que a colonização exige que as células tumorais reiniciem a proliferação, a MET é essencial para promover esse crescimento (Gao et al. 2012; Tsai and Yang 2013).

A metástase e o fenótipo tronco tumoral estão intimamente conectados. Células em estágios iniciais da metástase apresentam padrões de expressão gênica semelhantes às células tronco normais (Lawson et al. 2015). A ativação da via de Hedgehog regula positivamente a expressão de Bmi-1, SOX2, Nanog por meio da ativação de membros da família Gli (*glioma-associated oncogene*) (Liu et al. 2006; Cochrane et al. 2015). A inibição da via de Hedgehog/Gli1 não só resulta na redução de expressão de fatores de *stemness in vitro*, como também na redução da capacidade de migração e invasão *in vitro* e *in vivo* de células de câncer colorretal. O aumento da expressão de Gli1 nessas células levou ao acúmulo de metástases no pulmão de camundongos imunodeficientes (Kim et al. 2020).

Em tumores de mama, a EMT leva ao aumento de células com habilidade de autorrenovação, que também apresentam maior expressão de marcadores de célula tronco, como CD44+/CD24-, utilizado para diferenciar populações enriquecidas para o fenótipo tronco tumoral (Mani et al. 2008; Liu and Brown 2010). Um estudo realizado com células de câncer colorretal CD133+/CD44+ mostrou que o tratamento com TPL, um composto que reduz o crescimento de células tumorais, angiogênese e metástases tumorais, diminui a expressão de fatores de EMT, Snail, Slug e Twist, assim como a capacidade de migração e o fenótipo tronco

tumoral, que pode ser medido pela capacidade de autorrenovação e de formação de tumoresferas (Acikgoz et al. 2020).

Outra via intimamente relacionada com *stemness* e metástase é a via de CXCR4/CXCL12. O CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) é um receptor transmembranar acoplado à proteína G que se liga a quimiocinas, sendo o CXCL12 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*) o ligante mais conhecido de CXCR4. A inibição da sinalização de CXCR4/CXCL12 induz a diferenciação celular em células tronco neurais (Ho et al. 2017). Quando ativado pelo ligante CXCL12, o CXCR4 ativa diversas vias efetoras, como a via de Rho, PLC e Ras, que estão envolvidas na indução da migração celular. Além disso, o eixo CXCR4/CXCL12 regula positivamente a expressão de VEGF. A inibição de CXCR4 inibe a formação de novos vasos em camundongos imunodeficientes e reduz a migração e invasão *in vitro* de células oriundas de pacientes com câncer gástrico (Salvucci et al. 2002; Chen et al. 2021).

Dessa forma, a inibição de CITs é uma estratégia terapêutica apropriada para inibir a metástase. Portanto, as diferenças funcionais entre células com e sem potencial tumorigênico e metastático (CITs vs. não CITs) têm implicações importantes para a terapia, tornando crucial a busca por abordagens terapêuticas que atinjam não somente as células tumorais diferenciadas, mas principalmente as CITs.

Diversas vias estão envolvidas na aquisição do fenótipo tronco-tumoral e metastático. Uma das vias oncogênicas importantes que promove esses fenótipos é ativação oncogênica da GTPase KRAS (Smakman et al. 2005; Liu et al. 2009; Kim et al. 2010; Qiu et al. 2011; Leung et al. 2013; Zhu et al. 2014; Lock et al. 2014; Uekita et al. 2014; Xu et al. 2015; Ali et al. 2016; Larsen et al. 2016; Hwang et al. 2020).

1.3 KRAS

1.3.1 GTPases RAS

KRAS é uma GTPase da família das GTPases RAS, que são proteínas associadas à membrana celular que transmitem sinais oriundos de receptores de membrana para efetores intracelulares (Mitin et al. 2005; Wennerberg et al. 2005).

A família das pequenas GTPases RAS em humanos abrange 3 genes, *HRAS*, *NRAS* e *KRAS* que codificam 4 proteínas de aproximadamente 21 kDa. Esses genes possuem cerca de 85% de homologia entre si e o mRNA primário de *KRAS* ainda pode sofrer *splicing* alternativo, originando duas isoformas, *KRAS4A* e *KRAS4B*, sendo *KRAS4B* a forma mais predominante em humanos (Cox et al. 2014). Dessa forma, as proteínas codificadas *HRAS*, *NRAS*, *KRAS4A* e *KRAS4B* compartilham alta homologia nos primeiros 165 aminoácidos e divergem em sua região hipervariável carboxi-terminal (resíduos 166-188 ou -189) (Zhou et al. 2016; Zhang et al. 2018b).

As regiões que são altamente conservadas entre as proteínas RAS são regiões de interação com proteínas efetoras, que irão efetuar a transdução de sinal induzida pela RAS ativa, com o nucleotídeo de guanina e com proteínas que regulam a atividade de RAS. Já a região hipervariável, é crítica para as modificações lipídicas e determinação da ligação à membrana plasmática e cinética de tráfego. A localização dessas proteínas na membrana é essencial para o seu funcionamento (Friday and Adjei 2005; Zhou et al. 2016).

Essa região carboxi-terminal contém um motivo CAAX terminal na posição 186-189, onde o C é uma cisteína, cada A representa um aminoácido alifático, como a leucina, isoleucina ou valina, e o X pode ser uma metionina, serina, leucina ou glutamina. As modificações pós-tradução, a partir do aminoácido 186, que é sempre uma cisteína, aumentam a hidrofobicidade

da região do carboxi-terminal da proteína permitindo sua ancoragem na membrana plasmática (Friday and Adjei 2005; Zhou et al. 2016). A principal modificação pós-traducional responsável pela ancoragem das proteínas RAS à membrana é a prenilação. A prenilação consiste na adição de um grupo farnesil, pela enzima farnesiltransferase, na cisteína do motivo CAAX. Em seguida, após remoção do grupo AAX pela enzima Rce1, a cisteína farnesilada é metilada pela enzima metiltransferase. As isoformas KRAS4A, HRAS e NRAS sofrem então palmitoilação nos grupos SH de resíduos de cisteína de sua extremidade carboxiterminal, permitindo a ancoragem de RAS na membrana plasmática. Já a isoforma KRAS4B não sofre palmitoilação e sua ancoragem à membrana ocorre através da interação do grupo farnesil e por uma região positivamente carregada rica em lisina, que interage com fosfolipídios negativos presentes na membrana plasmática (Friday and Adjei 2005).

Portanto, as duas isoformas de KRAS compartilham homologia em sua região catalítica, mas diferem na região responsável pela ancoragem. Essa diferença reflete na funcionalidade de cada isoforma. Enquanto a isoforma KRAS4A está associada a indução da apoptose, a isoforma KRAS4B atua na mediação do fenótipo tronco tumoral (Quinlan and Settleman 2008; Wang et al. 2015).

1.3.2 Atividade de RAS

As GTPases RAS são proteínas que existem em seu estado ativo e inativo, funcionando como interruptores moleculares binários. Em seu estado ativo, encontra-se ligada ao trifosfato de guanosina (GTP) e se torna inativa através da hidrólise do GTP, permanecendo ligada ao difosfato de guanosina (GDP) (Simanshu et al. 2017).

A ativação das proteínas RAS se inicia com a ativação de um receptor tirosina quinase (RTK), como o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR). Os RTKs permitem a comunicação entre as células e com seu ambiente extracelular, enviando sinais através da

ativação de vias *downstream*, com as vias de RAS (Trenker and Jura 2020). Em geral, os RTKs são encontrados na membrana plasmática da célula, possuindo um domínio extracelular e um domínio citoplasmático. Na ausência de um ligante, esses receptores se encontram como monômeros, em sua forma inativada. A ligação do ligante leva à homo ou heterodimerização desses receptores, resultando na fosforilação de alguns resíduos de tirosina na porção citoplasmática da proteína, que são os locais de ancoragem para algumas proteínas adaptadoras, como Grb2 (*Growth factor Receptor–Bound protein 2*) (Esteban-Villarrubia et al. 2020).

Grb2 é uma pequena proteína altamente conservada com um domínio SH2 (*SRC homology 2*) central rodeado por dois domínios SH3 (*SRC homology 3*). A ligação de Grb2 a receptores ativados por meio de seu domínio SH2 recruta fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEF, *Guanine nucleotide exchange factor*) para a membrana, que promove a dissociação de GDP de RAS. Uma das GEFs recrutadas por Grb2 é o fator SOS (*son-of-sevenless*), formando o complexo SOS-Grb2. A proteína SOS possui múltiplas funções, como catálise, ligação à membrana, regulação alostérica e autoinibição, devido a sua estrutura com diversos domínios. A região rica em prolina do SOS se liga aos domínios SH3 do Grb2, facilitando o recrutamento do SOS para a membrana plasmática. Já o contato entre o domínio de homologia à plestrina de SOS e os fosfolípídios carregados negativamente da membrana induzem mudanças conformacionais que permitem a ligação de RAS em sua forma inativa (RAS-GDP) ao domínio REM (*Ras exchanger motif*) de SOS, promovendo a liberação de GDP (Buday and Vas 2020) (**Figura 5**).

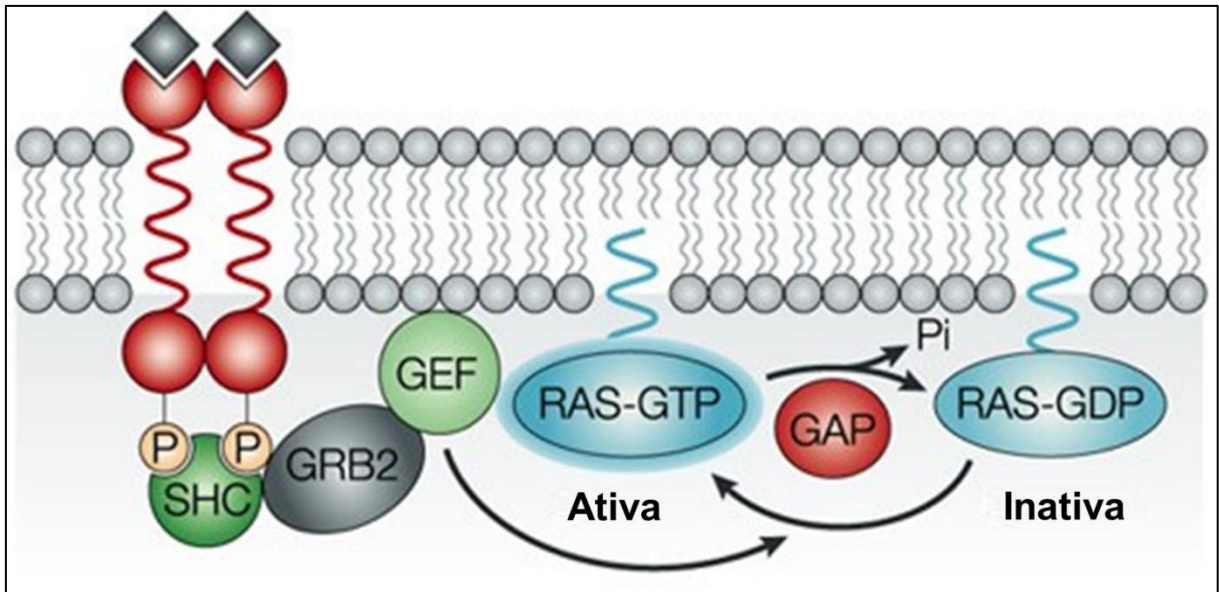


Figura 5 - Regulação de RAS. Em sua forma inativada, RAS encontra-se complexada a GDP. As proteínas GEFs promovem dissociação de GDP de RAS, que logo se associa a GTP, tornando-se ativa. A inativação de RAS ocorre pela hidrólise do GTP. Figura adaptada de Downward 2003.

Rapidamente, como a afinidade de RAS para GDP e GTP é alta e semelhante, essas enzimas se associarão a um novo nucleotídeo de guanina. Entretanto, principalmente devido à concentração celular de GTP ser aproximadamente 10 vezes maior em comparação com GDP, RAS se liga preferencialmente à GTP quando o sítio de ligação à guanina se encontra vazio, tornando-se ativa (Cherfils and Zeghouf 2013; Simanshu et al. 2017).

Para que ocorra a inativação de RAS, o GTP precisa ser hidrolisado. As proteínas RAS possuem atividade GTPásica intrínseca, entretanto esta atividade é muito lenta, sendo que é necessária a interação com GAPs (*GTPase activating proteins*) para que a catálise ocorra de forma eficiente, levando à inativação de RAS (Simanshu et al. 2017).

O domínio catalítico de RAS contém vários motivos, incluindo *Switch I*, que possui uma treonina no códon 35 (Thr35), que se liga ao fosfato terminal de GTP e ao íon de magnésio, e *Switch II*, que possui um resíduo de glicina no códon 61 (Gln61), diretamente responsável pela atividade GTPásica de RAS. Quando a GAP interage com a RAS ativa, a molécula de GTP fica fortemente ligada em uma fenda formada entre RAS e GAP, onde os grupos fosfato do GTP

são coordenados pelo íon magnésio Mg^{2+} . A GAP possui um dedo de arginina (Arg789) que interage com os grupos fosfato de GTP na fenda e coordena a cadeia lateral de Gln61 de RAS, o que leva ao melhor posicionamento de GTP no sítio catalítico de RAS, aumentando sua atividade GTPásica em cerca de 1.000 vezes (Prior and Hancock 2012; Grigorenko et al. 2019).

Em condições fisiológicas, a forma ativa de RAS interage com efetores ativando cascatas de sinalização que iniciam a proliferação celular e, conseqüentemente, sua inativação leva à inativação dessas vias e ao controle do crescimento celular (Downward 2003).

Em tumores, mutações pontuais na proteína KRAS envolvendo o domínio de ligação às GAPs (códon 12 e 13) ou o domínio catalítico (códon 61) determinam ativação constitutiva da proteína devido à perda da capacidade de hidrolisar o GTP, seja por perda da interação com GAPs (códon 12 e 13) ou por perda da atividade GTPásica intrínseca (códon 61). Isto impede o bloqueio da sinalização que estimula o crescimento, a proliferação e diferenciação celulares. Como consequência, ocorre proliferação celular descontrolada, transformação maligna e desenvolvimento tumoral mesmo na ausência de estímulo extracelular (Macaluso et al. 2002; Downward 2003).

As mutações em HRAS são raras, ocorrendo em 4% dos cânceres com mutação em RAS e são frequentemente encontradas em carcinomas de células escamosas de bexiga e cabeça e pescoço. NRAS ocorre em aproximadamente 12% dos cânceres com mutação em RAS, sendo mais comum em melanomas cutâneos e leucemia mieloide aguda. Já KRAS é a proteína da família RAS mais frequentemente mutada (em 84% dos casos) e ocorre principalmente em câncer de pulmão, pâncreas e colorretal (Waters and Der 2018).

1.3.3 KRAS e os fenótipos tronco tumoral e metastático

Além do seu envolvimento clássico na transformação maligna (Guerrero et al. 2000; Fisher et al. 2001; Fleming et al. 2005; Park et al. 2015; Du et al. 2020; Shimizu et al. 2020),

alguns estudos vêm demonstrando um papel importante da KRAS oncogênica para o fenótipo tronco-tumoral. A KRAS, não apenas impede a diferenciação mediada por ácido retinóico de progenitores endodérmicos *in vitro* (Quinlan et al. 2008), mas também promove a manutenção e expansão de CITs em cancer de mama (Liu et al. 2009; Kim et al. 2010; Seguin et al. 2014), queratinócitos (Jiang et al, 2014), cancer de próstata (Weng et al. 2019), câncer colorretal (Okada et al. 2014; Hwang et al. 2020), cancer pancreático (Wang et al. 2015; Liu et al. 2021) e câncer de pulmão (Ali et al. 2016). Por exemplo, a KRAS promove o fenótipo tronco tumoral em células de câncer colorretal através da ativação da via de Wnt/ β -catenina por REG4 (*Regenerating Family Member 4*), sendo que o silenciamento de REG4 reduz significativamente a capacidade de em células de câncer colorretal com ativação de KRAS de formarem tumoresferas e a capacidade de formarem tumores em camundongos imunodeficientes (Hwang et al. 2020). Em células tumorais pancreáticas, a KRAS oncogênica induz a translocação de Lin28B, uma proteína de ligação ao RNA, para o núcleo, que regula positivamente a expressão dos marcadores de *stemness* Oct4, Nanog e SOX2, induzindo o fenótipo tronco tumoral e a capacidade migratória de células tumorais pancreáticas (Liu et al. 2021). KRAS também está envolvida na aquisição do fenótipo tronco tumoral pela inibição da via não canônica de Wnt/ Ca^{2+} em células pancreáticas, por meio da inibição de Fzd8, um componente dessa via. A via não canônica de Wnt inibe a sinalização da via canônica de Wnt, importante para aquisição e manutenção do fenótipo tronco tumoral, bloqueando a interação β -catenina e TCF4. Interessantemente, KRAS4B, e não HRAS, NRAS ou KRAS4A, se ligam a calmodulina, reprimindo a expressão de Fzd8, e então reestabelecendo a sinalização da via canônica de Wnt/ β -catenina e o fenótipo tronco tumoral (Wang et al. 2015).

Consistente com o seu papel em promover o fenótipo tronco tumoral, a KRAS oncogênica também vem sendo implicada na promoção de um fenótipo metastático (Pylayeva-Gupta et al. 2011; Chan and Chen 2012; Uekita et al. 2014). A KRAS oncogênica induz

processos como a EMT que, por sua vez, promove o fenótipo tronco tumoral (Liu et al. 2009; Holland et al. 2013; Xu et al. 2015), e também induz a autofagia (Lock et al. 2014), que aumentam a capacidade invasiva das células tumorais. KRAS não só controla a formação de metástases colorretais (Smakman et al. 2005; Zhu et al. 2014) e pancreáticas (Qiu et al. 2011; Leung et al. 2013), mas também promove o fenótipo metastático em câncer de pulmão (Larsen et al. 2016). Por exemplo, através da inibição em células tumorais pancreáticas da expressão de RKIP, um supressor tumoral inibidor da via da MAPK-ERK, a KRAS oncogênica aumenta a capacidade de migração e invasão *in vitro* e a formação de metástases pulmonares *in vivo* (Yang et al. 2018). Ainda, um estudo clínico demonstrou que KRAS oncogênica está envolvida na metástase tumoral de câncer colorretal para o pulmão e o fígado. Mutações KRAS G12D detectadas no tumor primário foram identificadas principalmente em metástases no pulmão, enquanto mutações KRAS G12V foram encontradas em sítios metastáticos no fígado e pulmão, e também em recorrência local (Jo et al. 2020).

Portanto, explorar vias oncogênicas controladas por KRAS que promovem o fenótipo tronco-tumoral das CITs é importante porque a ativação oncogênica de KRAS é um evento muito frequente em neoplasias humanas, principalmente no adenocarcinoma pulmonar, onde mutações oncogênicas em *KRAS* estão presentes em aproximadamente 30% dos pacientes (Brady et al. 2015; Unni et al. 2015). Não só estas mutações são frequentes nestas neoplasias, mas também estão associadas com um comportamento agressivo e pior prognóstico (Mascaux et al. 2005).

1.3.4 KRAS como alvo terapêutico

Por muito anos, a inibição direta de KRAS não se mostrou eficiente para o tratamento de cânceres portadores dessa mutação. Um dos principais desafios na busca de inibidores de KRAS consiste na seletividade para a forma mutante de KRAS, discriminando-a da forma não

mutada. Uma das estratégias mais estudadas na inibição direta de KRAS é através da inibição do processo de farnesilação, e conseqüentemente da ancoragem de KRAS na membrana plasmática. Embora essa estratégia tenha obtido sucesso em ensaios *in vivo* (End et al. 2001), não obtiveram sucesso em testes clínicos com pacientes com câncer de pulmão, colorretal e de pâncreas portadores de mutação em KRAS (Sharma et al. 2002; Adjei et al. 2003; Cohen et al. 2003). O insucesso da estratégia de inibição da farnesilação em ensaios clínicos se deve à capacidade de KRAS de sofrer um processo de prenilação alternativa, a geranylgeranilação, levando assim a sua ancoragem a membrana (Whyte et al. 1997).

No entanto, recentemente, foi conduzido um estudo de fase II em pacientes com câncer de pulmão portadores de mutação G12C em KRAS (KRAS^{G12C}) com sotorasibe, uma pequena molécula que inibe específica e irreversivelmente KRAS^{G12C} por meio de uma interação única com o motivo Switch II, mantendo KRAS^{G12C} ligada a GDP e, portanto, em sua forma inativa. O sotorasibe interage com uma histidina na posição 95, uma tirosina na posição 96, com uma glutamina na posição 99 e com a cisteína na posição 12, conferindo a seletividade para a forma mutada G12C de KRAS. Esse estudo demonstrou que a terapia com sotorasibe resultou em um benefício clínico durável em pacientes com câncer de pulmão com KRAS^{G12C} (Skoulidis et al. 2021). Estudos com sotorasibe e outros inibidores de KRAS^{G12C} estão em andamento (NCT05005234, NCT05002270, NCT04330664, NCT04685135). Entretanto, a inibição direta de KRAS^{G12C} ainda não está consolidada e não existem estratégias em ensaio clínico para a inibição direta de outras formas mutantes da KRAS.

Como a KRAS oncogênica promove a transformação maligna e o fenótipo tronco-tumoral, ela representa um alvo terapêutico racional, cuja inibição em câncer de pulmão deveria trazer benefícios clínicos. Entretanto, por diversas razões, terapias efetivas para pacientes portadores de neoplasias induzidas por mutações oncogênicas em KRAS tem se mostrado um desafio. Além disso, se faz necessária a busca por terapias que sejam eficazes em pacientes

portadores de diferentes mutações no códon 12, assim como nos códons 13 e 61. Portanto, uma estratégia para que seja possível selecionar melhores alvos terapêuticos para terapia de câncer de pulmão é através da identificação de mediadores induzidos por KRAS, que controlam as características oncogênicas críticas para o crescimento e progressão tumorais, como o fenótipo tronco tumoral.

Um dos efetores que reduz a oncogenicidade celular em linhagens pulmonares e pancreáticas mutantes para KRAS é a quinase Aurora A (dos Santos et al. 2016; Gomes-Filho et al. 2020).

1.4 A QUINASE AURORA A

1.4.1 Estrutura e função

As quinases Aurora fazem parte de uma família de serina-treonina quinases, que estão relacionadas com regulação da mitose e são expressas principalmente em tecidos com alta proliferação celular, onde regulam a progressão do ciclo celular, desempenhando um papel crucial no controle da segregação de cromátides. Os genomas de mamíferos codificam exclusivamente três quinases Aurora, a Aurora A (AURKA), a Aurora B (AURKAB) e a Aurora C (AURKC) (Tang et al. 2017).

As quinases Aurora são quinases com tamanho variando de 275 a 403 resíduos de aminoácidos, com uma organização de domínio semelhante: um domínio N-terminal de 8-131 resíduos de comprimento, um domínio catalítico, e um domínio C-terminal curto de 15-20 resíduos. A região responsável pelas interações das Auroras com proteínas alvo é a região N-terminal. Essa região possui baixa semelhança entre as 3 Auroras, conferindo assim seletividade para as interações. (Carmena and Earnshaw 2003). O domínio catalítico possui um *loop* de

ativação (*A-loop*) onde ocorre a fosforilação e ativação das Auroras. Nas regiões N-terminal e C-terminal, essas quinases possuem sítios específicos de degradação, o A-box e D-box, onde ocorre interação com proteínas de degradação, como Cdh1 e E3 ubiquitina ligase (**Figura 6**) (Lim and Gopalan 2007).

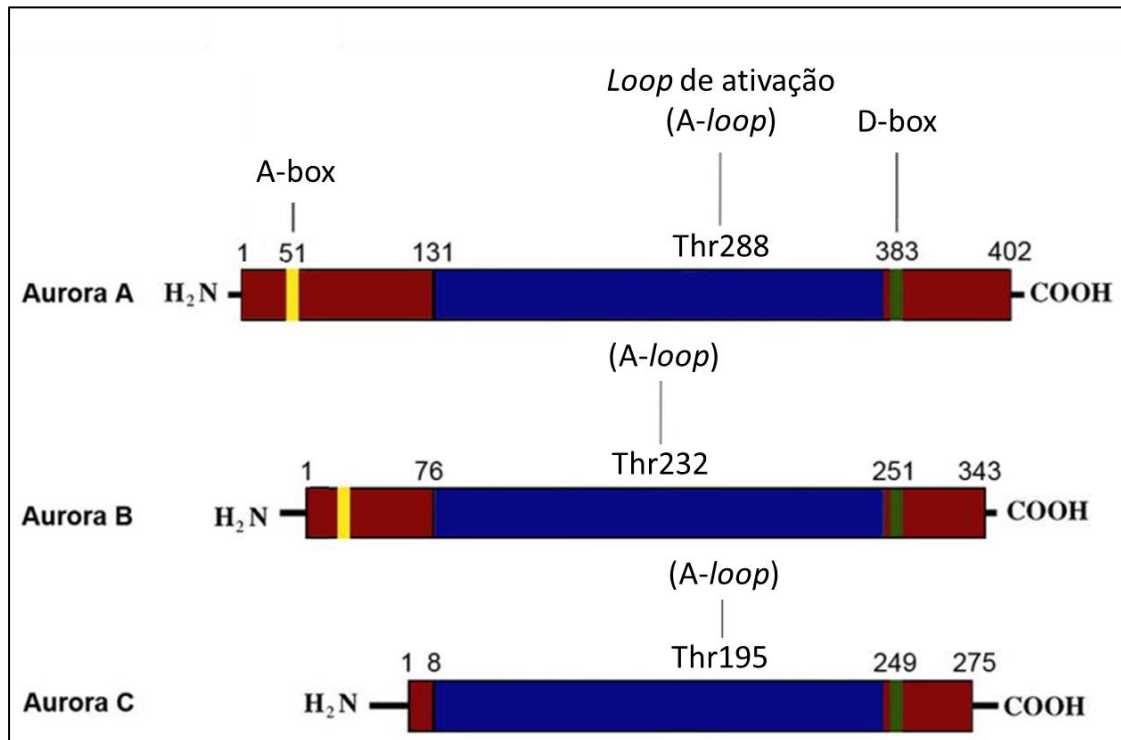


Figura 6 - Estrutura e domínios das Aurora quinases. Os domínios do N-terminal (vermelho) e C-terminal (vermelho) das Aurora quinases contêm motivos reguladores A-box (amarelo) e D-box (verde), respectivamente, enquanto o domínio catalítico (azul) inclui resíduo de ativação (T-loop) e os resíduos de treonina, substratos de fosforilação. Adaptado de (Goldenson and Crispino 2015).

As 3 quinases Aurora possuem desempenhos distintos durante o ciclo celular, sendo a AURKA e AURKB importantes quinases da mitose e a AURKC da meiose. A AURKC é uma quinase que desempenha um importante papel na espermatogênese e desenvolvimento do oócito, e tem função semelhante à da AURKB, envolvida na segregação dos fusos meióticos (Goldenson and Crispino 2015; Tang et al. 2017).

A AURKB está envolvida na citocinese e na arquitetura cromossômica. Essa quinase interage com o complexo cromossômico passageiro (CPC) que se localiza no centrômero

interno durante a prófase, através da metáfase e, em seguida, se move para a zona média do fuso e o corpo médio durante a mitose tardia e citocinese (Kollareddy et al. 2008; Goldenson and Crispino 2015).

A atividade da AURKA no ciclo celular está intimamente relacionada aos centrossomos. Sua principal função é a coordenação da maturação e separação dos centrossomos e montagem do fuso bipolar. Durante a fase S do ciclo celular até o final da fase G2, a AURKA, ainda em baixos níveis, começa a se acumular na região pericentriolar. No final da fase G2 e início da mitose a AURKA, com níveis de expressão mais altos, se localiza nos polos do fuso, atuando na maturação, duplicação e separação dos centrossomos. Na entrada da mitose, a AURKA atua na formação e alongamento dos microtúbulos até a placa metafásica. Já nas fases tardias, a AURKA se localiza na zona média do fuso atuando no alinhamento e separação dos cromossomos (**Figura 7**) (Marumoto et al. 2003; Kollareddy et al. 2008; Nikonova et al. 2013; Goldenson and Crispino 2015).

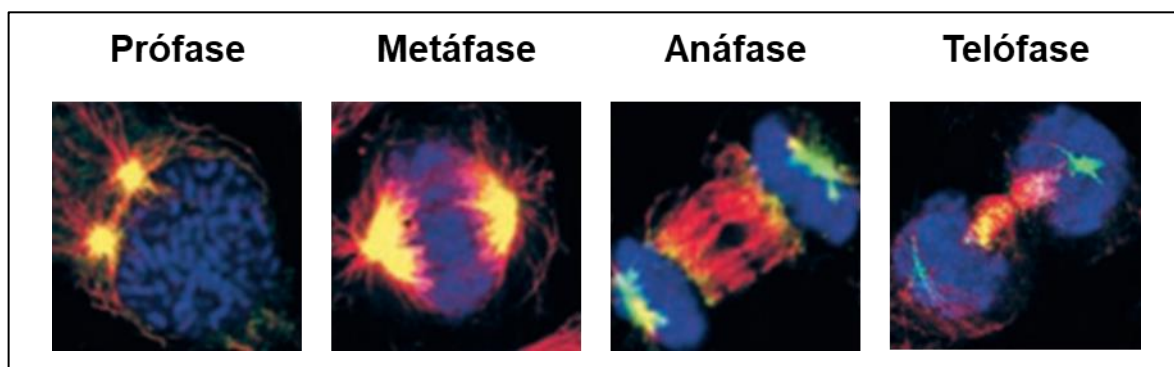


Figura 7 - Localização da AURKA durante a divisão celular. A AURKA (amarelo) está localizada nos polos do fuso e nos fusos mitóticos durante a mitose inicial e em ambos os polos e na placa metafásica durante a mitose tardia. O DNA (azul) e a α -tubulina (vermelho) também são mostrados na imagem. Adaptada de Marumoto et al. 2003

O domínio catalítico de AURKA possui dois lobos, o lobo C, que consiste em uma estrutura α -helicoidal, e o lobo N, que é formado por uma série de domínios folha β e uma única α -hélice. O domínio N forma a parede do sítio ativo e desempenha um papel central na

regulação da atividade da quinase, responsável pelo posicionamento do ATP. Já o lobo C consiste em uma estrutura α -helicoidal e contém o motivo catalítico conservado no sítio ativo, formando a alça de ativação da quinase, onde ocorre a fosforilação regulatória dos substratos (Levinson 2018).

A ativação de AURKA ocorre através da autofosforilação de Thr288 no *loop* de ativação da quinase, mudando a conformação tridimensional do sítio catalítico (Walter et al. 2000). Essa autofosforilação ocorre através da interação de AURKA com diversas outras proteínas, como Ajuba, calmodulina, NEDD9 e TPX2 (*targeting protein for Xklp2*) (Janeček et al. 2016).

1.4.2 AURKA e câncer

A superexpressão de AURKA pode levar à instabilidade genética, podendo resultar em células aneuploides e poliploides. Fusos poliploides são observados em tumores, sugerindo que as anomalias centrossomais contribuem para o desenvolvimento do câncer (Meraldi 2002; Nikonova et al. 2013).

Por ser uma quinase mitótica, não é surpreendente que a AURKA se encontre superexpressa em uma variedade de tumores (Malumbres and Pérez De Castro 2014), incluindo tumores pulmonares (Xu et al. 2006; Ogawa et al. 2008; Lo Iacono et al. 2011; Shah et al. 2019).

A superexpressão de AURKA leva ao aumento da proliferação celular, redução da morte celular, instabilidade genética e tumorigênese em células de câncer de ovário, de bexiga, colorretal, pancreático, carcinoma hepatocelular e leucemia (Li et al. 2003, 2018a; Jeng et al. 2004; Landen et al. 2007; Ochi et al. 2009; Chuang et al. 2016; Long et al. 2020).

Mais importante, a quinase Aurora A contribui para a transformação maligna induzida pela KRAS oncogênica. Recentemente nós demonstramos, não só que a KRAS promove a

expressão de AURKA, mas também que a inibição da expressão ou atividade desta quinase em linhagens pulmonares mutantes para KRAS reduz a oncogenicidade celular *in vitro* e tumorigenicidade *in vivo* (dos Santos et al. 2016). Nós observamos também que a AURKA tem expressão aumentada em tumores pancreáticos, que a AURKA é alvo da KRAS oncogênica em células de adenocarcinoma pancreático e que a inibição de AURKA em células tumorais pancreáticas mutantes para KRAS reduz a oncogenicidade celular (Gomes-Filho et al. 2020).

1.4.3 AURKA e os fenótipos tronco tumoral e metastático

A função mitótica de AURKA já está bem estabelecida na literatura. Entretanto, a AURKA possui importante papel em vias não-mitóticas que contribuem para seu potencial oncogênico, como vias de reparo de DNA e vias que promovem o fenótipo tronco tumoral. Por exemplo, em um estudo realizado com células de carcinoma urotelial, a superexpressão de AURKA foi correlacionada com a redução da expressão dos genes de resposta a danos ao DNA, BRCA1 e CHK2 (Veerakumarasivam et al. 2008).

Acredita-se que AURKA exerça suas funções não-mitóticas através da regulação de fatores de transcrição, como os fatores de transcrição da família MYC, que são essenciais na aquisição e manutenção do fenótipo tronco tumoral (Zheng et al. 2016; Yoshida 2018). Zheng et al. (2016) mostraram que AURKA se localiza no núcleo, onde atua como um fator de transcrição de *MYC*, ativando sua transcrição, aumentando a proliferação de células com fenótipo tronco tumoral de câncer de mama. Entretanto, a interação de AURKA com o promotor de *MYC* não é dependente da atividade de AURKA, sugerindo que a localização nuclear de AURKA, e não sua atividade de quinase, é responsável pela regulação de *MYC* (Zheng et al. 2016).

Outro mecanismo sugerido para a regulação de *c-MYC* mediado por AURKA é através do acúmulo de β -catenina no núcleo. Em um estudo realizado com células de câncer gástrico,

observou-se que a superexpressão de AURKA leva ao aumento de fosfo-GSK-3 β e consequentemente a uma redução da fosforilação de β -catenina, prevenindo a sua degradação. Assim, o acúmulo de β -catenina no citoplasma promove seu deslocamento para o núcleo, regulando a expressão de diversos oncogenes, como o *c-MYC* (Dar et al. 2009).

A AURKA também induz o fenótipo tronco tumoral de CITs de mama através da regulação transcricional de DROSHA, aumentando a estabilidade do mRNA de DROSHA, que atua no processamento de micro RNAs envolvidos na tumorigênese e no fenótipo tronco tumoral, através de uma função não-canônica de DROSHA, que interage com β -Catenina e promove a ativação de STC1 (Peng et al. 2021). Também em células de câncer de mama, observou-se que o acúmulo de AURKA no núcleo contribui para o fenótipo tronco tumoral. Em células com superexpressão de AURKA, há um aumento da expressão dos genes de *stemness* SOX2, Nanog e *c-MYC*, e a inibição dessa quinase leva à redução do crescimento tumoral em camundongos (Yang et al. 2017). Diversos outros trabalhos mostraram que a AURKA possui um importante papel na manutenção do fenótipo tronco tumoral de CITs de ovário, glioma, colorretais e de mama (Cammalleri et al. 2010; Chefetz et al. 2011; Mannino et al. 2014; Zheng et al. 2014, 2016). Além disso, nós mostramos que a inibição de AURKA reduz o fenótipo tronco tumoral e clonogenicidade de CITs pulmonares (Scalabrini 2016).

A AURKA, não só tem expressão aumentada em células tronco tumorais, mas também é capaz de promover a EMT e metástase. Em células de carcinoma hepatocelular ocorre superexpressão de AURKA em células metastáticas, sendo que a inibição dessa quinase leva à redução da capacidade de invasão dessas células (Chen et al. 2017). O silenciamento de AURKA em células tumorais pulmonares leva a redução da migração e invasão, *in vitro* e *in vivo*, pela regulação de CXCL5 (*C-X-C motif chemokine ligand 5*). O silenciamento de AURKA em células tumorais pulmonares leva à redução da expressão de CXCL5 e a suplementação com CXCL5 resgata a capacidade de migração e invasão dessas células (Wang et al. 2021a). Ainda,

em células de carcinoma pancreático, observou-se que AURKA fosforila Twist1, inibindo sua degradação, e consequentemente ativando a EMT. Além disso, a superexpressão de AURKA aumenta a expressão de marcadores de EMT, como a N-caderina, Vimentina, Snail e Slug e reduz a expressão de E-caderina (Wang et al. 2017). Em estudo realizado com células de pacientes com câncer de fígado metastático foi observado que a proteína PARP10 é responsável por regular negativamente a atividade de AURKA, apenas no núcleo, e que a inibição de PARP10 leva ao aumento de metástases *in vivo* (Zhao et al. 2018).

Apesar destes estudos indicando um papel importante da AURKA para o fenótipo tronco tumoral e metastático, o papel da AURKA para o fenótipo tronco tumoral induzido por KRAS em câncer de pulmão permanece pouco explorado. Determinar se a AURKA participa do mecanismo de indução do fenótipo tronco tumoral promovido por KRAS em células pulmonares é importante, não só para validação da AURKA como um alvo terapêutico para neoplasias induzidas por este oncogene, mas também para validação da inibição da AURKA como uma estratégia terapêutica que pode diminuir a resistência a quimioterápicos (visto que as CITs são quimiorresistentes), ao mesmo tempo que pode diminuir a chance de recidivas futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar como a quinase Aurora A afeta o fenótipo tronco-tumoral e metastático de células pulmonares transformadas por KRAS visando o desenvolvimento desta quinase como alvo terapêutico.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar como a inibição da atividade ou expressão da quinase Aurora A afeta o fenótipo tronco-tumoral de CITs pulmonares expressando KRAS oncogênica *in vitro*;
2. Avaliar marcadores de células tronco nas linhagens pulmonares A549 e H358 para purificação de células com fenótipo tronco tumoral (CITs);
3. Avaliar como a inibição da atividade ou expressão da quinase Aurora A afeta características malignas associadas ao fenótipo metastático de CITs pulmonares expressando KRAS oncogênica *in vitro*;
4. Avaliar os genes diferencialmente expressos relacionados ao fenótipo tronco-tumoral e metastático em células pulmonares expressando KRAS oncogênica com inibição da atividade de Aurora A.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

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

Utilizamos também a linhagem de adenocarcinoma pulmonar H1703 não portadora de mutações oncogênicas em *KRAS*, mas com expressão induzível de *KRAS* oncogênica (*KRAS*^{G12V}), já disponíveis no laboratório, em ensaios de expressão gênica e ensaios biológicos de crescimento. A expressão induzível de *KRAS* oncogênica foi obtida pelo sistema induzível de expressão *T-RExTM System* (Invitrogen), que contém dois vetores, um vetor regulatório pcDNA6/TR que expressa altos níveis do repressor TetR sob o controle do promotor CMV e o vetor pcDNATM/4/TO/myc-His, que contém *KRAS* oncogênica G12V (H1703 G12V) fusionada a um *tag* HA ou sem nenhum gene de interesse, possuindo vetor vazio como controle (H1703 TrexB). A expressão induzível é controlada pela adição de tetraciclina ou doxixiclina, inibindo o repressor TetR, que se desliga dos operadores, levando a indução da expressão.

Para o ensaio de formação de tubos endoteliais e migração, foram utilizadas células endoteliais isoladas da veia de cordão umbilical humano HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) (Cat#: C2519A, Lonza).

3.2 Condições de cultura, subcultura e preservação das linhagens celulares

As linhagens celulares A549 e H358 parentais foram cultivadas em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino sem antibióticos. As células H1703 TrexB e H1703 G12V foram mantidas em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino com antibióticos de seleção blasticidina 10 µg/mL e zeocina 3 µg/mL e induzidas com doxicilina 2 µg/mL 24 horas antes de iniciar os ensaios. As células HUVEC foram cultivadas em meio basal de crescimento endotelial EGM-2 (CC-3156, Lonza) suplementado com fatores de crescimento do BulletKit (CC-4176, Lonza).

As células utilizadas foram mantidas em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ a 37°C. A subcultura foi feita sempre que as células atingiram 80 a 90% de confluência, utilizando-se solução de tripsina 0.1% (w/v) diluída em PBSA, adicionada de EDTA 0.53mM, e as passagens celulares foram devidamente registradas. Os estoques celulares foram criopreservados no meio de cultivo contendo dimetilsulfóxido 10% à temperatura de -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.3 Ensaio de formação de tumoresferas

As células A549, H1703 TrexB e H1703 G12V na concentração de 1.000 células/poço, e as células H358 na concentração de 5.000 células/poço foram cultivadas em placas de cultura de baixa aderência de 6 poços com 2 mL de meio de cultura DMEM/F12 (ATCC 30-2006) suplementado com N2 (Invitrogen), 20 ng/ml de FGF (fator de crescimento de fibroblasto, PeproTech) e 20 ng/ml de EGF (fator de crescimento epitelial, PeproTech) por 14 dias em uma

atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ 37°C. A cada três dias as esferas foram suplementadas com 500 µL de meio de cultura descrito acima.

Avaliamos o efeito de inibição farmacológica da AURKA, conforme descrito no item 3.6. Alternativamente, as culturas de tumoresferas foram realizadas com inibição de AURKA ou KRAS por interferência de RNA, conforme descrito no item 3.7, apenas no momento do plaqueamento das esferas.

3.4 Inibição farmacológica de AURKA

Para avaliar o efeito da inibição de AURKA, o inibidor dual das quinases Aurora “*Aurora Kinase Inhibitor II*” (AI II, Cat# 189404 Calbiochem®) foi utilizado nas concentrações 2 e 5 µM. Utilizamos também o inibidor farmacológico seletivo para AURKA, o Alisertib (MLN8237) (MLN, Cat# S1133, SelleckChem), utilizado nas concentrações de 20 e 50 nM. Como controle para os dois inibidores, tratamos as células com 0,1% de DMSO (dos Santos 2016, tese de doutorado).

3.5 Identificação de marcadores de superfície por citometria de fluxo

Para citometria de fluxo foram utilizadas 1.10^5 células de cada linhagem cultivadas de forma aderente ou oriundas de tumoresferas dissociadas com Accutase (Sigma). As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio próprio para cada linhagem contendo 1% de albumina bovina por 30 minutos a 4°C para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos utilizados. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com os seguintes anticorpos primários monoclonais: APC mouse anti-human CD326 (EpCAM) (BioLegend), APC mouse

anti-human CD90 (Thy1) (BioLegend), APC mouse anti-human CD184 (CXCR4) (BioLegend), FITC mouse anti-human CD24 clone ML5 (BD Pharmingen), ou mouse anti-human CD44-PE clone G44-26 (C26) (BD Pharmingen). Após serem lavadas duas vezes com PBS, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% e analisadas em um citômetro de fluxo BD FACScalibur™ (Becton-Dickinson, EUA). Foram analisados um total de 10.000 eventos por amostra. O *gating* foi estabelecido com base na amostra parental sem o anticorpo utilizado, de forma que 100% dessas células estejam fora do *gate* de marcação. Os dados coletados foram analisados pelo programa FlowJo.

3.6 Purificação de células por citometria de fluxo

As células H358 parentais foram tripsinizadas, lavadas com PBS e incubadas com meio próprio para cada linhagem contendo 1% de albumina bovina por 30 minutos a 4°C para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo CXCR4 descrito no item 3.5. Após serem lavadas duas vezes com PBS, as amostras foram levadas em meio próprio para cada linhagem suplementado com 2% de soro fetal bovino ao *FACSAria III Cell Sorter* (CEFAP – ICB) para separação celular. Após a separação, as células foram plaqueadas separadamente em cultura positiva e negativa para o marcador escolhido, e utilizadas para os experimentos funcionais posteriores.

3.7 Geração de linhagens SORE6

As linhagens A549 e H358 foram plaqueadas em placa de 6 poços, 5×10^4 células/poço, e transduzidas com 8 ug/ml de polibreno conjuntamente aos lentivírus ($MOI < 1$) contendo a

construção para expressão da proteína GFP desestabilizada sob controle do promotor CMV mínimo acrescido do elemento responsivo a SOX2/Oct4 repetido 6 vezes (SORE6), cedido pela Dra. Lalage M. Wakefield (Tang et al. 2015). Após 24h da transdução, as células A549 e H358 foram selecionadas com puromicina 2 µg/ml e 0,35 µg/ml, respectivamente, por 5 dias. Posteriormente, essas células foram submetidas a citometria de fluxo convencional (FACS Canto II, BD). Células controle, transduzidas com a construção sem o SORE6 (mCMV-GFP) foram utilizadas para definição de parâmetros em ambos citômetros de fluxo. As fotos representativas das células SORE6-GFP foram tiradas no microscópio de fluorescência EVOS FLoid (ThermoFisher).

3.8 Transfecção com siRNAs

A inibição transiente de KRAS ou AURKA nas linhagens pulmonares foi realizada utilizando-se um *pool* (Dharmacon *siGenome Smart Pool siRNA Design*[®]) contendo 5 *small interfering RNAs* (siRNAs) para a KRAS humana (siKRAS, cat# M-005069-00 Dharmacon) ou para a AURKA humana (siAURKA, Cat# M-003545-10 Dharmacon). Como controle negativo, as células foram transfectadas com siRNA controle *non-targeting* #3 (siCtrl, Cat# D-001210-03-20 Dharmacon), que não possui homologia a genes humanos conhecidos. Para tanto, as células foram plaqueadas (1.10^5 células/poço) em placas de 6 poços em meios de cultura descritos no item 3.2. Após 24h, foram preparados os *mixes* de siRNA e reagente de transfecção. 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). Em seguida, 150 µL de meio próprio para cada linhagem sem soro feral bovino ou soro de cavalo foi adicionado ao tubo 1. No tubo 2, 4 µL do reagente de transfecção DharmaFECT[®] (Cat# T-2001-02 GE Dharmacon) foi diluído em 196 µL de meio próprio para cada linhagem 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 adicionados 1,6 mL de meio próprio para cada linhagem em cada poço. Por fim, 400 μ L do *mix* de siRNA + DharmaFECT foi adicionado a cada poço contendo as células e as mesmas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂. Para enriquecimento de células iniciadoras tumorais por cultura de tumoresferas, as células foram utilizadas 24h-48h após a transfecção. Para avaliar a eficiência de inibição de AURKA ou KRAS e a expressão dos genes de interesse, o RNA e proteína foram extraídos 72h após a transfecção.

3.9 Extração e quantificação de RNA

Para extração de RNA, células em cultura aderente foram tripsinizadas ou tumoresferas dissociadas e, em seguida, centrifugadas a 900 rpm por 7 minutos em tubos falcon de 50 mL. O meio de cultura foi descartado e os pellets de células ressuspensos em 250 μ L do reagente TRIZOL (Invitrogen®). Após homogeneização, a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL e então foram adicionados 100 μ L de clorofórmio em cada tubo, agitando-os vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 14 minutos a 4°C. A fase transparente, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo e em seguida adicionado 250 μ L de isopropanol a cada tubo, agitando-os vigorosamente por 10 segundos. Os tubos foram mantidos a 4°C overnight e em seguida centrifugados novamente a 14.000 rpm por 14 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 100 μ L de etanol 100%. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 14 minutos e o sobrenadante descartado. O tubo contendo somente o precipitado de RNA foi mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. O RNA foi diluído em água autoclavada (Millipore, *MilliQ System*) e mantido em banho seco a 65°C por 5 minutos. Em seguida,

mantendo os tubos com o RNA diluído em gelo, a concentração dos RNAs foi determinada por meio de sua absorvância a 260 nm no espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).

3.10 Síntese de cDNA

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

Para síntese do cDNA, 1 µg de RNA total tratado com DNase foi submetido à transcrição reversa com SuperScriptIII (*Invitrogen*[®]). Para 1 µg de RNA tratado com DNase 1, foram adicionados 1 µL de iniciadores randômicos (*random hexamers* 50 ng/µL) e 1 µL de *Anneling Buffer* (*Invitrogen*[®]), 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 2x *First-Strand Reaction Mix* (*Invitrogen*[®]) e 2 µL de SuperScript[®]III (*Invitrogen*[®]). As amostras foram agitadas delicadamente e, em seguida, incubadas no termociclador Mastercycler gradient AG22331 (*Eppendorf*[®]) a 25°C por 10 minutos, seguido de incubação a 50°C por 50 minutos e finalmente a 85°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso.

3.11 PCR em Tempo Real

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®), com *primers* específicos para mRNAs de interesse 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. A determinação da concentração e eficiência dos primers foram realizadas previamente (Scalabrini, LC. Dissertação de Mestrado, 2016). Para a reação de PCR em tempo real foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços 3 μ L do cDNA, 3 μ L do *mix* de *primers* (*forward e reverse*) na concentração previamente determinada para os genes de interesse e 6 μ L de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®), de forma que os mesmos respeitem pré-requisitos otimizados para qRT-PCR conforme aconselhado pelo fabricante. A quantificação relativa dos genes alvos nas amostras foi determinada pelo método $\Delta\Delta C_t$ utilizando como controle endógeno genes humanos de expressão constitutiva GAPDH ou β -actina.

3.12 Western Blotting

Para extração de proteína a partir de cultura celular, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS não contendo íons Mg^{2+} ou Ca^{2+} , centrifugadas e o “pellet” celular ressuspenso em 2 volumes de tampão RIPA suplementado com inibidores de proteases. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford. Aliquotas de 25 μ g de proteína foram submetidas a fracionamento vertical em gel de poliacrilamida – SDS 8% (SDS-PAGE).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada “overnight” em solução de 5% de leite em PBSA Tween 0,1%. A membrana foi incubada em solução de anticorpo primário anti-panRas (OP-40, Merck Millipore), anti-HA-tag (#H3663, Sigma-Aldrich), anti-AURKA/AIK (#4718, Cell Signaling), anti-Nanog D73G4 (#4903S, Cell Signaling), anti-SOX2 L1D6A2 (#4900S, Cell Signaling), p-Src (Tyr416) (#2101, Cell Signaling), Src (Tyr416) (#2102, Cell Signaling) anti- α Tubulina (cs-3873, Cell Signaling®) ou anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz). Após a lavagem em PBSA Tween 0,1%, a membrana foi incubada em solução de anticorpo secundário Anti-Mouse IgG (H+L) HPR Conjugate (#W4021, Promega) ou Anti-Rabbit IgG (H+L) HPR Conjugate (#W4011, Promega). A revelação foi realizada no aparelho “ChemiDoc” (Li-Cor®) por quimoluminescência com o substrato ELC (Cat# 32209, Thermo Scientific). A quantificação das bandas proteicas foi realizada por densitometria utilizando o software ImageJ.

3.13 Ensaio de invasão e migração celular *transwell*

Para a realização do ensaio de invasão e migração foram utilizadas câmaras bipartidas. Essas câmaras são compostas por dois compartimentos distintos, separados entre si por um filtro de policarbonato (“Individual Millicell cell culture inserts” – Millipore Corporate Headquarters), com poros de 8 μ m de diâmetro. Esse sistema cria dois ambientes diferentes que permite a passagem voluntária das células de um lado para o outro do filtro, já que o diâmetro dos poros é menor que o diâmetro das células.

Para os ensaios de migração e invasão celular, 5×10^4 células foram ressuspensas em meio de cultura próprio para cada linhagem (sem soro fetal bovino) e foram adicionadas em triplicata a cada poço de insertos “*Transwell*” (poro de 8 μ M, Millipore) revestidos (ensaio de

invasão) ou não (ensaio de migração) com uma matriz de proteínas de membrana basal reconstituídas (Matrigel, BD Biosciences). O meio de cultura próprio para cada linhagem completo foi então adicionado a uma placa de cultura de 24 poços para servir como quimioatrativo. Após 24h ou 48h, as células foram coradas com Cristal Violeta 0.2%, seguida da remoção das células na camada superior da membrana dos insertos “*Transwell*” com um cotonete. Os insertos foram fotografados nas mesmas regiões em cada poço e a área de células que migraram para o outro lado da membrana foi quantificada pelo software ImageJ.

Para o ensaio de migração com as células HUVEC, seguimos o procedimento descrito acima, onde as células HUVEC foram ressuspensas em meio condicionado obtido de células A549 u H358 com tratamento de interesse (ver item 3.14). Para o ensaio de resgate, adicionamos IL-8 (5 ng/ml) e VEGF (5 ng/ml) ao meio condicionado.

3.14 Ensaio de formação de tubos endoteliais

Para avaliar a formação de vasos, primeiramente realizamos a transfecção das células A549 e H358 com siRNA controle e siRNA para AURKA em placas de 6 poços. Após 72 horas, o meio utilizado na transfecção foi retirado e 0,5 mL de meio RPMI sem soro foi adicionado. O meio RPMI sem soro condicionado foi coletado para uso nos ensaios de angiogênese e migração após 24 h. Para os ensaios de formação de tubos as células HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Pooled, in EGM-2, LONZA®) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo uma cama de Matrigel (Corning®) com o meio condicionado das células A549 ou H358. Os poços foram observados e fotografados após 6 horas após o plaqueamento. Para cada poço foram tiradas 5 fotos das mesmas regiões e os tubos formados pelas células HUVEC foram contados por imagem.

3.15 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados na forma de média e desvio padrão ou através de imagens representativas de 3 experimentos independentes. A normalidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. Para comparação de 2 grupos, a significância foi determinada pelo teste *student-t*. Para comparação de 3 grupos ou mais foi utilizado o teste *one-way* ANOVA, sendo consideradas significativas diferenças com valor $p \leq 0.05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7.

4 RESULTADOS

4.1 A expressão de KRAS^{G12V} em células tumorais pulmonares promove a expressão de AURKA e marcadores de *stemness*.

Considerando que diferentes estudos mostram que a KRAS oncogênica pode promover o fenótipo tronco tumoral (Hwang et al. 2020; Jo et al. 2020; Liu et al. 2021) e, considerando que os nossos próprios estudos mostram que a KRAS oncogênica promove a expressão de AURKA (dos Santos et al. 2016; Gomes-Filho et al. 2020), nós inicialmente resolvemos validar que a expressão de KRAS oncogênica em células pulmonares resulta em um aumento de expressão, tanto da AURKA como esperado, quanto de fatores conhecidos de *stemness*. Para isso, utilizamos células de adenocarcinoma pulmonar H1703 sem mutação endógena em KRAS engenheiradas para expressão induzível por doxiciclina de KRAS^{G12V} (células H1703-G12V). Como controle, utilizamos as células H1703 portadoras do vetor vazio e, portanto, sem capacidade de expressar KRAS^{G12V} na presença de doxiciclina (células H1703-TrexB).

Primeiramente, investigamos a expressão de KRAS e AURKA nessas células. Nós observamos que na presença de doxiciclina, quando comparada à linhagem H1703-TrexB, a linhagem H1703-G12V apresenta maior expressão tanto de KRAS quanto de AURKA. É importante ressaltar que os *primers* utilizados no experimento de qPCR não são específicos para a forma mutada, de tal forma que a KRAS endógena presente em ambas as linhagens também é detectada neste ensaio. Por outro lado, a expressão protéica de KRAS^{G12V} pode ser identificada especificamente através do *tag* HA, que faz parte da construção utilizada para gerar a linhagem modificada. No entanto, as duas análises mostram maior expressão gênica e proteica de KRAS e AURKA na linhagem com expressão induzível de KRAS^{G12V}, indicando que o

sistema de fato leva ao aumento da expressão de KRAS oncogênica e, conforme esperado, a maior expressão de KRAS leva a um aumento de expressão de AURKA (**Figura 8**).

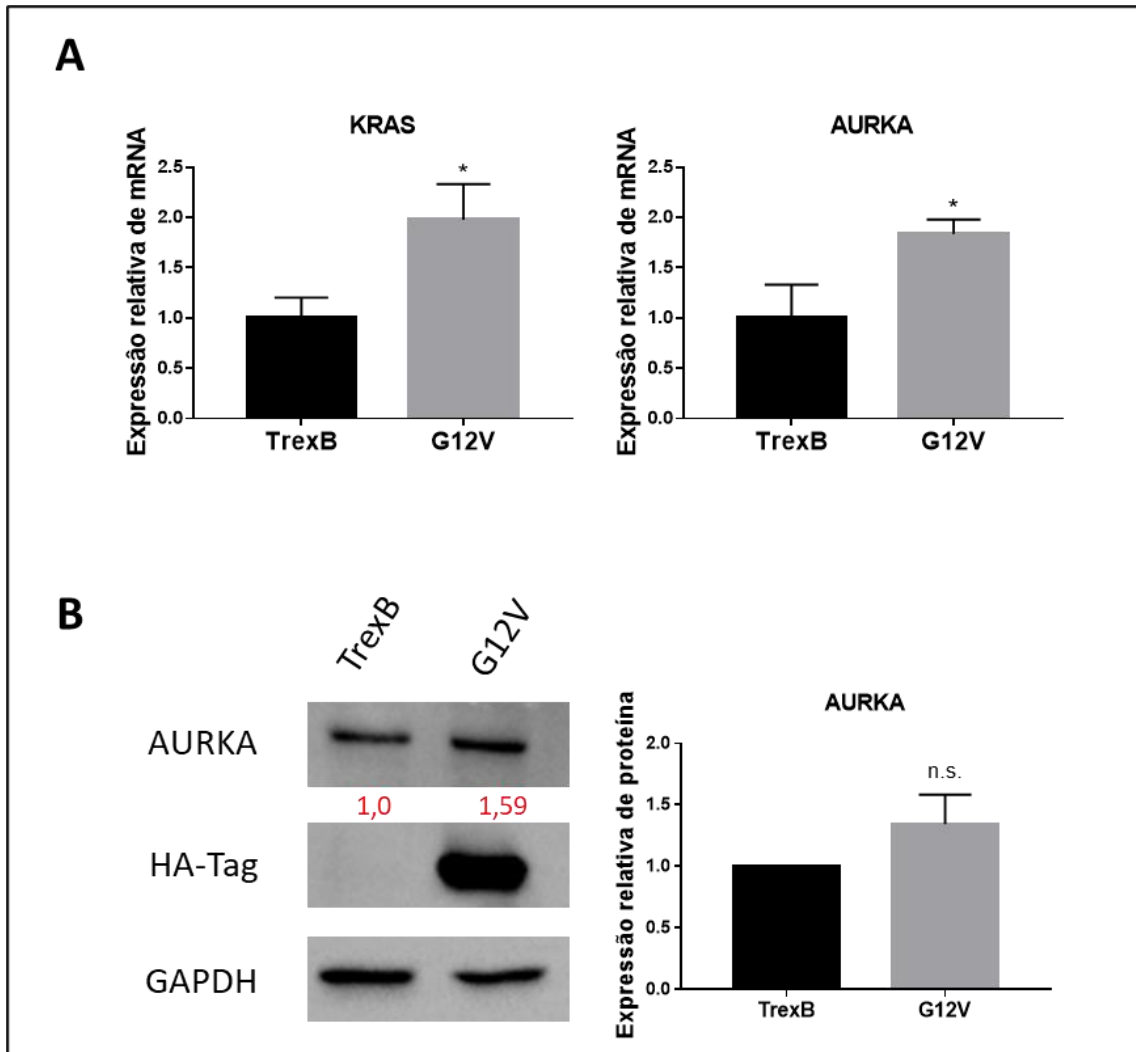


Figura 8 – Células pulmonares H1703-G12V apresentam aumento de expressão de AURKA e KRAS mutado. Células H1703-TrexB (TrexB) e H1703-G12V (G12V) foram tratadas com doxiciclina 2 µg/mL por 24 horas. (A) A expressão de KRAS (painel esquerdo), AURKA (painel direito) foi analisada através de RT-qPCR em cada linhagem indicada. Gapdh foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (* $p < 0.05$) comparando os grupos TrexB e G12V. (B) Os extratos proteicos foram coletados e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados, representado à esquerda. O anticorpo anti-HA (HA-Tag) foi utilizado para detecção de KRAS^{G12V}. As bandas proteicas correspondentes à AURKA foram quantificadas em relação ao controle endógeno (GAPDH) e normalizadas pela amostra de referência (TrexB). À direita, gráfico de 3 experimentos independentes para quantificação de AURKA. As imagens mostradas são representativas de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (n.s. - não significativo) comparando os grupos TrexB e G12V.

Em seguida avaliamos a expressão de genes de *stemness* nessas células e observamos que na presença de doxicilina, quando comparada à linhagem H1703-TrexB, a linhagem H1703-G12V apresenta maior expressão dos genes relacionados a *stemness* ALDH, BMI, Nanog e Oct4 (Figura 9).

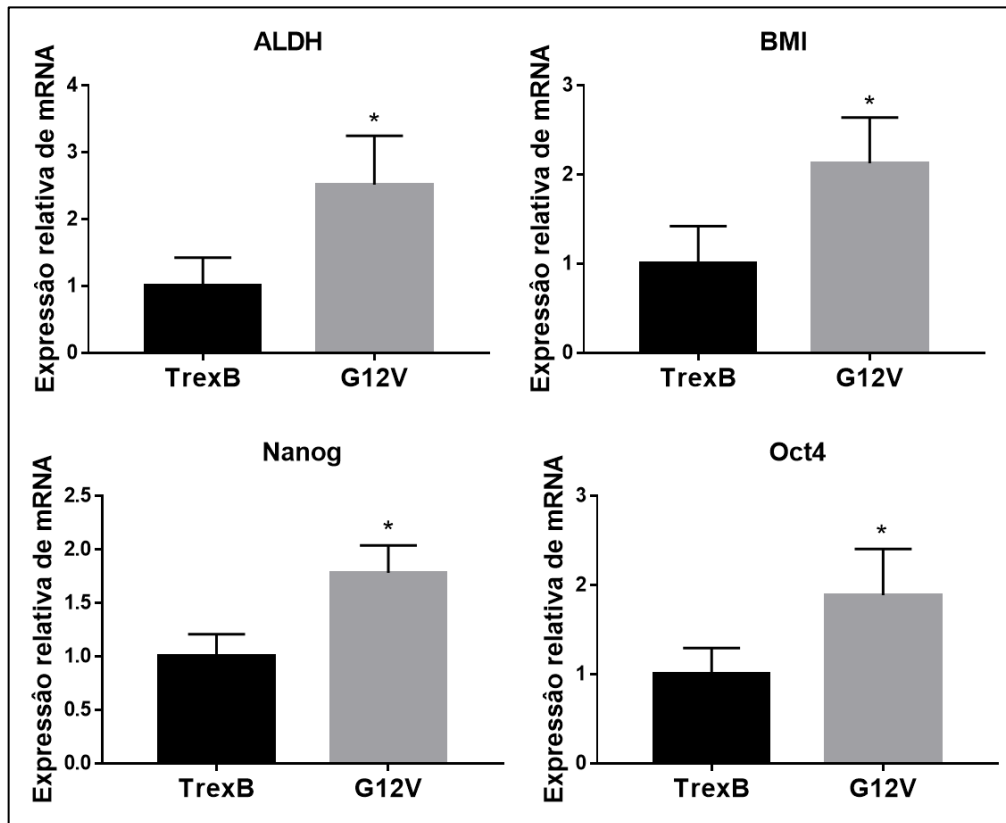


Figura 9 – A expressão induzida de $KRAS^{G12V}$ em células pulmonares leva ao aumento da expressão dos genes de *stemness*. Células H1703-TrexB (TrexB) e H1703-G12V (G12V) foram tratadas com doxicilina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas e a expressão de ALDH (painel superior esquerdo), BMI (painel superior direito), Nanog (painel inferior esquerdo) e Oct4 (painel inferior direito) foi analisada através de RT-qPCR em cada linhagem indicada. Gapdh foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (* $p < 0.05$) comparando os grupos TrexB e G12V.

4.2 A inibição de AURKA reduz a formação de tumoresferas em células tumorais pulmonares de maneira dependente do status de KRAS

Para avaliar se a inibição farmacológica de AURKA afeta preferencialmente o fenótipo tronco tumoral das células com KRAS mutado, nós utilizamos cultura de tumoresferas com as linhagens H1703-TrexB e H1703-G12V. Primeiramente, como controle, utilizamos a linhagem H1703-TrexB para avaliar se a doxiciclina poderia por si só afetar a capacidade de formação de tumoresferas na ausência de indução de KRAS^{G12V}. Não observamos nenhuma diferença na formação de tumoresferas na presença de diferentes concentrações de doxicilina, indicando que, nas concentrações testadas, este antibiótico não interfere neste ensaio (**Figura 10**).

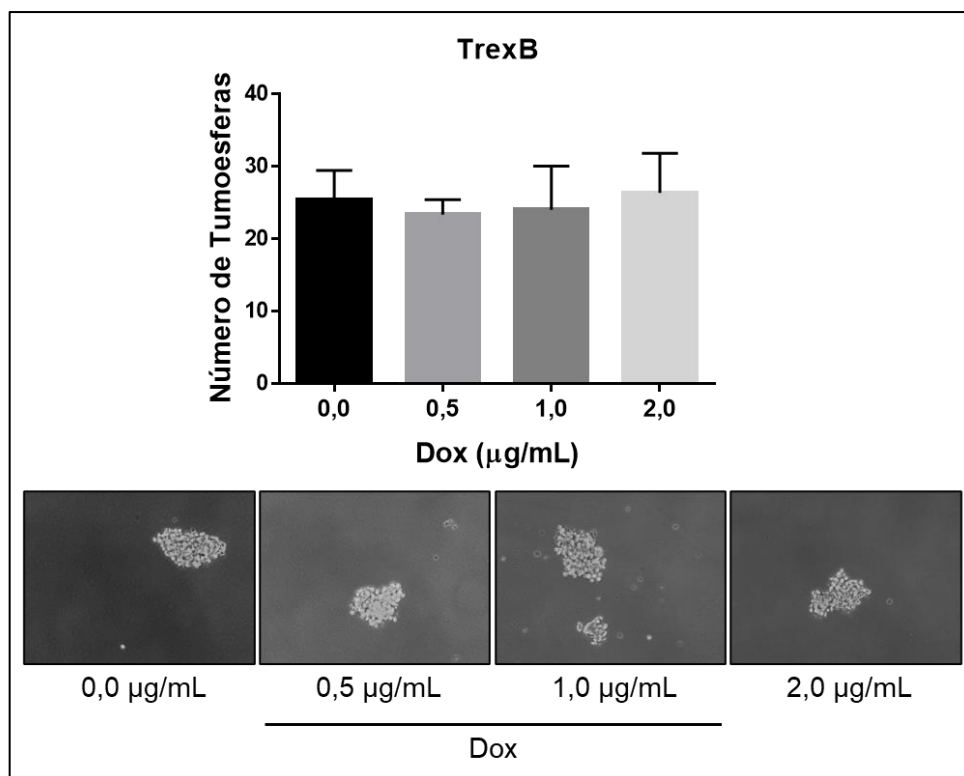


Figura 10 – A doxiciclina não interfere na formação de tumoresferas das células pulmonares H1703 TrexB. As células H1703 TrexB foram tratadas com doxiciclina (Dox) nas concentrações indicadas por 24 horas e então 1×10^3 células foram plaqueadas para formação de tumoresferas por 7 dias. A cada 48 a 72 horas, as culturas de tumoresferas foram suplementadas com doxiciclina nas concentrações indicadas. (**Painel superior**) Quantificação do número de tumoresferas formadas. (**Painel inferior**) Imagens representativas de um experimento ($n = 1$) com 3 replicatas técnicas.

Como não foi observado um efeito da doxíciclina na formação de tumoresferas da linhagem H1703-TrexB, avaliamos como a inibição farmacológica de AURKA afeta a capacidade das células H1703-G12V e H1703-TrexB de formar tumoresferas na presença de doxíciclina. Embora a linhagem H1703-G12V tenha apresentado um número médio de tumoresferas maior que a linhagem H1703-TrexB na ausência de inibição da AURKA, este aumento não foi estatisticamente significativo. Interessantemente, observamos que a linhagem H1703-G12V forma tumoresferas maiores, o que é condizente com um efeito proliferativo causado pela presença de KRAS^{G12V}. Finalmente, ao inibirmos a AURKA farmacologicamente, observamos uma redução tanto do número quanto do tamanho das tumoresferas formadas para ambas as células, mas a redução no número de esferas formadas só foi significativa na linhagem H1703-G12V (**Figura 11**), indicando que a inibição de AURKA inibe preferencialmente a formação de tumoresferas da linhagem que expressa KRAS^{G12V}. Além de diminuir o fenótipo tronco tumoral (Scalabrini 2016), a inibição de AURKA também diminui a proliferação celular, o que pode ter refletido na diminuição do tamanho das tumoresferas.

Esses resultados indicam que a inibição farmacológica de AURKA tem maior efeito em células com KRAS oncogênica. Observa-se uma redução na formação de tumoresferas mais acentuada na linhagem H1703-G12V, indicando que a via KRAS-AURKA possivelmente está envolvida com a aquisição do fenótipo tronco tumoral dessas células.

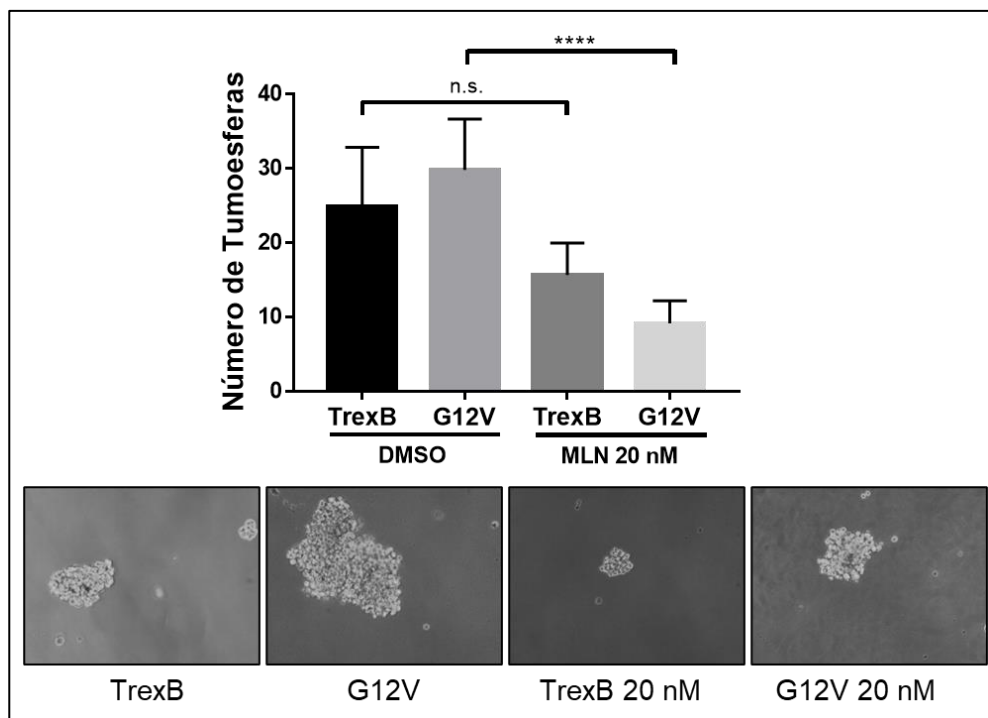


Figura 11 – A inibição farmacológica de AURKA reduz preferencialmente a formação de tumoresferas de células pulmonares com KRAS oncogênica. As células H1703 TrexB e H1703 G12V foram tratadas com doxiciclina 2 µg/mL por 24 horas e então 1×10^3 células foram plaqueadas com o inibidor seletivo de AURKA MLN 20 nM ou o controle DMSO (veículo) para formação de tumoresferas por 7 dias. A cada 48 a 72 horas, as culturas de tumoresferas foram suplementadas com doxiciclina nas concentrações indicadas. **(Painel superior)** Quantificação do número de tumoresferas formadas. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *one-way* ANOVA comparando os 4 grupos, onde **** $p < 0,0001$, n.s. – não significativo. **(Painel inferior)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Como a via KRAS-AURKA promove o fenótipo tronco na linhagem H1703 com expressão induzível de KRAS^{G12V}, nós resolvemos investigar se a inibição de AURKA também afetaria o fenótipo tronco de linhagens portadoras de mutação oncogênica em KRAS. Para isso, utilizamos as linhagens células A549 e H358, ambas portadoras de KRAS mutado. Parte desta análise foi realizada no projeto de mestrado, onde demonstramos que a inibição farmacológica de AURKA e AURKB com o inibidor dual AI II ou a inibição por interferência de RNA de AURKA nestas células reduz a capacidade de formação de tumoresferas (Scalabrini 2016).

Como o inibidor dual AI II tem uma seletividade maior para AURKB ($IC_{50} = 310$ nM para AURKA e $IC_{50} = 240$ nM para AURKB, Calbiochem®), nós investigamos se a inibição

farmacológica com o inibidor altamente seletivo para AURKA Alisertib (MLN, $IC_{50} = 1,2$ nM, SelleckChem®), também reduziria a capacidade de formação de tumoresferas. Para isso, realizamos um ensaio de formação de tumoresferas com passagens seriadas para avaliar, *in vitro*, se a inibição de AURKA reduziria a capacidade de autorrenovação dessas células.

As células foram tratadas com MLN 20 e 50 nM uma única vez para plaqueamento das tumoresferas primárias e cultivadas como tumoresferas por 3 passagens. A inibição da atividade de AURKA foi confirmada após 24 h de tratamento através da redução na fosforilação de SRC no resíduo T416, que é substrato da AURKA (Do et al. 2014) (**Figura 12**). Neste ponto nós observamos inibição da fosforilação de SRC apenas na concentração de 50 nM de MLN, indicando uma inibição efetiva da atividade de AURKA. O fato de não termos observado uma redução da fosforilação de SRC com MLN na concentração de 20 nM pode se dever à cinética de inibição, sendo que nesta concentração é possível que a inibição ocorra em tempos mais curtos, sendo que em 24h mecanismos de retroalimentação podem ser suficientes para restaurar a fosforilação de SRC. É comum que a inibição da fosforilação de substratos por inibidores de quinases ocorra de forma temporária, com diferentes cinéticas dependendo da dose utilizada. No entanto, sabemos que o MLN é capaz de causar inibição da atividade de AURKA na concentração de 20 nM, demonstrado pelo nosso grupo (dos Santos 2016, tese de doutorado).

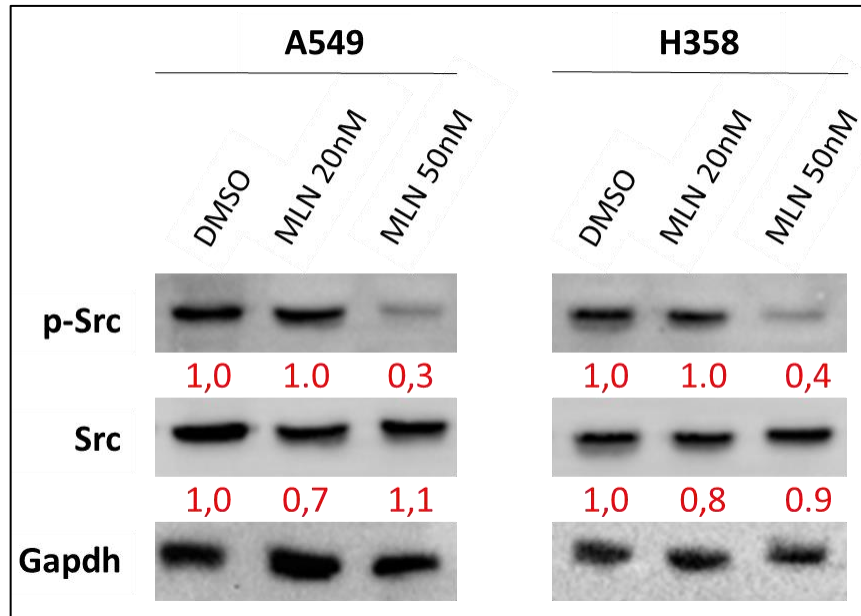


Figura 12 - A inibição da atividade de AURKA em células A549 e H358 mediada por Alisertib (MLN). Células A549 e H358 foram tratadas com a condição controle DMSO (veículo), e com o inibidor farmacológico seletivo MLN 20 e 50 nM por 24 horas e a expressão proteica de p-Src e Src foi avaliada por Western Blotting com os anticorpos indicados. As bandas proteicas correspondentes à p-Src foram quantificadas em relação a Src total, e a Src total foi quantificada em relação ao endógeno Gapdh, ambas normalizadas pela amostra de referência (DMSO).

Com ambas as linhagens observamos, que na ausência de inibição de AURKA, houve formação de um número semelhante de tumoresferas na primeira e segunda passagens, com redução na terceira passagem (**Figura 12**). Entretanto esta redução foi mais significativa para a linhagem A549, o que pode refletir uma menor quantidade de CITs com capacidade de autorrenovação nesta linhagem. Interessantemente, na linhagem A549, observamos também que o tamanho das tumoresferas foi se tornando menor com cada passagem, mesmo na ausência de inibidor, sendo que na passagem terciária observamos poucas e pequenas tumoresferas, e uma grande quantidade de pequenos grumos de células que não foram consideradas como tumoresferas (**Figura 13A**), o que pode indicar uma perda gradativa do poder de autorrenovação das CITs neste ensaio nesta linhagem. Na linhagem H358, por outro lado, embora tenhamos também observado uma redução no número de tumoresferas formadas na terceira passagem na ausência de inibidor, não houve redução no tamanho das tumoresferas nas

3 passagens, o que pode indicar que esta linhagem possui maior quantidade de CITs com capacidade de autorrenovação.

Mais importante, estas linhagens apresentaram redução na formação de tumoresferas na presença de inibição da AURKA com Alisertib (MLN), embora com cinética diferente. Na linhagem A549, observamos uma redução significativa na formação de tumoresferas em todas as passagens, enquanto na linhagem H358, uma redução significativa na formação de tumoresferas só foi observada a partir da segunda passagem (**Figura 13B**).

Entretanto, como uma redução significativa no número de tumoresferas formadas foi observado nas passagens secundária e terciária em ambas as linhagens tratadas com Alisertib, e como o tratamento com Alisertib foi realizado apenas na primeira passagem, esses resultados sugerem que a inibição farmacológica seletiva de AURKA leva à perda do potencial de autorrenovação *in vitro*, indicando que AURKA possui um importante papel no desenvolvimento de tumoresferas e aquisição do fenótipo tronco tumoral.

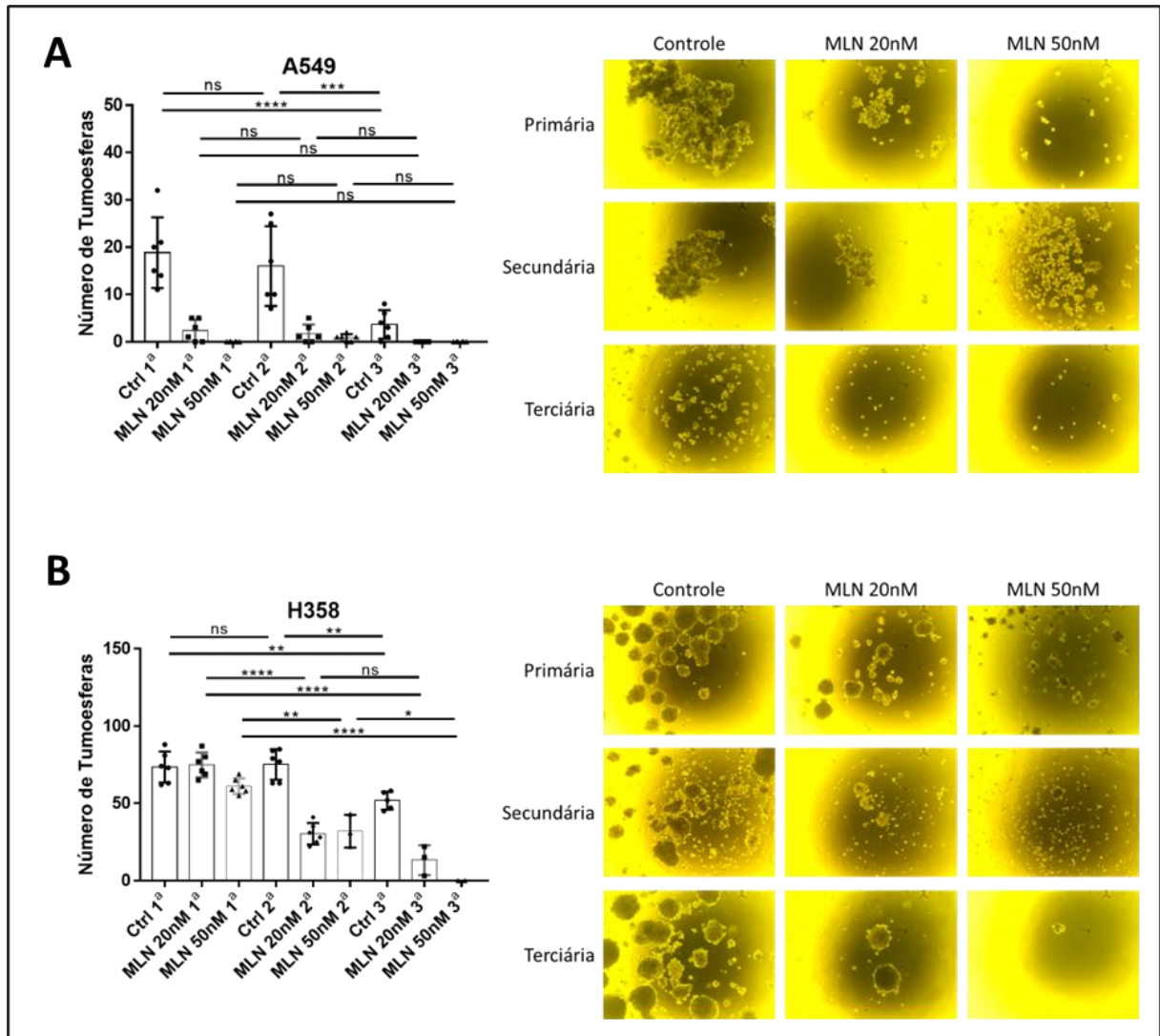


Figura 13 – A inibição de AURKA leva à perda da capacidade de autorrenovação *in vitro* das células tumorais pulmonares A549 e H358. As células A549 (A) e H358 (B) foram tratadas uma única vez com Alisertib (MLN) nas concentrações indicadas ou com DMSO 0,1% (Controle ou Ctrl) e então 1×10^3 células A549 e 5×10^3 células H358 foram plaqueadas para formação de tumoresferas primárias. Os mesmos números de células de cada linhagem foram utilizados no plaqueamento das culturas secundárias e terciárias. Ao final de cada passagem, as esferas foram contadas e fotografadas. (Esquerda) Quantificação do número de tumoresferas formadas. Os gráficos de Scatter Plot com distribuição dos números de tumoresferas com barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *one-way* ANOVA comparando os grupos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – não significativo. (Direita) Imagens representativas de três experimentos independentes.

4.3 Identificação de estratégias para purificação de células iniciadoras de tumor

Utilizando o ensaio de formação de tumoresferas como modelo de enriquecimento de CITs, mostramos que as linhagens de adenocarcinoma pulmonar com mutação em KRAS apresentam um enriquecimento do fenótipo tronco tumoral, e que a inibição de AURKA reduz, não só a capacidade destas linhagens de formarem tumoresferas, bem como reduz a capacidade de autorrenovação das tumoresferas formadas. Estes resultados se somam a resultados obtidos no mestrado, onde mostramos que a inibição de AURKA reduz a expressão de marcadores de célula tronco e a clonogenicidade das células oriundas de tumoresferas (Scalabrini 2016).

Para obter um maior nível de enriquecimento de células tronco do que o obtido com a cultura de tumoresferas e para podermos purificar as CITs, resolvemos investigar marcadores de superfície que já haviam sido descritos em CITs pulmonares. Primeiramente, investigamos o CD44 como possível marcador combinado ao CD24 (Zhang et al. 2019) para obtenção de uma população com fenótipo tronco tumoral, em vista do aumento da expressão de CD24 e de CD44 nas tumoresferas das linhagens A549 e H358 (**Figura 14**).

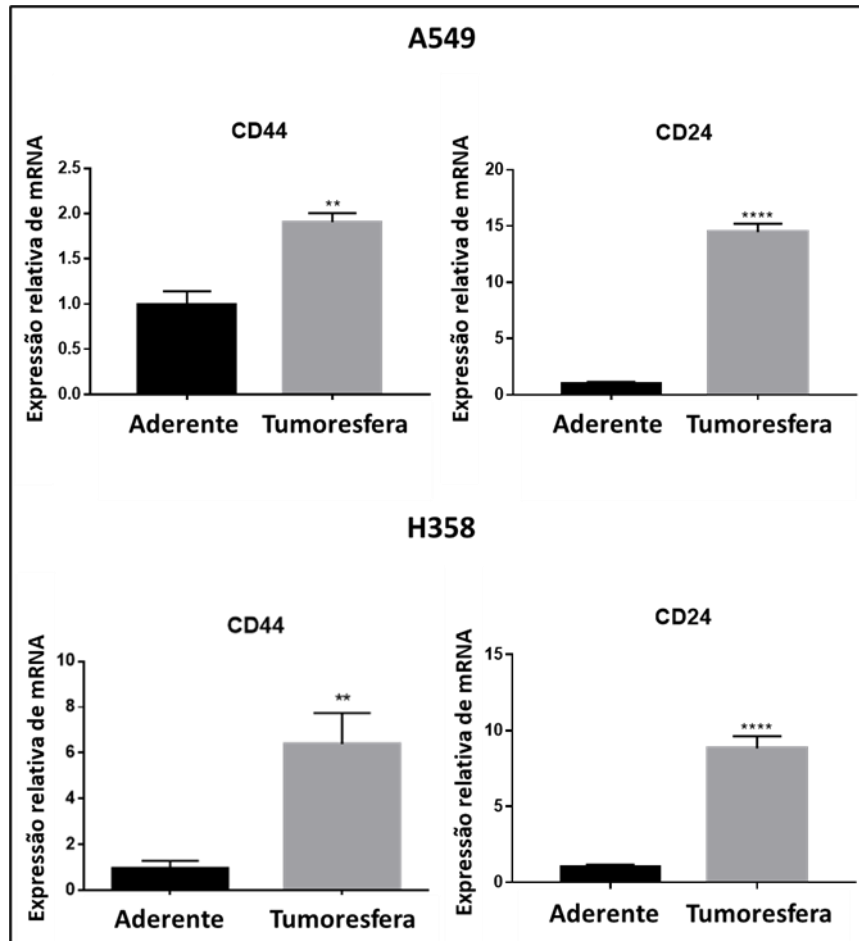


Figura 14 – As tumoresferas apresentam maior expressão dos marcadores de superfície CD24 e CD44. As linhagens A549 (Esquerda) e H358 (Direita) foram cultivadas na forma aderente ou na forma de tumoresferas e a expressão de CD44 e CD24 foi analisada através de RT-qPCR conforme indicado. Gapdh foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$) comparando os grupos Aderente e Tumoresfera.

Em seguida, avaliamos a marcação do CD24 e CD44 isoladamente em ambas as linhagens aderentes, por citometria de fluxo, mostrando que ambos os marcadores são altamente expressos na superfície de ambas as linhagens. Observamos uma expressão de 73,1% e 93,6% do CD24, e de 96,4% e 80,1% do CD44 na A549 e H358, respectivamente (**Figura 15**).

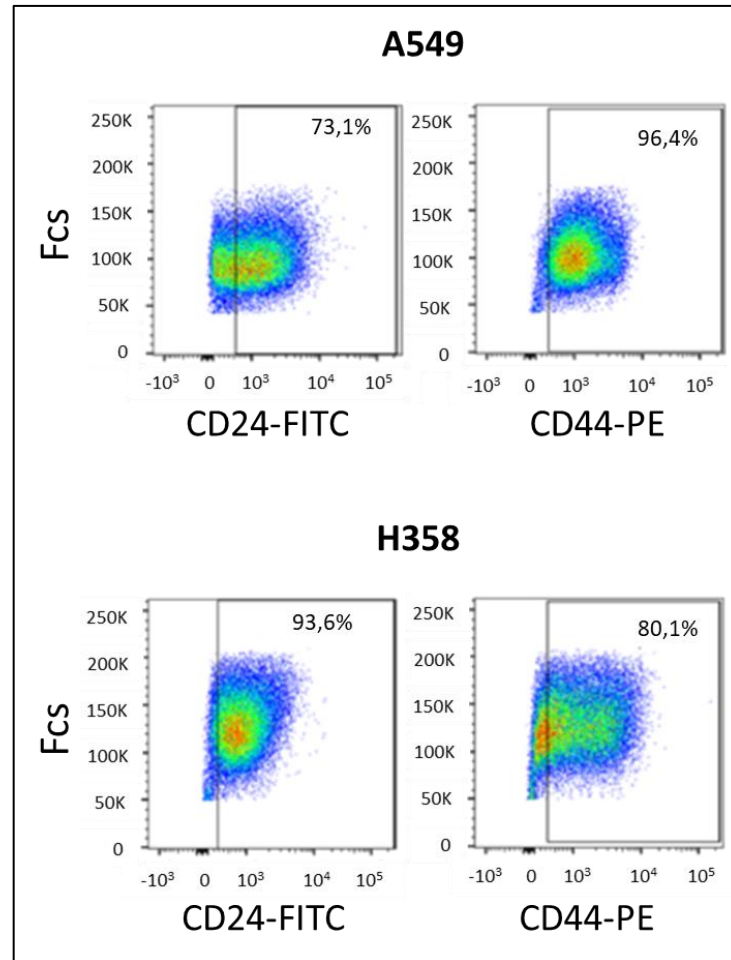


Figura 15 – As linhagens A549 e H358 apresentam alta marcação de superfície para os marcadores de *stemness* CD24 e CD44. Ensaio representativo de citometria de fluxo dos marcadores de células tronco tumorais CD24 (CD24-FITC) e CD44 (CD44-PE) nas células A549 (acima) e H358 (abaixo) oriundas de cultura aderente. O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para FITC (CD24-FITC) ou PE (CD44-PE) no eixo horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (área retangular) foi determinado arbitrariamente usando células A549 e H358 não marcadas como referências negativas para cada linhagem. A porcentagem de células positivas para cada marcador de superfície está indicada.

Em seguida, resolvemos investigar se a dupla marcação CD44⁺/CD24⁺ apresentaria uma expressão diferenciada nas tumoresferas, considerando que ambas as linhagens apresentam aumento da expressão de ambos os marcadores nas tumoresferas. Realizamos então uma citometria de fluxo com a marcação dupla CD44/CD24, primeiramente nas células H358, comparando a expressão desses marcadores em células aderentes e células oriundas de

tumoresferas, com seus respectivos controles, os quais consistiam em células aderentes ou oriundas de tumoresferas sem marcação (**Figura 16**).

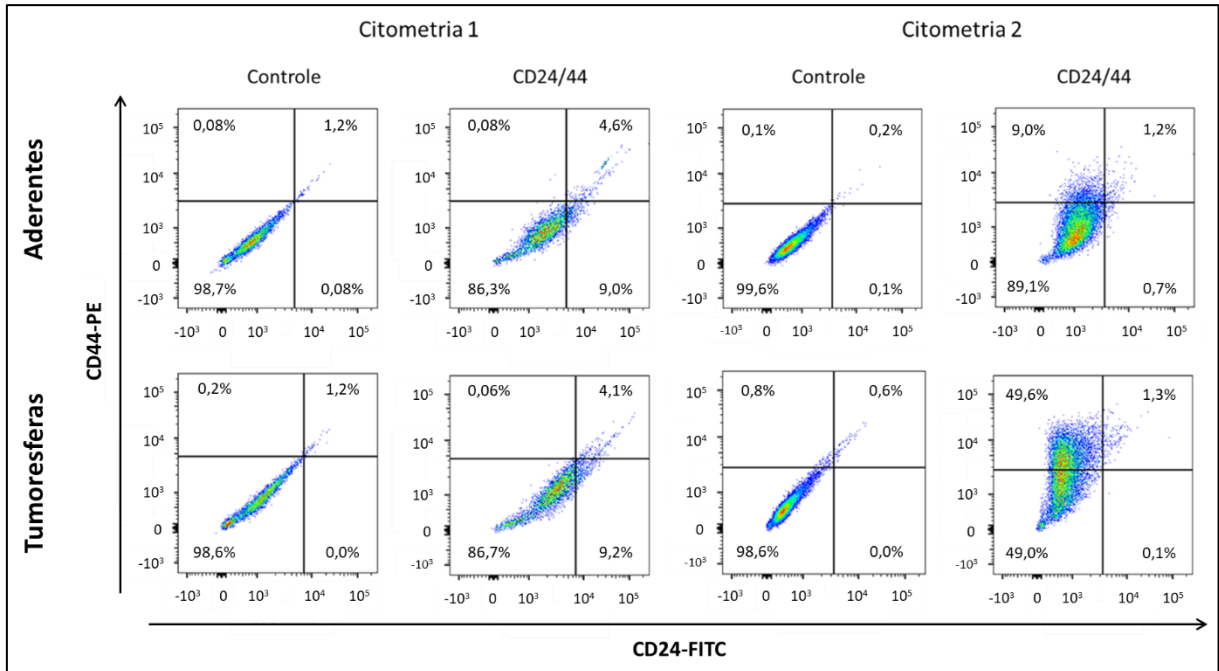


Figura 16 – Tumoresferas oriundas da linhagem H358 não apresentam enriquecimento de células com dupla marcação para CD24/44. Análise por citometria de fluxo dos marcadores de superfície CD24 (CD24-FITC) e CD44 (CD44-PE) nas células H358 oriundas de cultura aderente ou de tumoresferas conforme indicado. Foram realizadas duas citometrias para comparação da marcação CD44/CD24 nas células aderentes e nas tumoresferas. O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para FITC (CD24-FITC) no eixo horizontal e PE (CD44-PE) no eixo vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (quadrantes superiores e inferior direito) foi determinado arbitrariamente usando células H358 aderentes ou tumoresferas não marcadas, como referência negativa. A porcentagem de células positivas para cada marcador está indicada em seus respectivos quadrantes.

No entanto, além de não observarmos uma alta marcação para CD44 e CD24 nas células aderentes como havíamos observado na citometria simples (**Figura 15**), nós observamos que não houve um enriquecimento desses marcadores nas tumoresferas para uma das citometrias e para a outra observamos um enriquecimento apenas da população CD44+.

Devido à inconsistência da expressão desses marcadores considerando diferentes experimentos, nós resolvemos investigar outros marcadores de CITs já descritos na literatura

para câncer de pulmão, como CD90, CD326 e CXCR4 (Nian et al. 2011; Yan et al. 2013; Zhu et al. 2016).

Realizamos então citometria com anticorpos para todos esses marcadores individualmente para verificar a presença e a abundância de cada um na população celular. Desta forma, determinamos os marcadores mais promissores em cada linhagem (**Figura 17**).

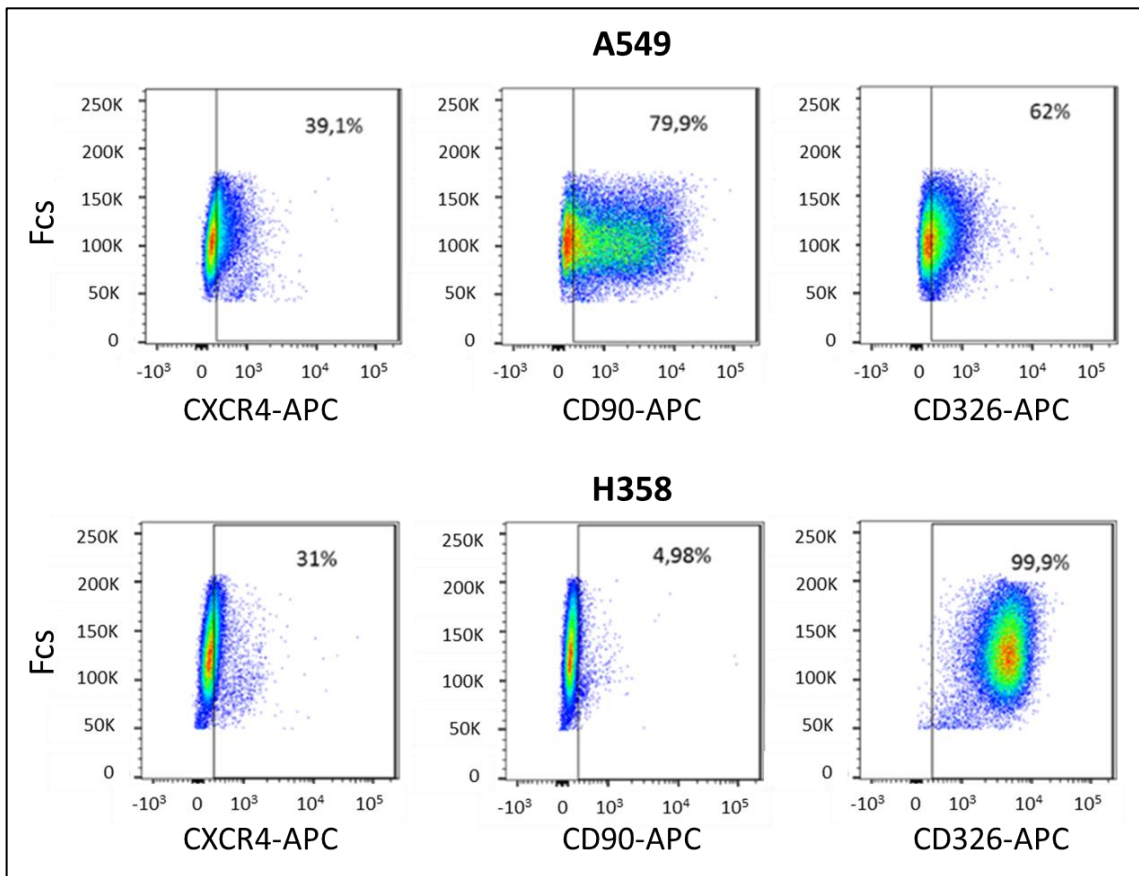


Figura 17 - Citometria de fluxo para análise dos marcadores de *stemness* CXCR4, CD90 e CD326 nas células A549 e H358. Ensaio representativo de citometria de fluxo dos marcadores de células tronco tumorais CXCR4 (CXCR4-APC), CD90 (CD90-APC) e CD326 (CD326-APC) nas células A549 (acima) e H358 (abaixo) oriundas de cultura aderente. O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para APC no eixo horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (área retangular) foi determinado arbitrariamente usando células A549 e H358 não marcadas como referências negativas para cada linhagem. A porcentagem de células positivas para cada marcador de superfície está indicada.

O objetivo desta análise era selecionar um marcador que fosse capaz de identificar subpopulações distintas em ambas as linhagens e investigar o fenótipo tronco tumoral nas células purificadas. Neste sentido, observamos que os marcadores CD90 e CD326 não são bons candidatos, pois apresentam expressão muito discrepante quando comparamos as duas linhagens ou são expressos em todas as células de uma das linhagens. Enquanto o CD90 é altamente expresso na A549 (79,9%) e apresenta baixa expressão na linhagem H358 (4,98%), o CD326 é expresso em praticamente todas as células da linhagem H358 (99,9%), o que não permitira a purificação de uma subpopulação enriquecida usando este marcador. Selecionamos então o marcador CXCR4, que estava expresso em 39,1% das células A549 e 31% das células H358, para continuar as análises. Primeiramente, avaliamos a expressão de CXCR4 em tumoresferas e observamos que a expressão do mesmo se encontrava aumentada nas tumoresferas de ambas as linhagens (**Figura 18**).

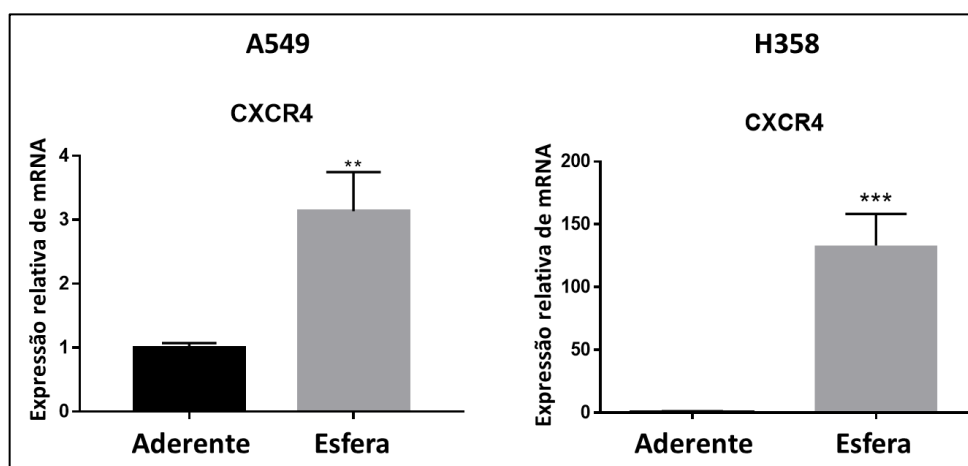


Figura 18 – As tumoresferas das linhagens A549 e H358 apresentam maior expressão de CXCR4. As linhagens A549 (esquerda) e H358 (direita) foram cultivadas na forma aderente (Aderente) ou na forma de tumoresferas (Esfera) e a expressão de CXCR4 foi analisada através de RT-qPCR. Gapdh foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Com base no fato de que o aumento de expressão de CXCR4 nas tumoresferas oriundas da linhagem H358 foi maior e no fato de que as células H358 apresentam maior autorrenovação

de CITs, nós realizamos primeiramente a purificação das células CXCR4 positivas (CXCR4+) na linhagem H358. Para isso, primeiro utilizamos as células H358 sem marcação (Branco), para determinar o nível de autofluorescência dessas células no canal do APC. Em seguida, para purificação de células CXCR4+ por citometria de fluxo, aproximadamente 3.10^7 células H358 tratadas com o marcador CXCR4-APC foram passadas no citômetro. Para obter populações fenotipicamente distintas entre si, escolhemos recuperar aproximadamente 10% a 15% de células das extremidades negativas (CXCR4-) e positivas (CXCR4+), como pode ser observado nas seleções P3 e P4, respectivamente, na **Figura 19**. Foram recuperadas ao final da purificação, aproximadamente, 5.10^5 células de cada seleção, que foram utilizadas em ensaios de citometria de fluxo, PCR, formação de tumoresferas e colônias.

Para avaliar a expressão de genes diferencialmente expressos nas populações CXCR4+ e CXCR-, realizamos RT-qPCR para genes de *stemness* e EMT (CXCR4, Nanog, Oct4, N-cadherin, Fibronectina, Slug, Snail e Vimentina), e observamos um aumento na expressão desses genes na população CXCR4+ em relação a população CXCR4- (**Figura 20**). Podemos observar que a população CXCR4+, de fato, tem maior expressão gênica de CXCR4, assim como de AURKA e KRAS.

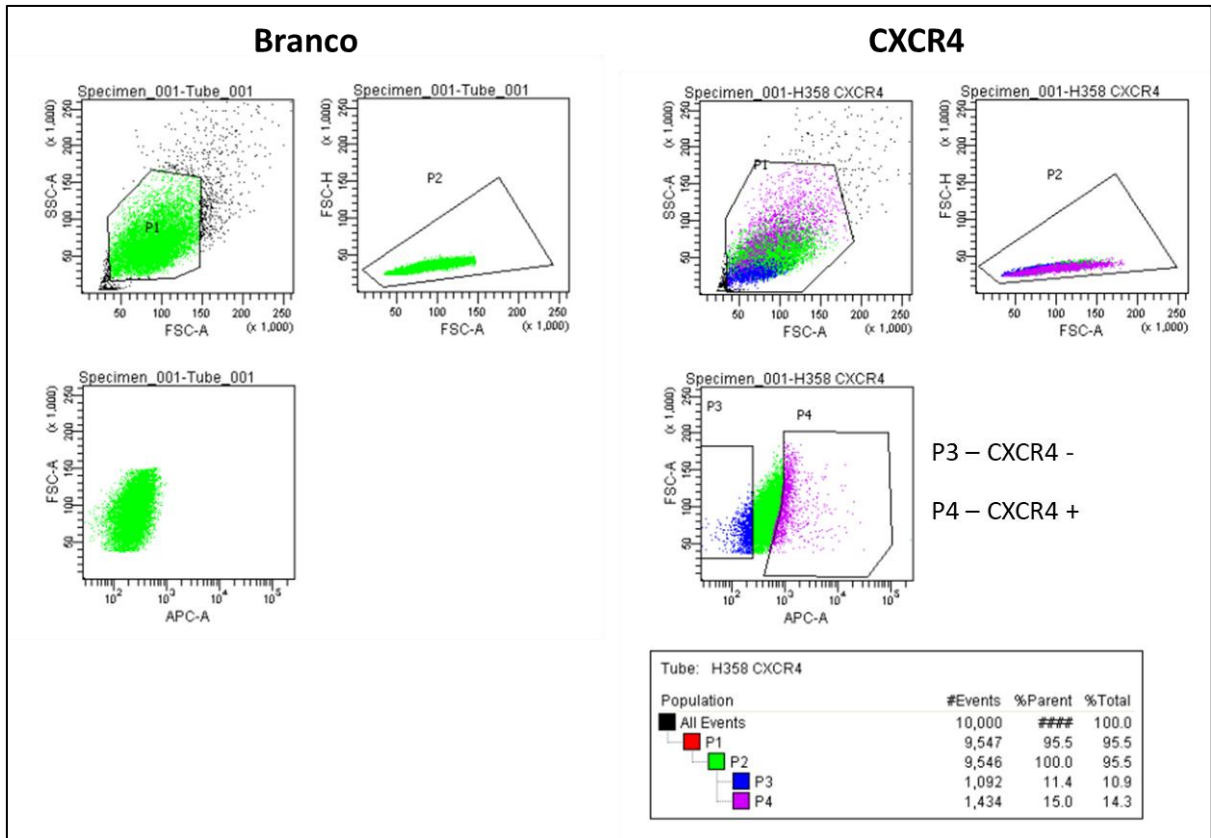


Figura 19 - Estratégia de purificação por citometria de fluxo das populações CXCR4+ e CXCR4- oriundas da linhagem H358. Ensaio de citometria de fluxo usado para definir os *gates* a serem usados para purificação das células CXCR4+ e CXCR4-. O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise (seleção P1) e excluir *doublets* (seleção P2) tanto nas células não marcadas (Branco), quanto nas células marcadas (CXCR4). Para determinar o nível de autofluorescência no canal APC-A a ser usado para medir a expressão de CXCR4, células H358 sem marcação (Branco) foram avaliadas de acordo com o histograma de dois eixos representando o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para APC-A no eixo horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical usando uma escala logarítmica (gráfico inferior esquerdo), sendo esta análise usada para definir o *gate* para identificação de células CXCR4+ nas células H358 marcadas (gráfico inferior direito), sendo as células H358 parentais tratadas com o anticorpo CXCR4-APC separadas em células CXCR4- (seleção P3) e CXCR4+ (seleção P4).

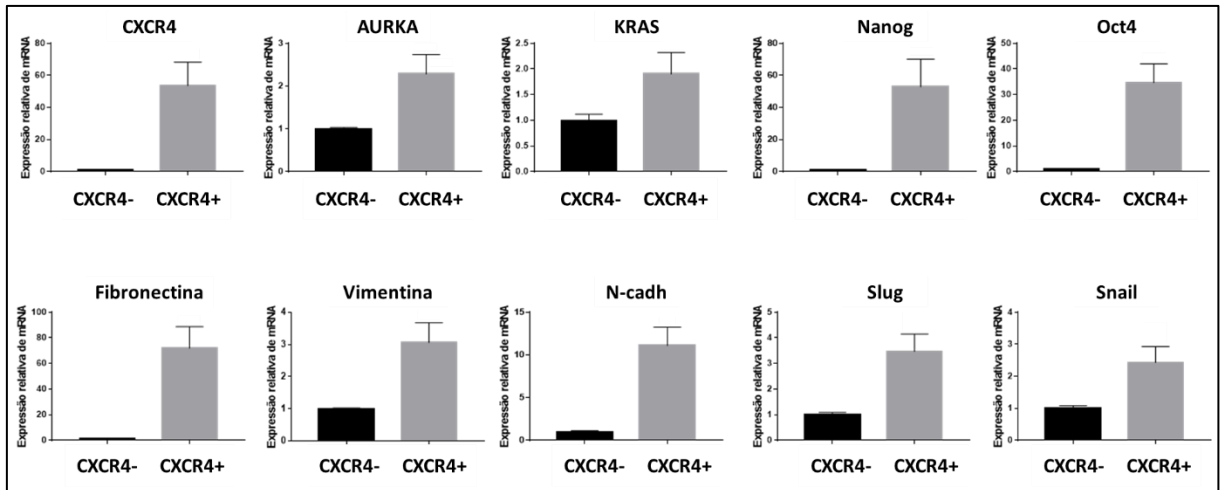


Figura 20 - Expressão gênica de genes de *stemness* e EMT é aumentada nas populações H358 CXCR4+. Análise da expressão dos alvos de interesse AURKA e KRAS, dos genes de *stemness* CXCR4, Nanog, Oct4, e dos genes de EMT Fibronectina, Vimentina, N-caderina (N-Cadh), Slug e Snail nas células H358 CXCR4+ e H358 CXCR4- por PCR em tempo real. Actina foi usada como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 replicatas técnicas (n = 1).

Entretanto, ao contrário do esperado, ao realizarmos cultura de tumoresferas com as populações purificadas, observamos uma diminuição no número de tumoresferas formadas na população CXCR4+ (**Figura 21**). Este resultado foi inesperado já que este ensaio permite o crescimento preferencial de células oriundas de CITs *in vitro*, sendo que o número de esferas formadas deve se correlacionar com o número de CITs presentes na população original.

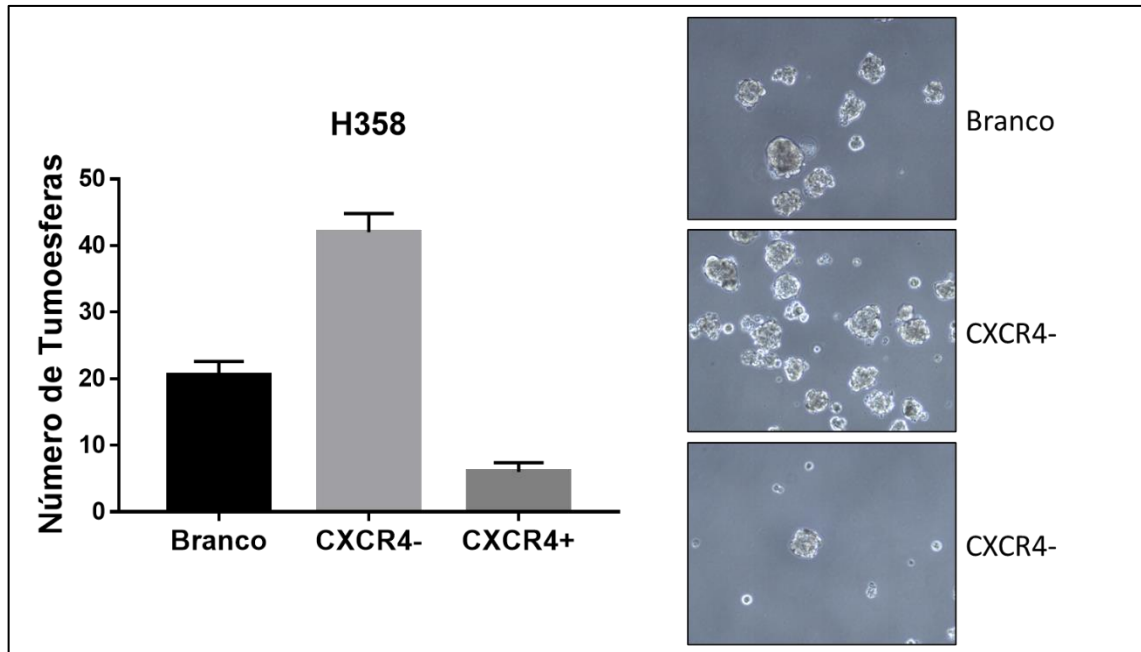


Figura 21 - Redução da capacidade de formação de tumoresferas de células H358 CXCR4+. As células H358 Branco recuperadas do *sorting*, CXCR4- e CXCR4+ purificadas foram plaqueadas para formação de tumoresferas primárias. **(Esquerda)** Gráfico representativo de duplicata técnica. **(Direita)** Imagem representativa do ensaio. Não foi realizado teste estatístico por se tratar de um único experimento (n = 1).

Para avaliar a capacidade das células CXCR4+ de se diferenciarem em células CXCR4-, comportamento esperado de CITs, realizamos uma citometria de fluxo ao final da cultura de tumoresferas e observamos que a cultura oriunda de células CXCR4+ era composta de aproximadamente 96,1% de células positivas para o CXCR4, enquanto a cultura oriunda das células CXCR4- era composta de somente 7,33% de células positivas para CXCR4 (**Figura 22**), indicando que não houve diferenciação significativa neste ensaio. Isto pode se dever ao fato de que a cultura de tumoresferas favorece o fenótipo tronco.

Além disso, realizamos um ensaio de formação de colônia com células oriundas das tumoresferas formadas a partir das células CXCR4+ e CXCR4- e, consistente com os resultados obtidos para a cultura de tumoresferas, nós observamos uma diminuição no número de colônias formadas a partir das células oriundas de tumoresferas das células H358 CXCR4+ (**Figura 23**).

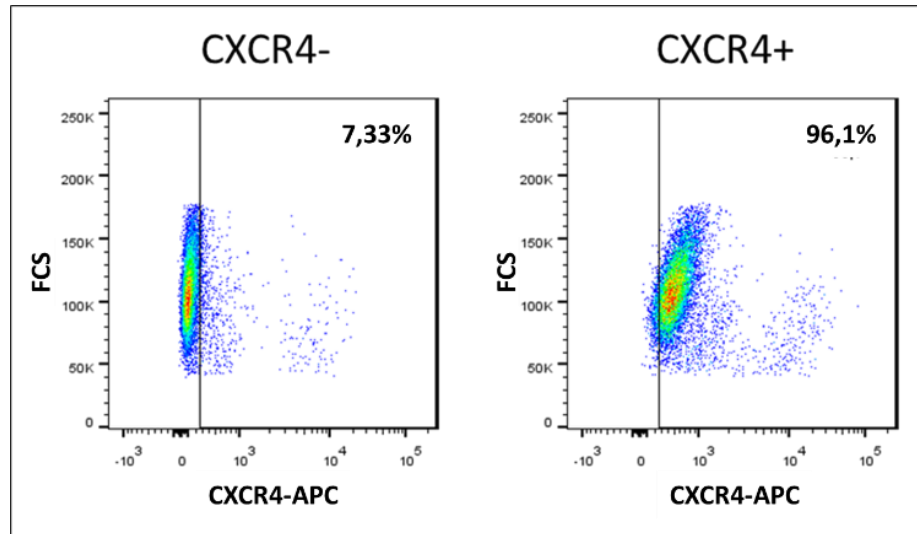


Figura 22 - Células H358 CXCR4+ não dão origem a células CXCR4- após cultura de tumoresferas. As tumoresferas formadas a partir das células H358 CXCR4- e H358 CXCR4+ foram analisadas por citometria de fluxo para o marcador de superfície CXCR4 (CXCR4-APC). O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para APC no eixo horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (área retangular) foi determinado arbitrariamente usando células H358 não marcadas como referência negativa. A porcentagem de células positivas para CXCR4 está indicada em cada caso.

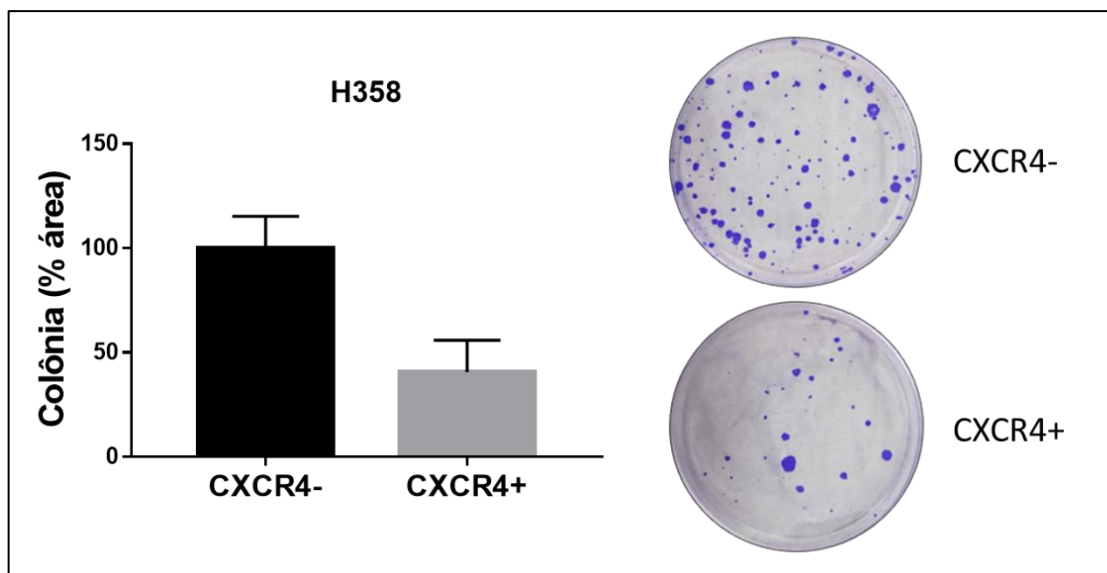


Figura 23 - Redução da capacidade de formação de colônias de células H358 CXCR4+. As tumoresferas oriundas das células H358 CXCR4- e CXCR4+ purificadas foram dissociadas e plaqueadas em placas aderentes para formação de colônias. Após 15 dias, as colônias formadas foram coradas com cristal violeta e fotografadas. **(Esquerda)** Gráfico representativo de duplicata técnica. **(Direita)** Imagem representativa do ensaio. Não foi realizado teste estatístico por se tratar de um único experimento (n = 1).

Estes resultados nos fizeram excluir o CXCR4 como um bom marcador para purificação de CITs pulmonares, uma vez que os resultados obtidos não foram consistentes, sendo que, por um lado, observamos um aumento da expressão de genes de *stemness* e EMT nas células CXCR4+, mas por outro lado, houve uma diminuição da formação de tumoresferas e de colônias aderentes nestas células.

Em conclusão, a nossa busca por um bom marcador de superfície enriquecido em tumoresferas para purificação de CITs pulmonares não foi bem-sucedida, sendo que observamos uma grande variação dos marcadores de células tronco candidatos nas linhagens A549 e H358, além de não conseguirmos validar uma correlação entre a expressão do marcador mais promissor e o fenótipo tronco-tumoral. Considerando essa variabilidade e inconsistência, optamos por utilizar uma abordagem alternativa para purificar CITs independentemente de marcadores de superfície, por meio da geração de linhagens celulares H358 e A549 expressando estavelmente o gene repórter GFP regulado por 6 cópias de um elemento do promotor de Nanog (marcador de *stemness*), nomeado SORE6 nesse sistema, que se liga aos fatores de transcrição de célula tronco SOX2 e Oct4 (Tang et al. 2015).

As células A549-SORE6 e H358-SORE6 foram geradas a partir de transdução com partículas lentivirais portadoras da construção SORE6-GFP e, após a determinação da concentração ideal de puromicina a ser usada em cada linhagem, as células A549 e H358 transduzidas foram selecionadas com puromicina nas concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 0,35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Após a seleção das células transduzidas, nós determinamos por citometria de fluxo, a proporção de células em cada linhagem positivas para o gene repórter GFP e, portanto, com expressão aumentada dos fatores de transcrição de células tronco SOX2 e Oct4. Nós observamos a presença de aproximadamente 10% de células GFP positivas (SORE6-GFP+) na linhagem A549 e de 70% na linhagem H358 (**Figura 24**), confirmando nossos achados iniciais de que a linhagem H358 apresenta maior fenótipo tronco-tumoral.

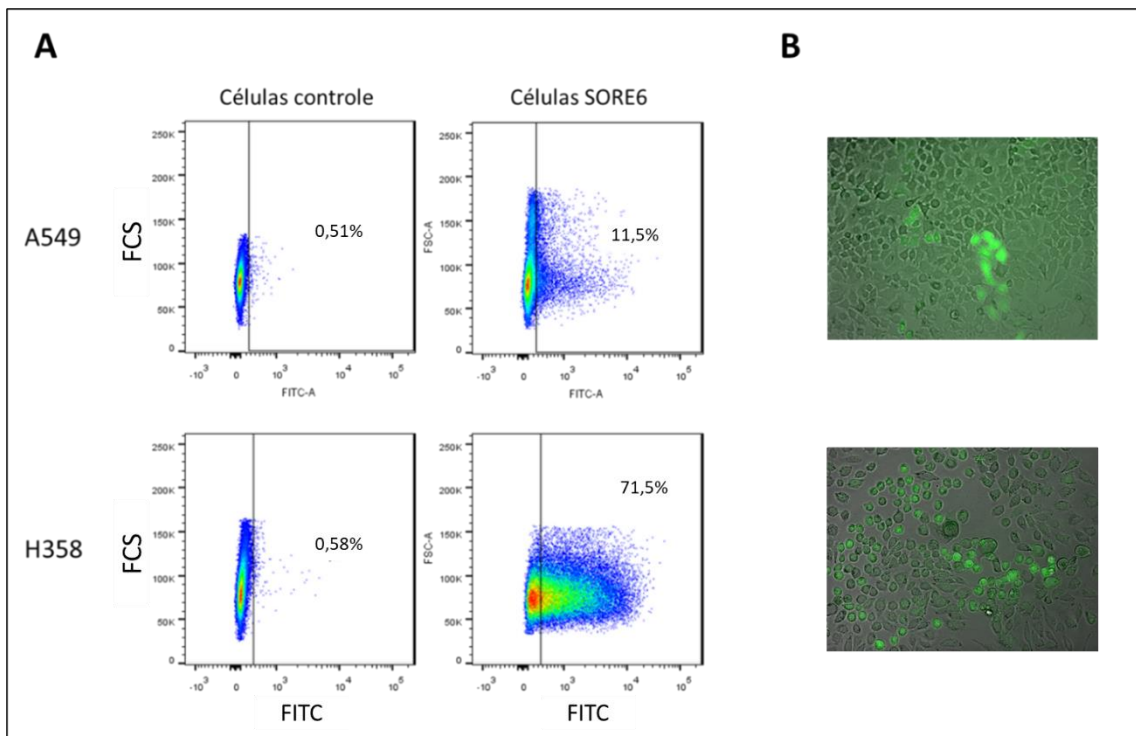


Figura 24 – A linhagem H358 apresenta uma proporção maior que a linhagem A549 de células SORE6-GFP+. (A) Ensaio representativo de citometria de fluxo para detecção de células SORE6-GFP+ em culturas aderentes das linhagens A549 (acima) e H358 (abaixo). O espalhamento de luz frontal (Fsc) e lateral (Ssc) foram usados para selecionar células vivas para análise. O histograma de dois eixos representa o número de eventos registrados em função do nível de fluorescência para o canal FITC (GFP) no eixo horizontal e espalhamento de luz frontal (Fsc) no eixo vertical usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas (área retangular) foi determinado arbitrariamente usando células H358 e A549 SORE6-Controle como referência negativa. A porcentagem de células SORE6-GFP+ está indicada em cada caso. (B) Imagens representativas das células A549 SORE6-GFP+ (acima) e H358 SORE6_GFP+ (abaixo) expressando GFP (em verde) por microscopia de fluorescência.

De fato, ao analisarmos a expressão gênica de Oct4 e Nanog, e expressão proteica de Nanog e SOX2 nas linhagens A549 e H358, observamos uma expressão significativamente maior dessas proteínas na linhagem H358, mesmo nas células oriundas da cultura aderente (**Figura 25**), o que corrobora os nossos resultados anteriores para esta linhagem. Além disso, confirmando que a expressão de SOX2, Oct4 e Nanog está relacionada ao fenótipo tronco-tumoral, observamos aumento da expressão destes fatores nas tumoresferas das duas linhagens (**Figura 24**).

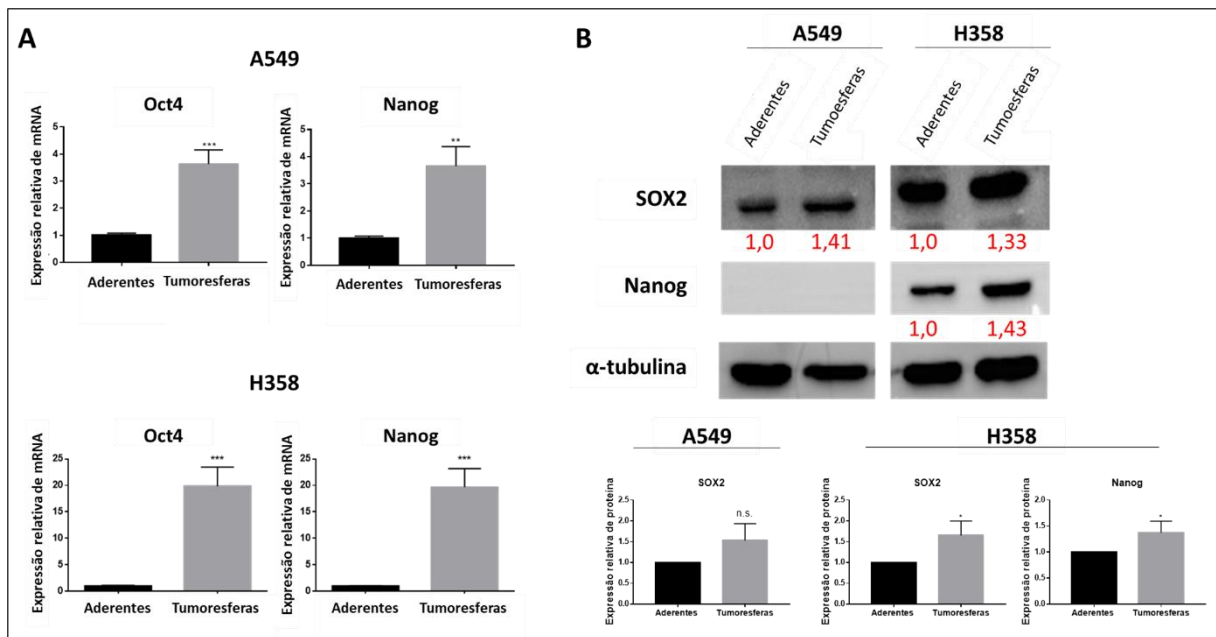


Figura 25 - Células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior expressão dos fatores de transcrição de stemness SOX2, Oct4 e Nanog. (A) As linhagens A549 (acima) e H358 (abaixo) foram cultivadas na forma aderente (Aderente) ou na forma de tumoresferas (tumoresferas) e a expressão de Oct4 e Nanog foi analisada através de RT-qPCR conforme indicado. Gapdh foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) As linhagens A549 (esquerda) e H358 (direita) foram cultivadas na forma aderente (Aderentes) ou na forma de tumoresferas (Tumoresferas) e os extratos proteicos foram coletados e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas correspondentes à SOX2 e Nanog nas imagens representativas (acima) foram quantificadas em relação ao controle endógeno (α -tubulina) e normalizadas pela amostra de referência (Aderentes). Abaixo estão os gráficos de 3 experimentos independentes para quantificação de SOX2 e Nanog. As imagens mostradas são representativas de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (* $p < 0,05$, n.s. – não significativo).

Avaliamos em seguida se a inibição da expressão de AURKA reduz a expressão proteica desses fatores de transcrição, e observamos uma expressão reduzida com inibição de AURKA com siRNA na linhagem H358. Na A549 não foi possível avaliar a redução da expressão devido à baixa expressão dessas proteínas nessa linhagem (**Figura 26**).

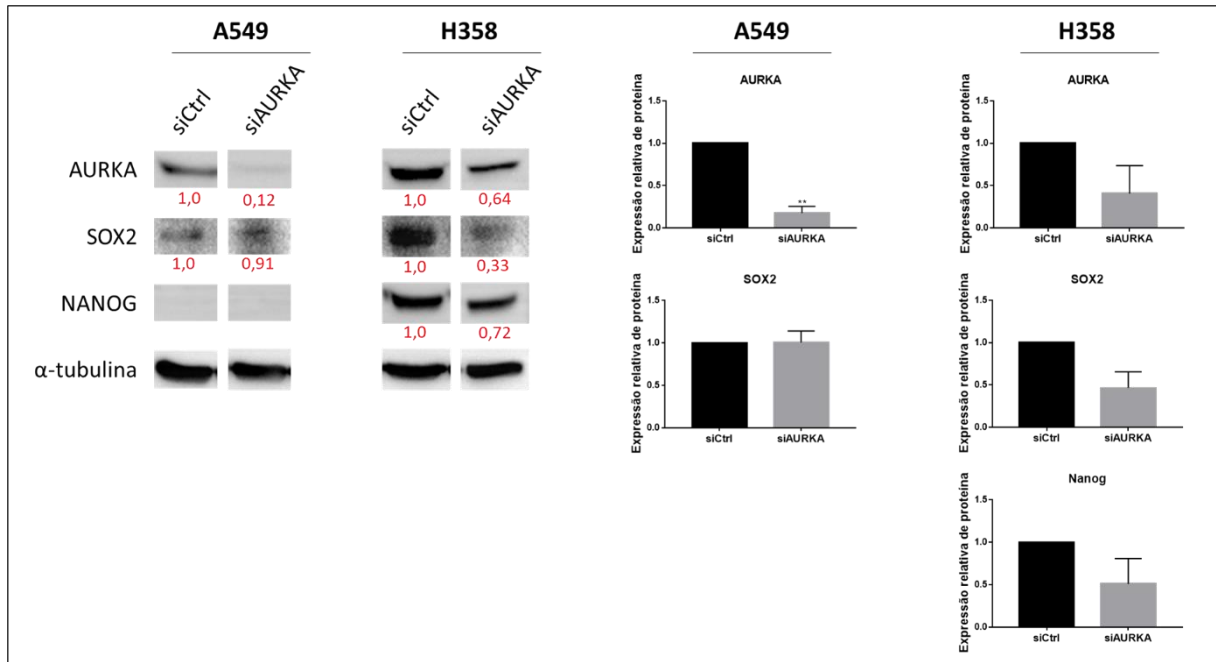


Figura 26 – A inibição de AURKA em células H358 levam à redução da expressão de genes de *stemness*. Células A549 e H358 foram transfectadas com RNA de interferência controle, sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl) e com RNA de interferência para AURKA (siAURKA) por 96 horas e a expressão proteica de AURKA, SOX2 e Nanog foi avaliada por Western Blotting com os anticorpos indicados. Esquerda) Imagens representativas de 2 experimentos independentes. As bandas proteicas correspondentes à AURKA, Nanog e SOX2 foram quantificadas em relação ao controle endógeno (α -tubulina) e normalizadas pela amostra de referência (siCtrl). Direita) Gráficos de 2 experimentos independentes para quantificação de AURKA, SOX2 e Nanog. .

É importante mencionar que os planos de caracterização das linhagens SORE6-GFP, que incluía avaliar o fenótipo tronco tumoral e a inibição da AURKA em células GFP positivas purificadas dessas linhagens foram interrompidos em decorrência da pandemia do novo Coronavírus, que teve início em março de 2020 e impactou significativamente o andamento deste trabalho, uma vez que os serviços separação celular por citometria de fluxo ficaram indisponíveis. No entanto, consideramos de suma importância a apresentação dos resultados obtidos até o momento com essas células.

4.4 Tumoresferas de linhagens pulmonares possuem maior capacidade migratória e invasiva.

Como frequentemente a aquisição de propriedades tronco (*stemness*) é acompanhada pela aquisição de propriedades mesenquimais, migratórias e invasivas (Lawson et al. 2015), características importantes do processo metastático, nós avaliamos se estas características malignas estariam aumentadas em células oriundas de tumoresferas das nossas linhagens pulmonares, que apresentam enriquecimento de características tronco-tumorais.

Primeiramente, através de ensaios de migração *transwell*, determinamos que quando comparadas às células A549 e H358 aderentes, as células A549 e H358 oriundas de tumoresferas apresentam um aumento de 45% e 76% na sua capacidade migratória, respectivamente (**Figura 27**).

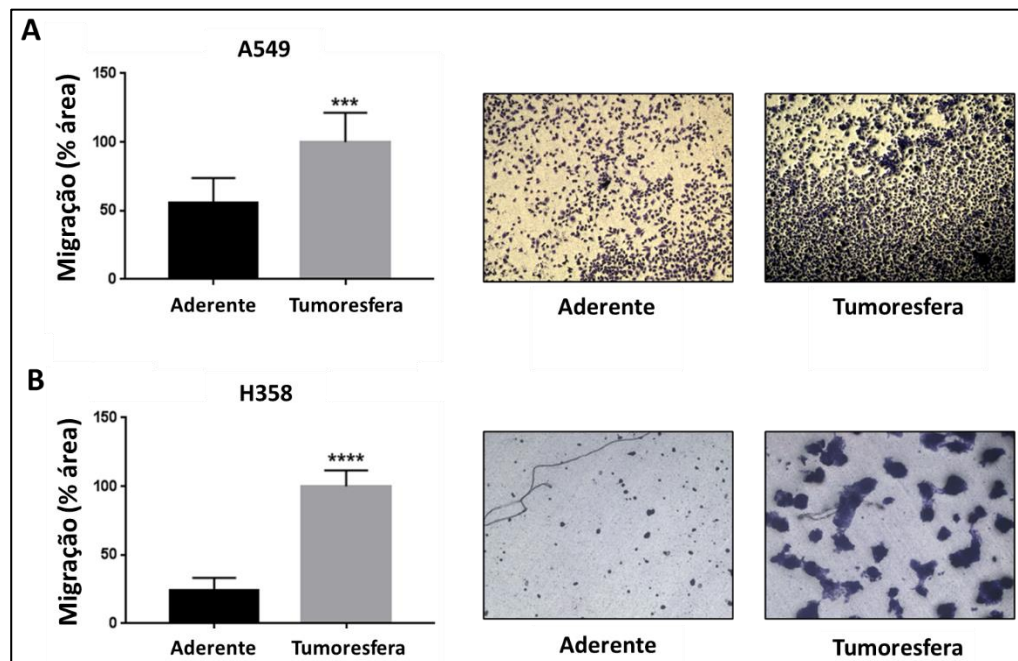


Figura 27 – Células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior capacidade migratória. As linhagens A549 (A) e H358 (B) foram cultivadas na forma aderente ou na forma de tumoresferas e submetidas a ensaio de migração *transwell*. As células que migraram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. (Esquerda) Quantificação da área ocupada por células migratórias. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$. (Direita) Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Em seguida, determinamos, através de ensaios de invasão *transwell*, que as células oriundas de tumoresferas de ambas as linhagens apresentam capacidade invasiva aumentada, tendo observado um aumento em relação às células aderentes de 20% e 75%, nas linhagens A549 e H358 respectivamente (**Figura 28**). Estes resultados são condizentes com o enriquecimento de CITs nas tumoresferas e mostram que células com fenótipo tronco tumoral também possuem maior fenótipo migratório e invasivo.

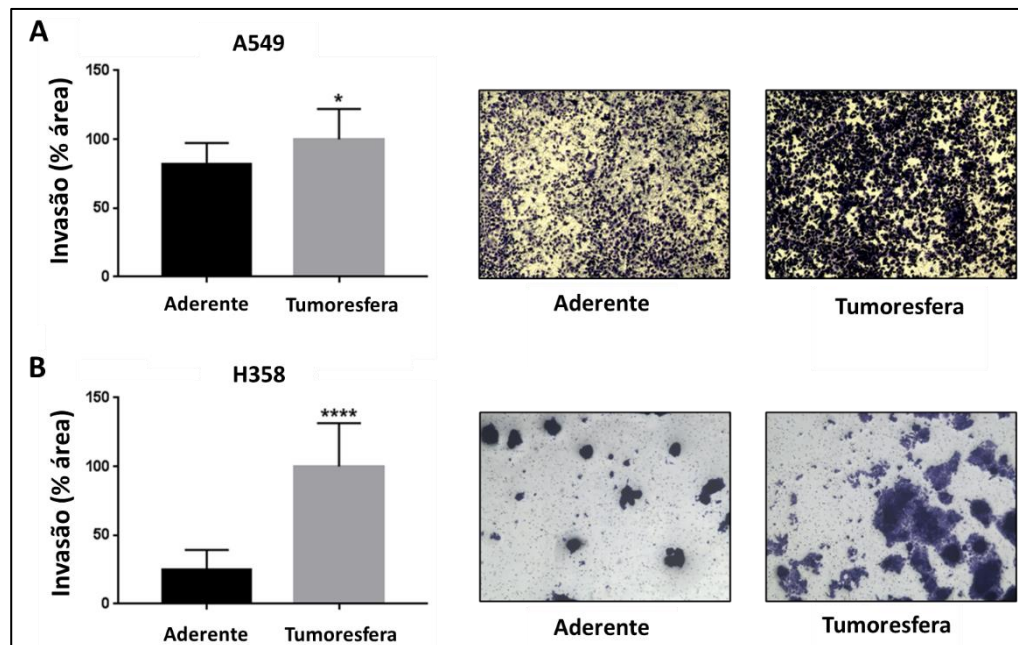


Figura 28 – Células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior capacidade invasiva. As linhagens A549 (A) e H358 (B) foram cultivadas na forma aderente (Aderente) ou na forma de tumoresferas (Tumoresfera) e submetidas a ensaio de invasão *transwell*. As células que invadiram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. Esquerda) Quantificação da área ocupada por células invasivas. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$). Direita) Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Finalmente, investigamos o nível de expressão de fatores importantes para EMT nas tumoresferas apenas da H358, linhagem cujas tumoresferas apresentaram maior aumento do fenótipo migratório e invasivo. O objetivo foi investigar se o ganho da capacidade de migração

e o aumento da capacidade de invasão estariam correlacionados com um aumento do nível de expressão desses fatores. Nós observamos que, quando comparadas com células cultivadas de forma aderente, células H358 oriundas de tumoresferas apresentaram um aumento significativo de 886% na expressão de Vimentina e 81% na expressão de Slug. Além disso, observamos um aumento de 27% e 76% na expressão de Syndecan e Fibronectina. Por outro lado, não observamos alteração da expressão de Snail (**Figura 29**).

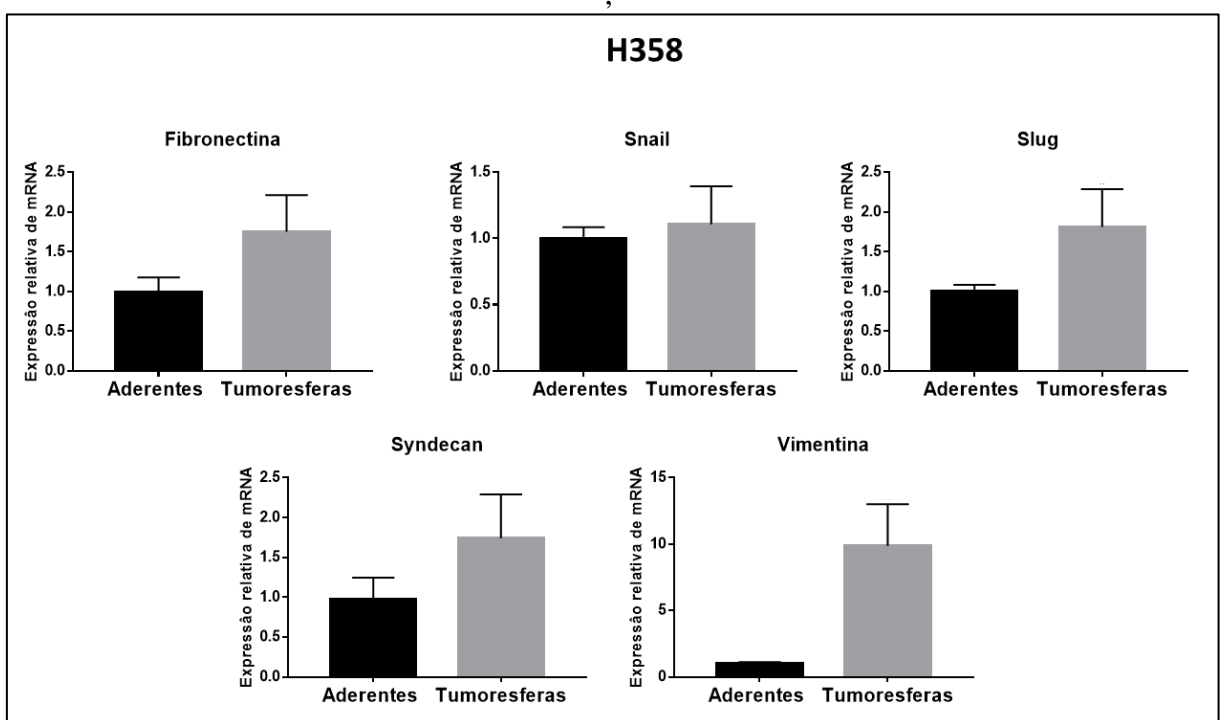


Figura 29 - Células oriundas de tumoresferas possuem maior expressão de genes de EMT na linhagem H358. A linhagem H358 foi cultivada na forma aderente ou na forma de tumoresferas e a expressão dos genes de EMT Fibronectina, Vimentina, Slug, Snail e Syndecan foi analisada através de RT-qPCR. Gapdh foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 2 experimentos independentes.

4.5 Inibição da AURKA reduz o fenótipo migratório e invasivo

Para avaliar o papel da AURKA sobre características malignas correlacionadas com a capacidade metastática e com o fenótipo tronco-tumoral, primeiramente realizamos a inibição de AURKA nestas linhagens por interferência de RNA, tendo obtido uma redução média de expressão de AURKA ao nível de RNA de 93 e 91 % e de proteína de 77 e 83% nas linhagens A549 e H358, respectivamente (**Figura 30**). Em seguida, através de ensaios de migração *transwell*, determinamos que a inibição de expressão de AURKA reduz a capacidade migratória das células A549 em 49% (**Figura 31**). Não foi possível realizar esse experimento na linhagem H358, pois essas células apresentam fenótipo migratório muito reduzido na condição aderente *in vitro* (ver **Figura 27**).

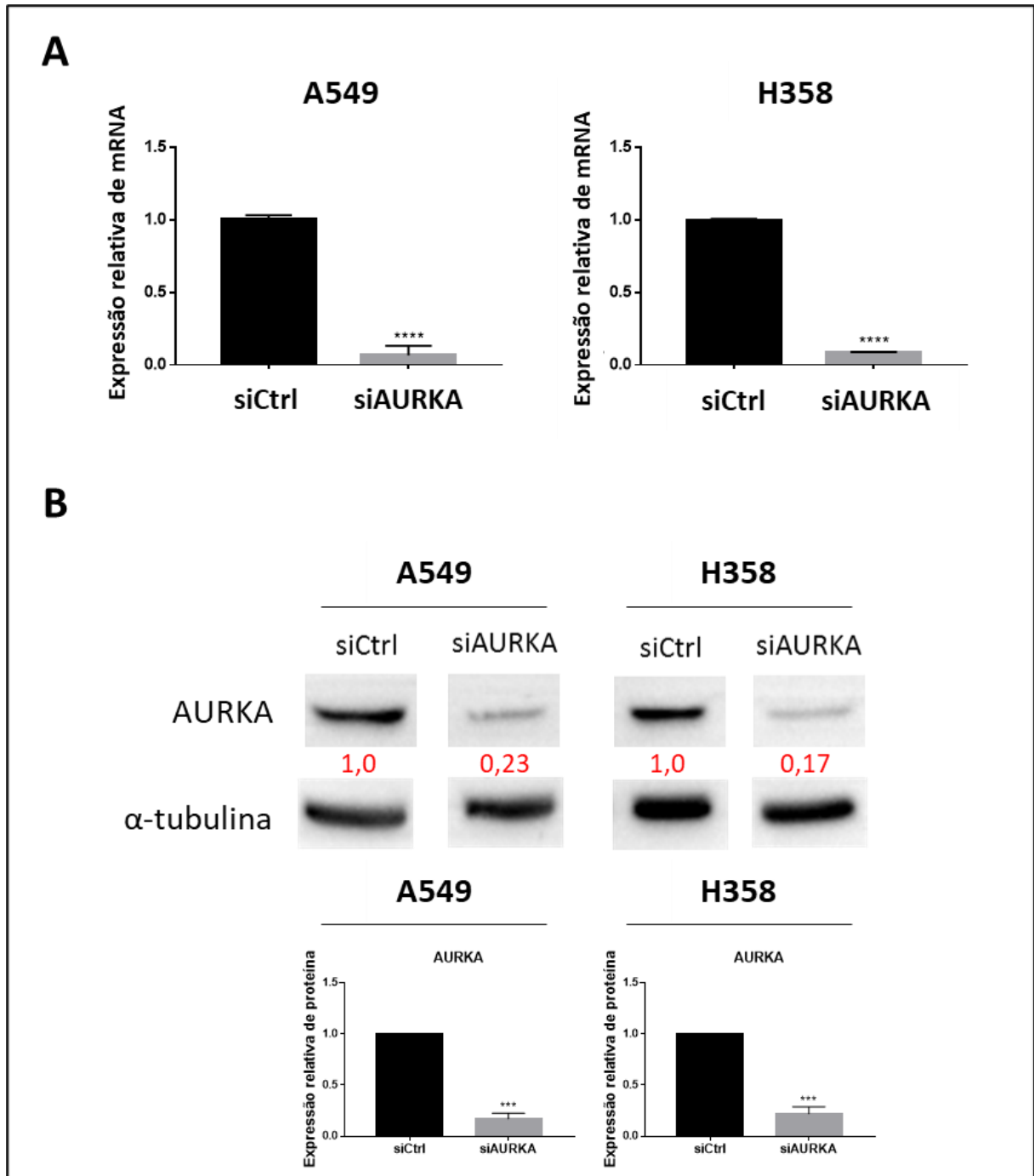


Figura 30 – Inibição de AURKA com RNA de interferência nas células A549 e H358. As células A549 e H358 foram transfectadas com RNA de interferência controle, sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl) e com RNA de interferência para AURKA (siAURKA). **(A)** Após 72h a expressão de AURKA foi analisada através de RT-qPCR. Actina foi usada como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (**** $p < 0,0001$). **(B)** Após 96h os extratos proteicos foram coletados e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas correspondentes à AURKA foram quantificadas nas imagens representativas (acima) em relação ao controle endógeno (α -tubulina) e normalizadas pela amostra de referência (siCtrl). Abaixo estão os gráficos de 3 experimentos independentes para quantificação de AURKA. As imagens mostradas são representativas de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (***) $p < 0,001$).

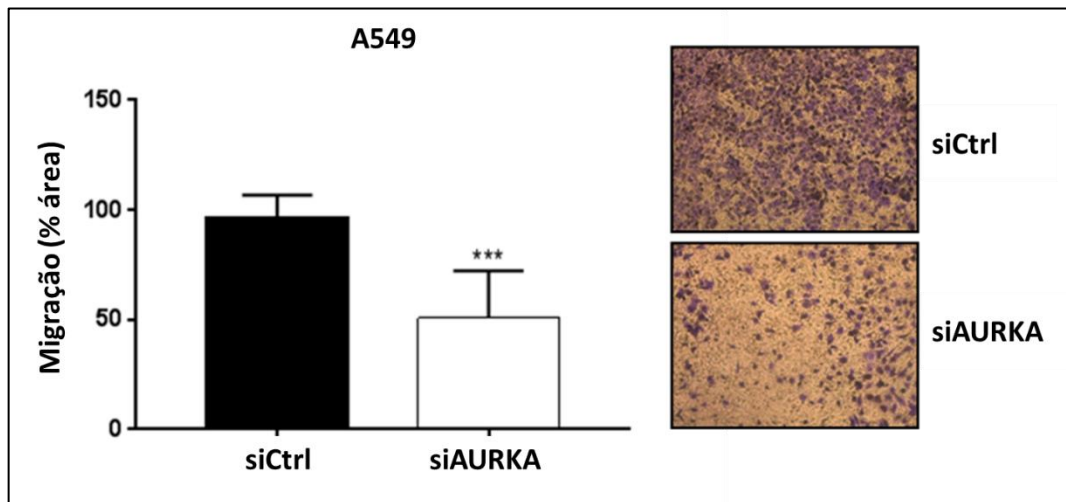


Figura 31 – A inibição da expressão de AURKA promove uma diminuição da capacidade migratória das células A549. Células A549 foram transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para AURKA (siAURKA). Após 72 horas as células foram submetidas a ensaio de migração *transwell* e as células que migraram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. **Esquerda)** Quantificação da área ocupada por células migratórias. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (***) $p < 0,0005$). **Direita)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Apesar de possuírem atividade migratória extremamente limitada na condição aderente (ver **Figura 27**) *in vitro*, as células H358 possuem capacidade invasiva nesta condição em ensaios *transwell*, o que sugere que, tanto a aquisição do fenótipo tronco, quanto a sinalização mediada por proteínas de matriz presentes no Matrigel são cruciais para ativar a migração destas células. Desta forma, nós avaliamos em ambas as linhagens como a inibição de AURKA afeta a capacidade invasiva celular e determinamos que a inibição de AURKA causa uma redução na capacidade invasiva de 31% e 59% nas linhagens A549 e H358, respectivamente (**Figura 32**).

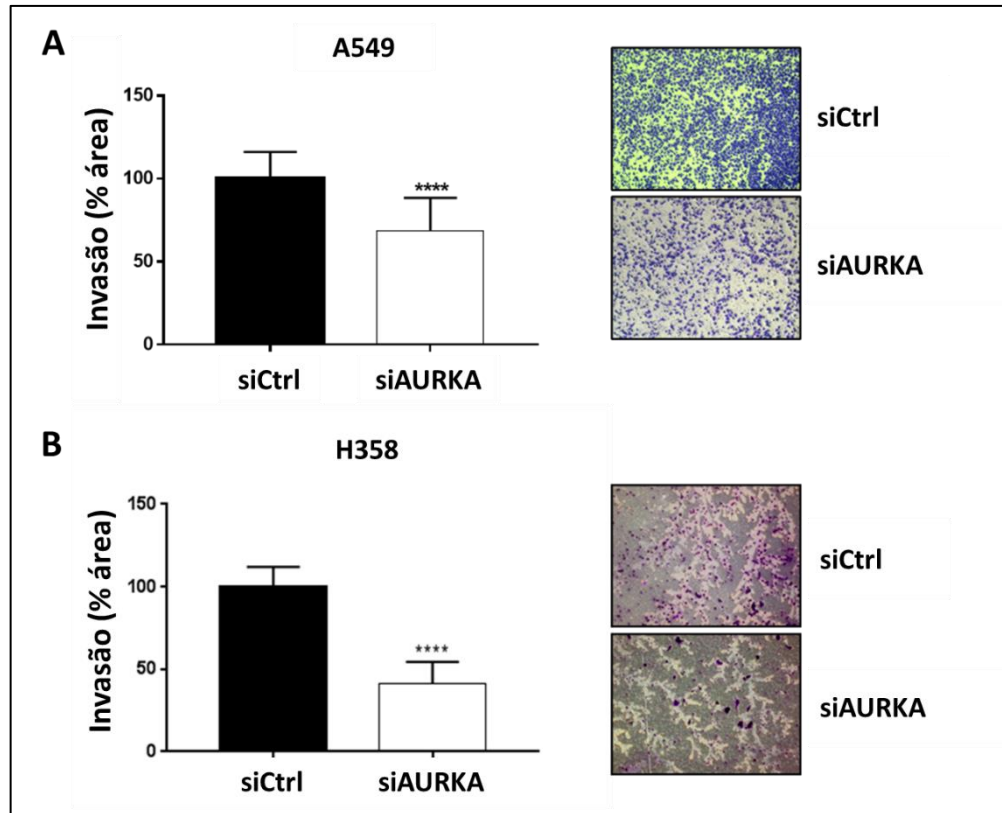


Figura 32 – A inibição da expressão de AURKA promove uma diminuição da capacidade invasiva das células A549 e H358. Células A549 (**A**) e H358 (**B**) foram transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para AURKA (siAURKA). Após 72 horas as células foram submetidas a ensaio de invasão *transwell* e as células que invadiram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. (**Esquerda**) Quantificação da área ocupada por células invasivas. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (**** $p < 0,0001$). (**Direita**) Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Para investigar quais vias estão sendo reguladas pela inibição de AURKA na redução da capacidade de migração e invasão, investigamos a expressão de genes envolvidos na EMT após inibição de AURKA com siRNA. Para a A549, observamos uma redução de 63% apenas de Snail, e um aumento de 96% de Slug, 119% de Vimentina, 76% de Vimentina e 26% de Syndecan. Enquanto na H358 observamos uma redução de 56% de Snail, 41% da Fibronectina e 49% do Syndecan, um aumento discreto de 7% de Slug e de 13% de Vimentina (**Figura 33**). Embora tenhamos observado uma redução de vários fatores ligados a EMT apenas na linhagem H358, estes resultados precisam ser repetidos para determinar se estas variações são reprodutíveis e significativas.

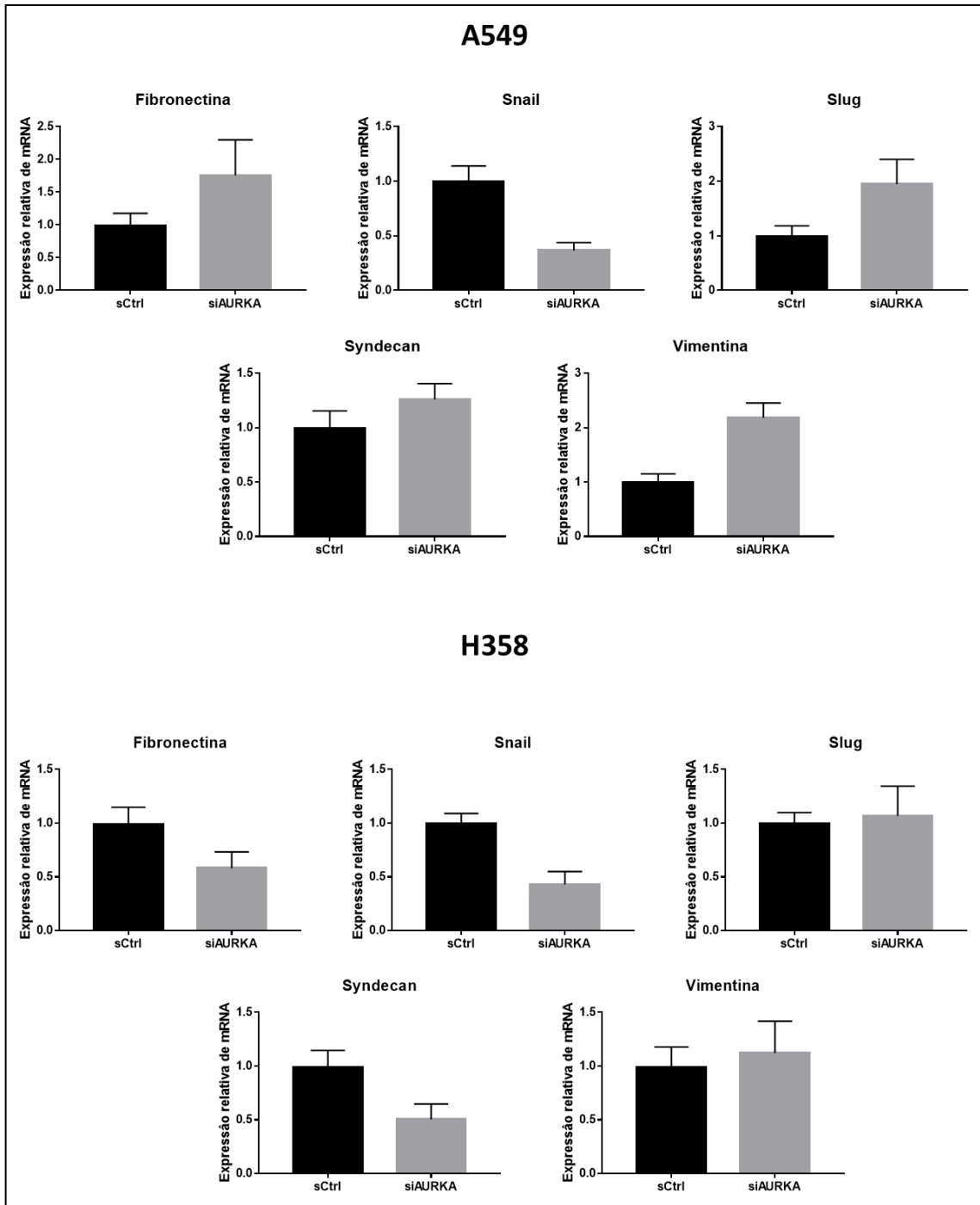


Figura 33 - A inibição da expressão de AURKA promove uma diminuição na expressão de genes de EMT nas linhagens A549 e H358. As células A549 (acima) e H358 (abaixo) foram transfectadas com RNA de interferência controle, sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl) e com RNA de interferência para AURKA (siAURKA). Após 72h a expressão dos genes de EMT Fibronectina, Snail, Slug, Syndecan e Vimentina foi analisada através de RT-qPCR. Gapdh foi usada como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 2 experimentos independentes.

Após determinar que a inibição de AURKA afeta o fenótipo migratório e invasivo nas linhagens H358 e A549 aderentes, resolvemos avaliar o efeito da AURKA na capacidade migratória e invasiva das células oriundas de tumoresferas. Para tanto, realizamos a inibição farmacológica de AURKA com o inibidor dual AI-II nas concentrações de 2 e 5 μM nas tumoresferas e observamos na linhagem A549, tanto uma redução de 31 e 24% da capacidade de migração (**Figura 34A**), quanto uma redução de 15 e 18% da capacidade de invasão (**Figura 35A**) com 2 e 5 μM de AI-II, respectivamente. Na linhagem H358 a redução foi mais pronunciada. Observamos uma redução de 69 e 87% da capacidade de migração (**Figura 34B**) e uma redução de 80 e 61% da capacidade de invasão (**Figura 35B**) com 2 e 5 μM de AI-II, respectivamente. Novamente a linhagem H358 foi mais sensível à inibição de AURKA.

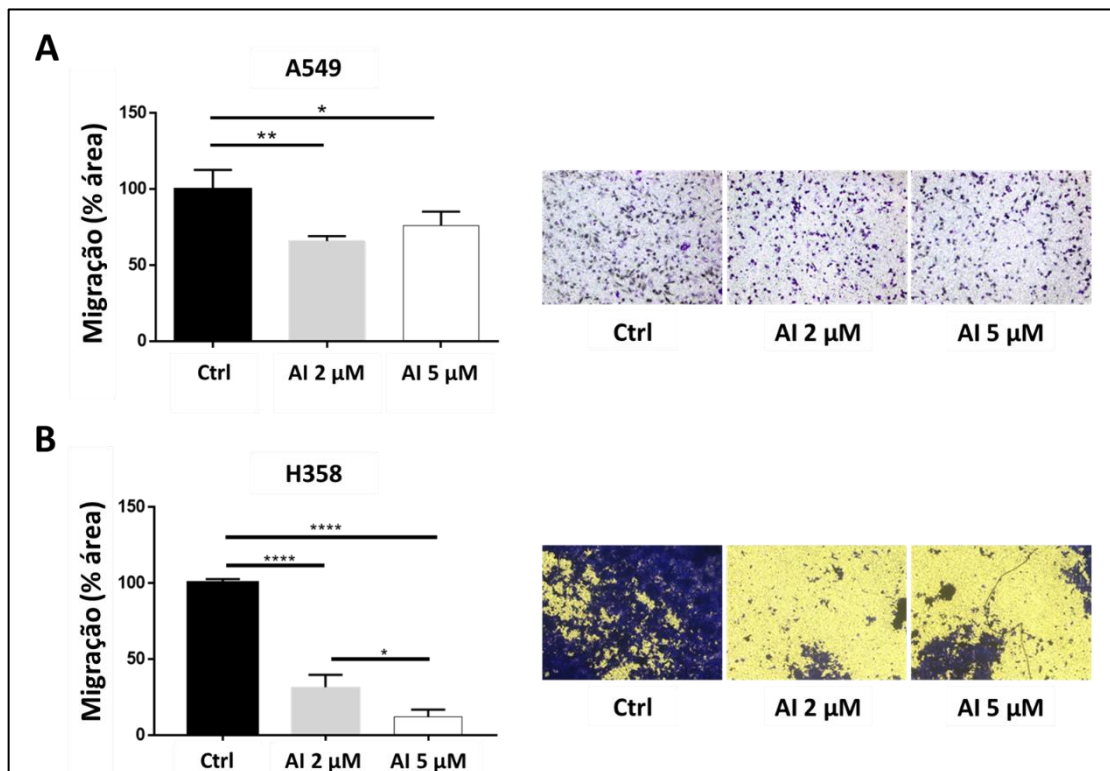


Figura 34 – Inibição da atividade de AURKA em células A549 e H358 oriundas de tumoresferas promove uma diminuição da capacidade migratória. Células A549 (A) e H358 (B) oriundas de cultura de tumoresferas foram tratadas com DMSO 0,1% (Ctrl) ou inibidor de AURKA (AI) nas concentrações indicadas e imediatamente submetidas a ensaio de migração *transwell* por 24h (A549) ou 48h (H358). As células que migraram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. **(Esquerda)** Quantificação da área ocupada por células migratórias. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através teste *one-way* ANOVA comparando os grupos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. **(Direita)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

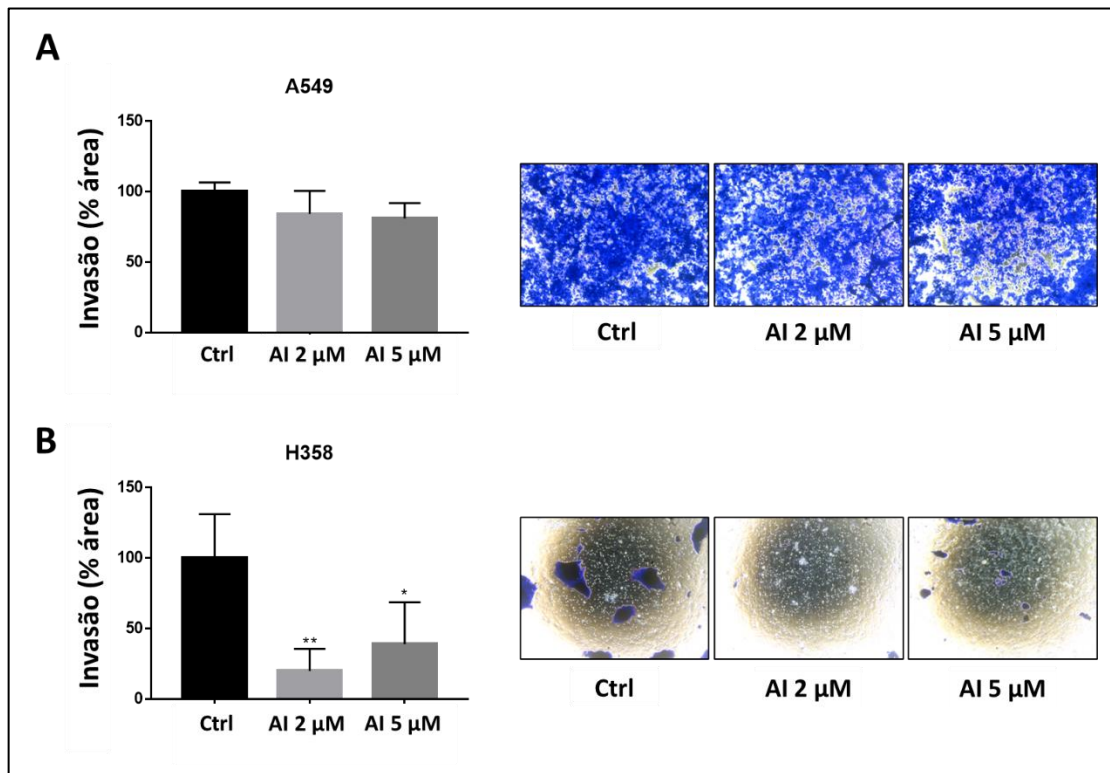


Figura 35 - Inibição da atividade de AURKA em células A549 e H358 oriundas de tumoresferas promove uma diminuição da capacidade invasiva. Células A549 (A) e H358 (B) oriundas de cultura de tumoresferas foram tratadas com DMSO 0,1% (Ctrl) ou inibidor de AURKA (AI) nas concentrações indicadas e imediatamente submetidas a ensaio de invasão *transwell* por 24h (A549) ou 48h (H358). As células que migraram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. **(Esquerda)** Quantificação da área ocupada por células migratórias. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *one-way* ANOVA comparando os grupos, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. **(Direita)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

4.6 Inibição da AURKA reduz a angiogênese

A capacidade das células tumorais de promoverem angiogênese é uma característica maligna importante, sendo que a vascularidade tumoral está positivamente correlacionada com potencial metastático aumentado e pior prognóstico clínico (Bielenberg and Zetter 2015). Portanto é esperado que células com fenótipo tronco tumoral tenham maior capacidade angiogênica e que a inibição de vias de *stemness* interfiram com a capacidade angiogênica de linhagens tumorais (Ciccione et al. 2018). Com base nesta premissa, resolvemos investigar se a AURKA possui um papel importante para o neste processo. Mais especificamente investigamos se a inibição de AURKA levaria a uma redução da capacidade das células A549 e H358 de promoverem a formação de novos vasos.

Anteriormente, nós já havíamos observado que a inibição de KRAS por RNA de interferência em células A549 e H358 reduz a expressão dos fatores pró-angiogênicos IL8 e VEGF (Carneiro-Lobo et al. 2019). Interessantemente, ao repetirmos este experimento com inibição de AURKA, observamos que a inibição de AURKA por RNA de interferência reduz a expressão de IL8 e VEGF somente na linhagem H358 (**Figura 36**).

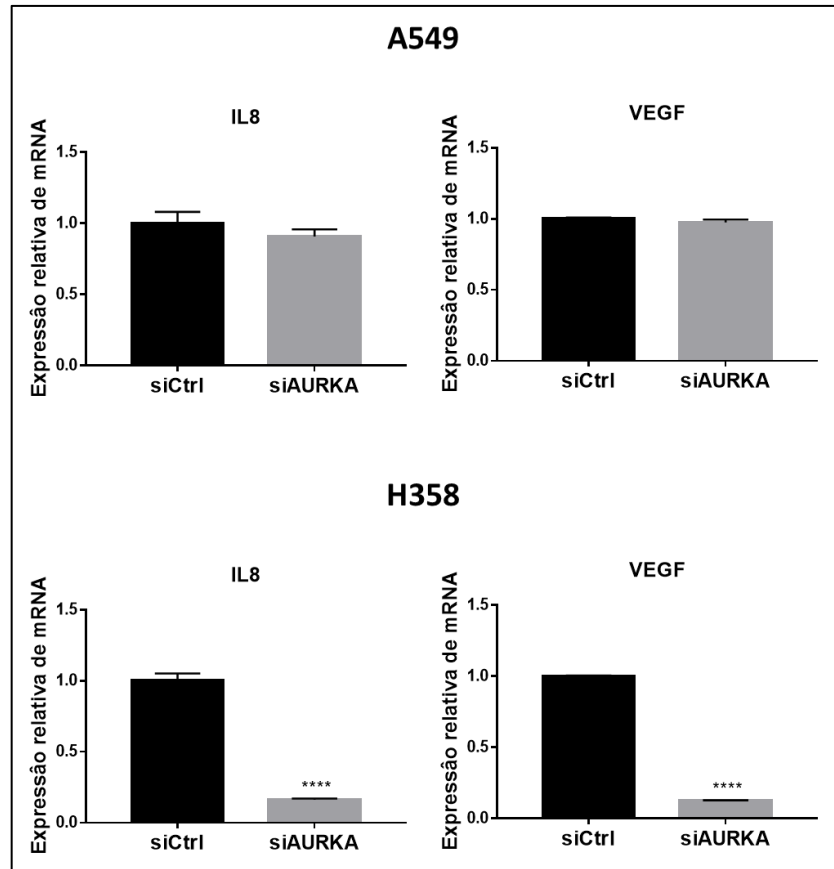


Figura 36 - A inibição da AURKA por interferência de RNA reduz a expressão de fatores pró-angiogênicos na linhagem H358. As células A549 (esquerda) e H358 (direita) foram transfectadas com RNA de interferência controle, sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl) e com RNA de interferência para AURKA (siAURKA). Após 72h a expressão dos genes de fatores pró-angiogênicos IL-8 e VEGF foi analisada através de RT-qPCR. Actina foi usada como controle endógeno para normalização da expressão. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 4 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* (**** $p < 0,0001$) comparando os grupos siCtrl e siAURKA.

Em seguida investigamos se a inibição da KRAS nas células tumorais reduz a capacidade de células endoteliais de formarem de novos vasos. Para tanto realizamos o ensaio de formação de tubos angiogênicos com células endoteliais HUVEC *in vitro* usando meio condicionado de células A549 e H358 com e sem inibição de KRAS por interferência de RNA. Nós observamos que somente o meio condicionado com inibição de KRAS das células H358, mas não o das células A549, reduz a capacidade das células HUVEC de formarem tubos angiogênicos (**Figura 37**).

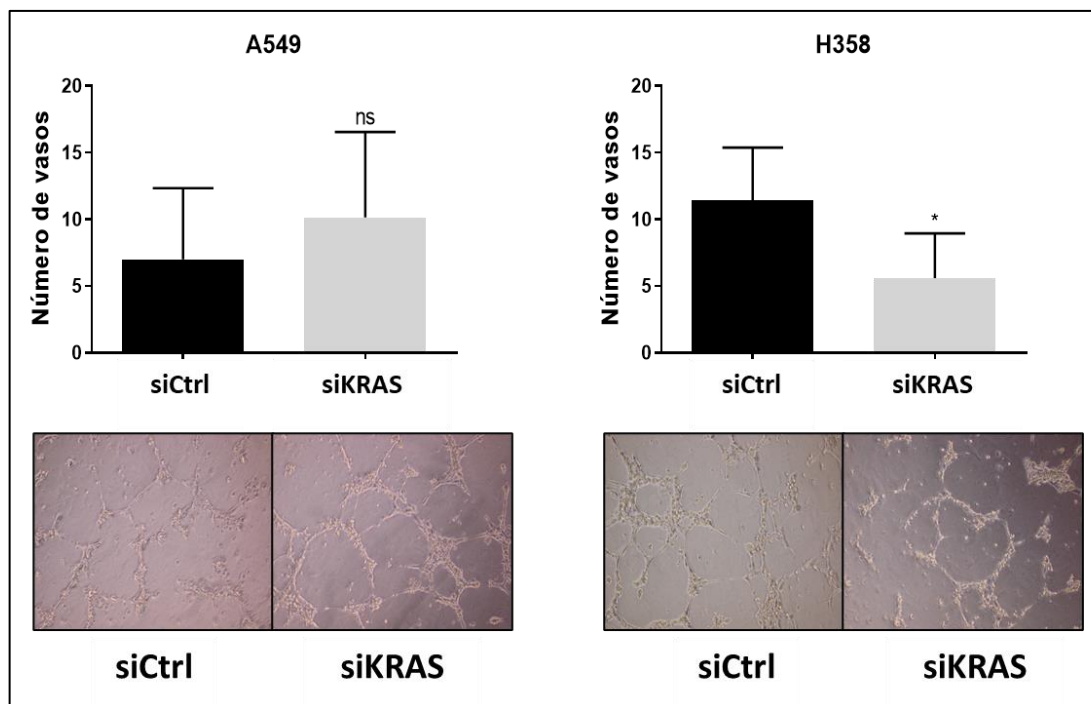


Figura 37 – Meio condicionado de células H358 com inibição de KRAS por interferência de RNA reduz a capacidade das células HUVEC de formarem tubos angiogênicos *in vitro*. As células HUVEC foram submetidas ao ensaio de formação de tubos na presença de meio condicionado sem soro de células A549 (esquerda) ou H358 (direita) transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para KRAS (siKRAS). Após 6h os tubos formados foram fotografados. **(Acima)** Quantificação do número de vasos formados. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* comparando os grupos siCtrl e siKRAS (* $p < 0,05$, ns – não significativo). **(Abaixo)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Em seguida repetimos o ensaio de formação de tubos com inibição de AURKA por interferência de RNA para investigar se a inibição de AURKA reduz a formação de novos vasos. Neste caso observamos uma redução próxima ao limiar de significância de 44% nos ensaios com meio condicionado da linhagem A549 ($p = 0,0697$) e uma redução significativa de 81% nos ensaios com meio condicionado da linhagem H358 (**Figura 38**).

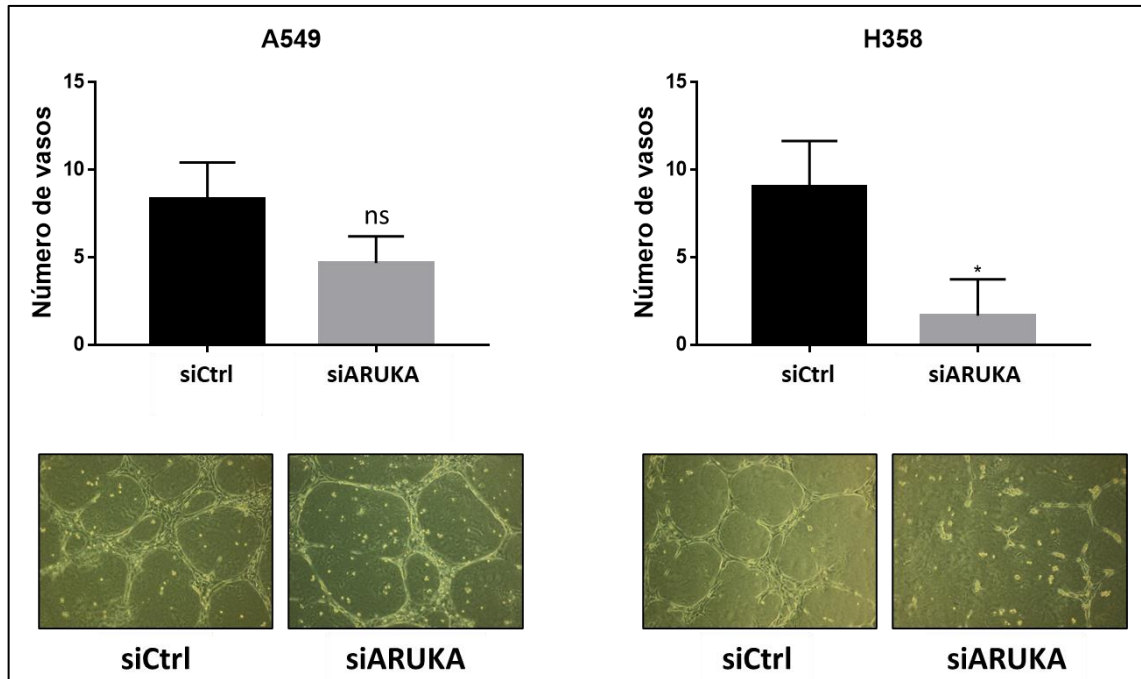


Figura 38 - Meio condicionado de células H358 com inibição de AURKA por interferência de RNA reduz a capacidade das células HUVEC de formarem tubos angiogênicos *in vitro*. As células HUVEC foram submetidas ao ensaio de formação de tubos na presença de meio condicionado sem soro de células A549 (esquerda) ou H358 (direita) transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para AURKA (siARUKA). Após 6h os tubos formados foram fotografados. **(Acima)** Quantificação do número de vasos formados. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste *student-t* comparando os grupos siCtrl e siARUKA (* $p < 0,05$, ns – não significativo). **(Abaixo)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

A capacidade migratória das células endoteliais pode ser estimulada por fatores pró-angiogênicos secretados pelas células tumorais e esta capacidade é importante para a angiogênese. Conforme já reportado pelo nosso grupo e repetido nesta tese, o meio condicionado de células H358 com inibição de KRAS reduz a capacidade migratória de células HUVEC, sendo que a suplementação desse meio condicionado com IL-8 e VEGF resgata a capacidade de migração destas células (**Figura 39**) (Carneiro-Lobo et al. 2019).

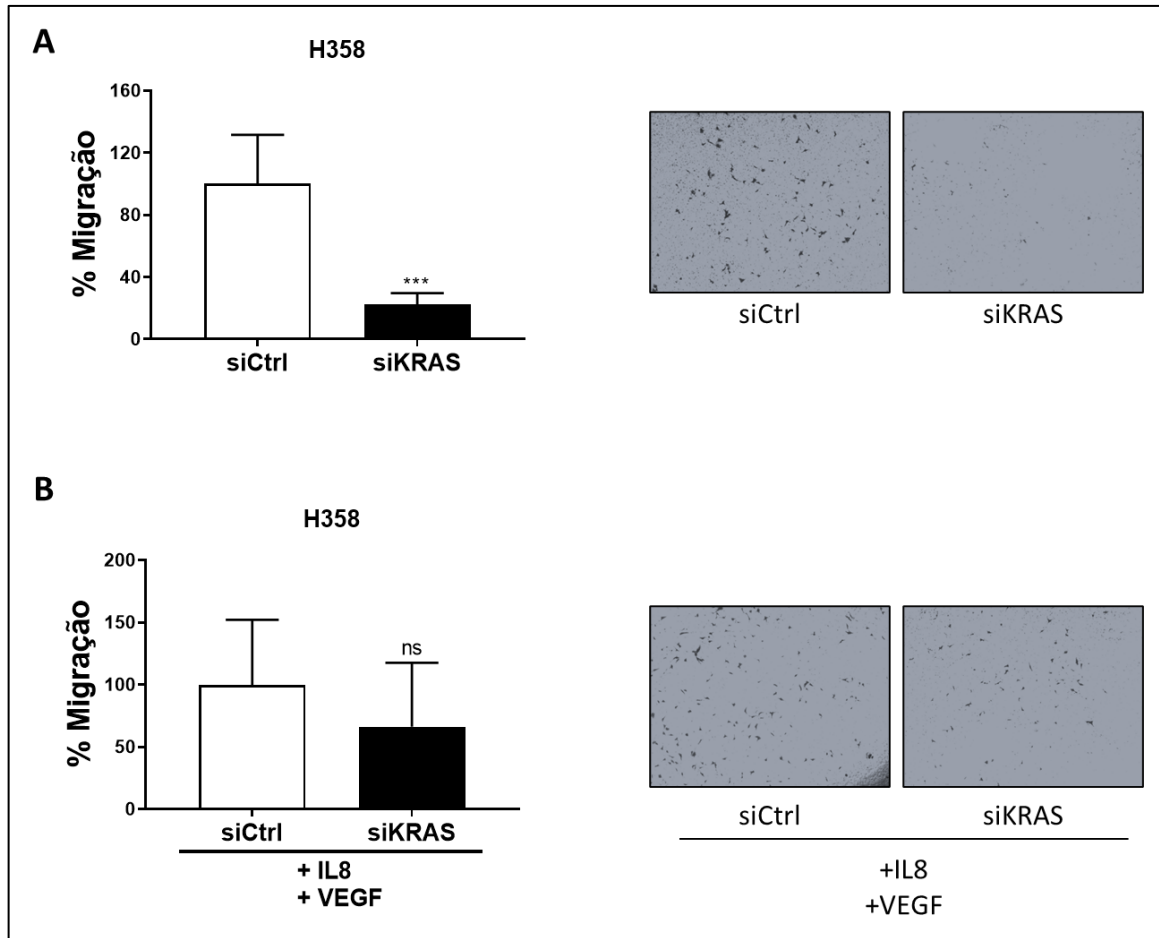


Figura 39 - A inibição da expressão de KRAS em células H358 diminui a migração de HUVEC de uma maneira dependente de VEGF/IL-8. As células H358 foram transfectadas com um siRNA de controle não direcionado (siCtrl) ou com siRNA para KRAS (siKRAS) e o meio condicionado foi coletado. O ensaio de migração *transwell* de células HUVEC foi realizado usando estes meios condicionados sem suplementação de IL8 ou VEGF (A) e com suplementação de 5 ng/ml de IL-8 e 5 ng/ml de VEGF (B). Após 24h de incubação as células presentes na parte inferior do inserto foram quantificadas. O teste estatístico *student-t* foi utilizado para análise comparativa, onde *** $p < 0,001$ comparando os grupos siCtrl e siKRAS. Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Avaliamos em seguida como a inibição de AURKA nas células tumorais H358 afeta a migração das células endoteliais HUVEC. As células A549 não foram avaliadas neste ensaio, uma vez que a inibição de AURKA não reduz a expressão de fatores pró-angiogênicos nesta linhagem (Figura 36) e que o meio condicionado de células A549 com inibição de AURKA não leva a uma redução significativa na capacidade das células HUVEC de formarem de tubos angiogênicos (Figura 38). Assim como observado para inibição de KRAS (Figura 39), nós observamos que o meio condicionado de células H358 com inibição de AURKA reduz a

capacidade migratória de células HUVEC em 68% e que a suplementação desse meio com os fatores pró-angiogênicos IL-8 ou VEGF restaura a capacidade migratória das células HUVEC.

(Figura 40).

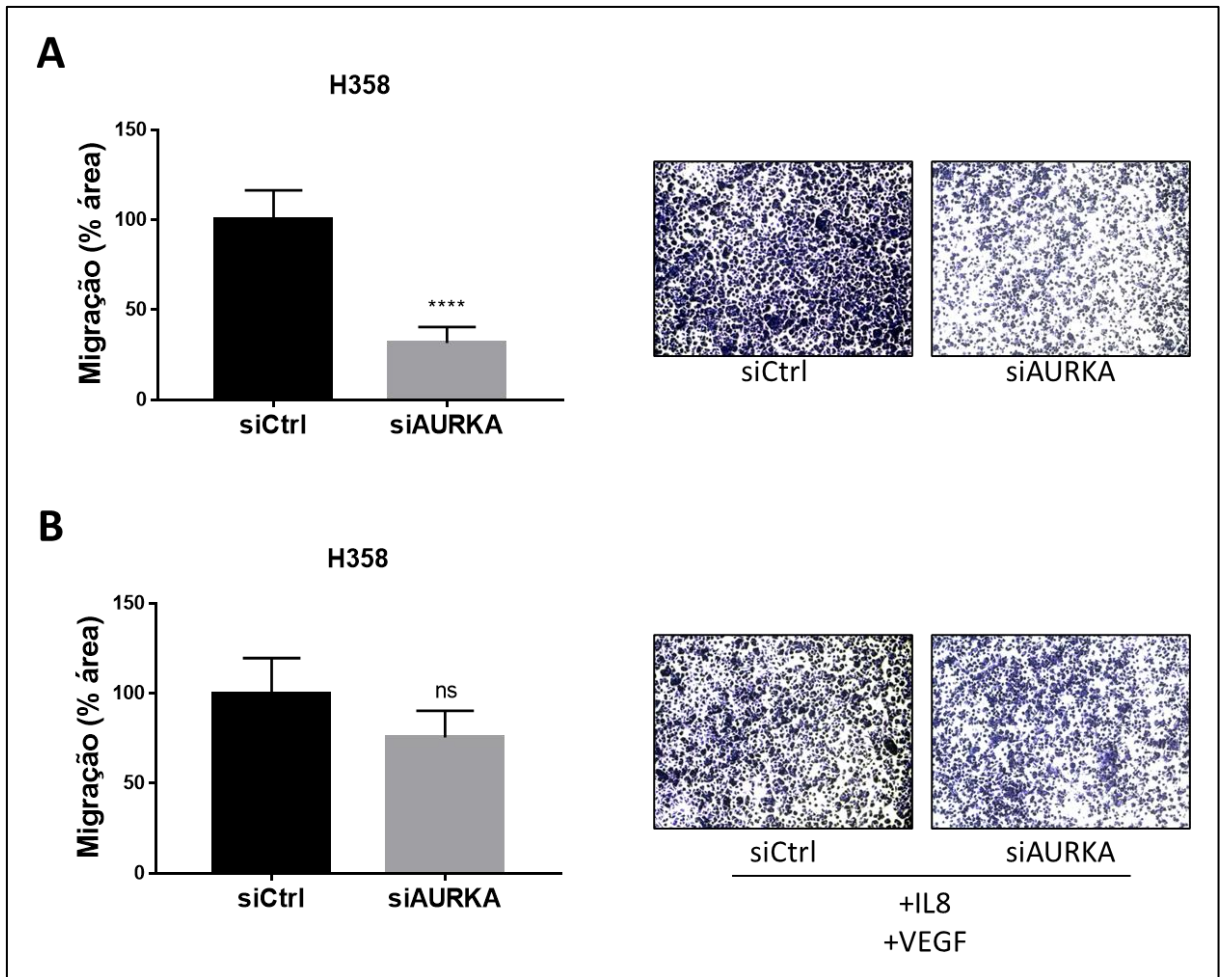


Figura 40 - Meio condicionado de células H358 com inibição de AURKA por interferência de RNA reduz a capacidade migratória das células HUVEC de maneira dependente de VEGF/IL-8 *in vitro*. As células HUVEC foram submetidas ao ensaio de migração *transwell* usando como quimioatrativo meio condicionado sem soro de células H358 transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para AURKA (siAURKA) sem suplementação de IL8 ou VEGF (**A**) e com suplementação de 5 ng/ml de IL-8 e 5 ng/ml de VEGF (**B**). Após 24h as células que migraram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. (**Esquerda**) Quantificação da área ocupada por células migratórias. Os gráficos de barras representam a média \pm 1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através teste *student-t* comparando os grupos siCtrl e siAURKA, onde **** $p < 0,0001$. (**Direita**) Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Quando analisados em conjunto, os nossos resultados mostram que a AURKA promove, em células tumorais pulmonares com ativação oncogênica de KRAS, diferentes características associadas ao fenótipo tronco tumoral, como a formação de tumoresferas, a expressão de fatores de *stemness* e EMT, migração, invasão e angiogênese. Como essas características são essenciais para a tumorigênese, disseminação metastática e recidiva tumoral, nossos resultados apontam para a AURKA como um alvo promissor a ser explorado na terapia de câncer de pulmão com ativação oncogênica de KRAS, um tipo frequente de neoplasia, que ainda não dispõe de opções terapêuticas efetivas.

5 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é o câncer que mais mata no mundo (WHO 2021) e, apesar dos avanços no desenvolvimento de novas terapias-alvo, a sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão não sofreu melhoras significativas, permanecendo abaixo de 20% em 5 anos (Sung et al. 2021; Yang et al. 2022). Uma das possíveis razões para este mau prognóstico é que a alteração molecular mais frequente no câncer de pulmão, sendo encontrada em cerca de um terço dos pacientes com adenocarcinoma pulmonar, são mutações que ativam constitutivamente a GTPase KRAS (Aran et al. 2021; Reita et al. 2022), uma oncoproteína que tem uma relação causal com a transformação maligna que conta atualmente com apenas uma terapia-alvo aprovada, seletiva para mutação KRAS^{G12C} para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) localmente avançado ou metastático com uma taxa de resposta geral de 36% avaliado em 124 pacientes até o momento (Nakajima et al. 2022).

As mutações na glicina 12 de KRAS são as mais frequentes (88%) em pacientes com câncer de pulmão. No entanto, a mutação KRAS G12C ocorre em aproximadamente 40% dos pacientes, sendo que em não fumantes essa frequência é ainda menor, de aproximadamente 18,6% (Ghimessy et al. 2020). Portanto, compreender as vias desencadeadas por KRAS que promovem o fenótipo maligno é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais efetivas e abrangentes. A maioria dos estudos desta via são focados nas vias desencadeadas por KRAS que promovem transformação maligna, proliferação celular e crescimento tumoral (Engelman et al. 2008; Dietlein et al. 2015; Manchado et al. 2016). No entanto, estudos mais recentes mostram que as formas oncogênicas da KRAS também promovem a aquisição de propriedades migratórias, invasivas e disseminação metastática (Padavano et al. 2015; von Karstedt et al. 2015; Du et al. 2020; Choi et al. 2022).

As alterações moleculares e funcionais que conferem a capacidade de disseminação metastática a uma subpopulação de células presentes na massa tumoral estão associadas a alterações no programa de expressão gênica que resultam na aquisição e manutenção de um fenótipo tronco-tumoral pelas células iniciadoras de tumor (CITs) (Visvader and Lindeman 2012), uma subpopulação de células de tumorais que exibem características de células tronco e células tumorais, sendo altamente tumorigênicas, quimiorresistentes e agressivas, sendo responsáveis por recidivas e pela disseminação metastática (Malanchi et al. 2011; Visvader and Lindeman 2012; Pattabiraman and Weinberg 2014; Shibue and Weinberg 2017).

Considerando-se que esses dois fenótipos, tronco-tumoral e metastático, estão altamente relacionados pelo padrão de expressão de genes de *stemness* e genes que promovem transição epitelial mesenquimal (EMT) (Mani et al. 2008; Shibue and Weinberg 2017; Babaei et al. 2021), não é surpreendente, então, que KRAS tenha sido implicada, tanto em promover a EMT e metástase (Chan and Chen 2012; Kim et al. 2015; Boutin et al. 2017), como em promover o fenótipo tronco-tumoral (Wang et al. 2015; Ali et al. 2016). Por exemplo, células murinas de ovário ID8 isoladas com ganho de expressão de KRAS apresentaram maior capacidade de formação de tumoresferas e alta atividade de ALDH quando comparada a população de células ID8 sem ganho de expressão de KRAS (Diaz Osterman et al. 2019). Além disso, a KRAS^{G12D} combinada com perda de p53 leva ao desenvolvimento do fenótipo tronco tumoral de células de câncer de próstata derivadas de camundongos. Análises de *microarray* identificaram que KRAS^{G12D} regula positivamente marcadores de *stemness*, como CD24, EpCAM e CD133 (Weng et al. 2019). Em modelo de câncer de pulmão, o fenótipo tronco tumoral e metastático é mediado por KRAS oncogênica, que ativa a PKC_I (proteína quinase C_I), ativando a transcrição de Notch3 através da fosforilação do fator de transcrição ELF (Ali et al. 2016). Em câncer de pâncreas, foi observado que KRAS interage diretamente com calmodulina, desta forma reduzindo a a atividade de CamKII e a expressão de Fzd8, o que promove o fenótipo tronco-

tumoral através da supressão da via não canônica de Wnt/Ca²⁺ (Wang et al. 2015). Em acordo com estes relatos nós observamos que células pulmonares que expressam a forma oncogênica da KRAS, apesar de apresentarem um aumento não significativo no número de tumoresferas formadas, formam tumoresferas com tamanho maior e com maior expressão de genes de *stemness*.

Portanto, considerando-se que a doença metastática é responsável por cerca de 90% das mortes relacionadas ao câncer (Garner and de Visser 2020), para obter terapias mais efetivas no tratamento de câncer de pulmão induzido por KRAS, se torna essencial identificar alvos de KRAS envolvidos na aquisição e manutenção do fenótipo tronco-tumoral.

O nosso grupo havia identificado anteriormente a quinase AURKA como um alvo de KRAS envolvido na transformação maligna em câncer de pâncreas e pulmão (dos Santos et al. 2016; Gomes-Filho et al. 2020) e outros estudos demonstraram um envolvimento da AURKA no fenótipo tronco-tumoral (Cammарeri et al. 2010; Chefetz et al. 2011; Mannino et al. 2014; Zheng et al. 2014, 2016). Nós resolvemos, portanto, investigar o papel da quinase Aurora A sobre o fenótipo tronco-tumoral e outras propriedades malignas associadas à metástase de células pulmonares transformadas por KRAS.

Nós observamos, em um modelo celular de adenocarcinoma pulmonar com expressão induzível de KRAS, que a AURKA inibe a formação de tumoresferas de maneira dependente da KRAS oncogênica. Além disso, usando culturas de tumoresferas seriadas das linhagens de câncer de pulmão A549 e H358 portadoras de mutações oncogênicas em *KRAS*, nós observamos que o inibidor farmacológico seletivo para AURKA (Alisertib) reduz significativamente, embora com cinética diferente entre as linhagens, a capacidade de formar tumoresferas. Estes resultados, não só corroboram nossos achados anteriores de que a AURKA é um membro importante da via acionada por KRAS (dos Santos et al. 2016; Gomes-Filho et al. 2020), mas

também apoiam a nossa hipótese de que a via KRAS-AURKA promove o fenótipo tronco-tumoral e promove a autorrenovação de CITs.

Entretanto a cinética de inibição de formação de tumoresferas nas linhagens foi diferente, sendo que na linhagem A549 observamos uma redução significativa na formação de tumoresferas em todas as passagens, enquanto na linhagem H358, uma redução significativa na formação de tumoresferas só foi observada a partir da segunda passagem. A diferença observada entre as linhagens na primeira passagem pode refletir diferença na sensibilidade destas linhagens à efeitos da inibição da AURKA não relacionados diretamente ao fenótipo tronco-tumoral. Nós mostramos que a inibição da AURKA pode causar morte celular (dos Santos et al. 2016; Gomes-Filho et al. 2020) e, na primeira passagem, logo após o tratamento com o inibidor, pode acontecer indução de morte celular de maneira inespecífica na linhagem A549, resultando em menor número de tumoresferas formadas. Já a linhagem H358 parece ser mais resistente ao efeito citotóxico do inibidor, sendo que o efeito sobre a autorrenovação das tumoresferas é observado a partir da segunda passagem.

Esta diferença na sensibilidade inicial à ação citotóxica do Alisertib pode estar relacionada ao fato de que a linhagem H358 apresenta um fenótipo tronco-tumoral mais proeminente na condição controle, sendo capaz de manter o tamanho das tumoresferas entre as passagens e apresentando menor redução no número de tumoresferas na terceira passagem. Além disso, nós observamos que a linhagem H358 apresenta maior expressão de fatores de transcrição de células tronco e uma maior atividade do repórter de células tronco SORE6-GFP. Como CITs são frequentemente quimiorresistentes (Chen et al. 2016; Guo et al. 2017; Lu et al. 2019), não é inesperado que uma linhagem que possua maior proporção de CITs e um fenótipo tronco mais proeminente seja mais resistente ao efeito citotóxico inicial do Alisertib. Consistente com a relação existente entre o fenótipo tronco tumoral e o fenótipo metastático e apoiando a nossa observação de que a linhagem H358 apresenta maior fenótipo tronco tumoral,

é interessante que a linhagem H358 é uma linhagem metastática de origem alveolar (ATCC - CRL-5807TM), diferentemente da A549 (ATCC - CCL-185TM), que tem origem de tumor primário. Além disso diferentes estudos mostram que, quando comparada à linhagem A549, a linhagem H358 tem maior expressão de características relacionadas ao fenótipo metastático, sendo estas linhagens usadas como modelos celulares de baixo e alto potencial metastático respectivamente (Lau et al. 2017; Wang et al. 2021b).

A redução observada na formação de tumoresferas terciárias nas duas linhagens também não é um achado inesperado, já que a capacidade de formação de tumoresferas é altamente variável não só entre diferentes tipos de tumor, como também entre diferentes linhagens de um mesmo tipo tumoral. Por exemplo, um estudo com diferentes linhagens de carcinoma de laringe derivadas de pacientes mostrou que algumas destas linhagens apresentam a manutenção da capacidade de formar tumoresferas ao longo de 3 passagens, enquanto outras apresentam redução desta capacidade, sendo que uma foi incapaz de formar tumoresferas secundárias e terciárias. Além disso, as linhagens de carcinoma de laringe com maior eficiência de formação de tumoresferas ao longo de passagens seriadas tem um aumento mais expressivo da expressão de genes de *stemness*, como Nanog e SOX2, assim como observamos na linhagem H358 (Kumbar et al. 2021). Um outro exemplo de variabilidade neste ensaio são as linhagens de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231, ambas metastáticas. Enquanto a linhagem MCF-7 forma tumoresferas eficientemente, a linhagem MDA-MB-231 não é capaz de formar tumoresferas (Calvet et al. 2014).

Para determinar o papel das células tronco tumorais no desenvolvimento tumoral, como na iniciação do tumor, metástase, manutenção do crescimento tumoral, quimiorresistência, entre outros, é necessário isolar estas células do restante da população tumoral. A cultura de tumoresferas, apesar de amplamente utilizada como um “*readout*” funcional da atividade tronco, não é ideal para obtenção de CITs, não só pela variabilidade discutida acima, mas

também porque o enriquecimento de células tronco tumorais neste ensaio é subótima, já que cada tumoresfera deve ser composta de CITs e de células não-CIT que se originaram das CITs por diferenciação.

Normalmente, a purificação de CITs é feita usando marcadores moleculares, frequentemente proteínas expressas na superfície celular. Embora definir o melhor marcador de células tronco tumorais seja essencial para purificar estas células, esta definição está longe de ser uma tarefa trivial. De fato, é esperado que o fenótipo tronco tumoral, assim como a expressão de marcadores de *stemness* em diferentes tipos de tumores, possam variar de acordo com diversos fatores, como o próprio meio de cultura celular, a densidade celular, a passagem, entre outros (Gilbert and Ross 2009). Além disso, a heterogeneidade tumoral também pode ser observada nas células tronco-tumorais, sendo que diferentes subpopulações de células tronco-tumorais caracterizadas por diferentes marcadores foram identificadas, sendo que, em alguns casos, estas subpopulações podem inclusive co-existir dentro de um mesmo tumor (Hermann et al. 2007; Eun et al. 2017).

Embora existam marcadores de superfície bem estabelecidos para alguns tipos de tumores, como CD133 para glioblastoma (Pavon et al. 2016; Shevchenko et al. 2019) e CD44⁺/CD24^{-low} para câncer de mama (Li et al. 2018b; Zhang et al. 2018a), esta heterogeneidade das CITs provavelmente explica a ausência de marcadores estabelecidos para várias neoplasias, incluindo câncer de pulmão, com diferentes estudos usando diferentes marcadores, algumas vezes com resultados contraditórios (Meng et al. 2009; Roudi et al. 2014; Zhang et al. 2015; Cai et al. 2019).

Para tentar identificar um marcador consistente a ser usado nas nossas linhagens nós avaliamos a expressão dos marcadores de superfície de *stemness* mais usados em câncer de pulmão e identificamos o CXCR4 como o marcador mais promissor. O CXCR4 é um receptor

de quimiocinas com importante papel no processo de metástase de diversos tipos de câncer. Para o câncer de mama, o destino metastático via CXCR4 está bem definido, incluindo tecidos como linfonodos, pulmão, fígado e medula óssea que a expressam o ligante de CXCR4, CXCL12 (Müller et al. 2001). Para o câncer de pulmão, existe uma correlação entre o aumento da expressão de CXCR4 em tumores de pacientes com doença metastática comparado com aqueles sem metástase clínica (Cavallaro 2013). Além disso, o bloqueio da ligação de CXCR4 e CXCL12 reduz a migração, invasão e adesão de células tumorais pulmonares *in vitro* (Burger et al. 2003).

Além de estar relacionado à metástase, o CXCR4 também está correlacionado com o fenótipo tronco. Células de adenocarcinoma ductal pancreático CD133+/CXCR4+ definem uma população metastática de células tronco tumorais (Hermann et al. 2007). O CXCR4 foi correlacionado com o aumento da expressão de genes de EMT e de *stemness* em células A549 CXCR4+, resistentes a gencitabina ou com indução de TGF- β 1, indicando uma correlação desse receptor com a aquisição de *stemness* em EMT (Yin et al. 2016). Além disso, células de adenocarcinoma pulmonar A549 positivas para o CXCR4 formam mais tumoresferas e mais tumores xenográficos do que as células parentais ou CXCR4- (Jung et al. 2013). A formação de tumoresferas também foi avaliada em um modelo de superexpressão de CXCR4 na linhagem A549. A superexpressão de CXCR4 levou ao aumento da formação de tumoresferas, da expressão de genes de EMT e também ao aumento da formação de tumores xenográficos em camundongos imunodeficientes, quando comparado ao modelo com silenciamento da expressão de CXCR4 em células A549 (Jäger et al. 2020).

Os nossos resultados na linhagem H358 são antagônicos aos reportados acima. Apesar das células H358 CXCR4+ apresentarem maior expressão de fatores de *stemness* e EMT, estas células não são capazes de se diferenciar em células H358 CXCR4- e tem menor capacidade de formar tumoresferas e colônias do que as células H358 CXCR4-. Estes resultados contraditórios

apoiam a ideia de que o enriquecimento de marcadores de superfície em células com fenótipo tronco varia dependendo do contexto celular, sendo que um mesmo marcador pode ter expressão oposta em CITs dependendo do tipo celular. Um exemplo é o marcador CD24, que apresenta-se diminuído em CITs de câncer de mama (Al-Hajj et al. 2003), mas aumentado em CITs pancreáticas (Lin et al. 2016), sendo, que em células A549 CD24 não pode ser utilizado para isolar células tronco tumorais, pois tanto células $CD44^+/CD24^+$ e $CD44^+/CD24^-$ apresentaram baixa eficiência de formação de tumoresferas (Roudi et al. 2014).

Devido aos obstáculos que encontramos na identificação de um marcador de superfície robusto para enriquecimento das CITs, nós resolvemos investigar formas alternativas de obter uma população enriquecida para o fenótipo tronco tumoral. Considerando a variabilidade dos marcadores de superfície, nós optamos por usar uma abordagem que permite a visualização direta e purificação de CITs com base em propriedades funcionais. Esta abordagem consistiu em usar um sistema repórter de células-tronco baseado em 6 repetições de um elemento de resposta ao Oct4/SOX2 (SORE6) encontrado no promotor de Nanog dirigindo a expressão de GFP (Tang et al. 2015). Oct4, SOX2 e Nanog são fatores de transcrição expressos em células tronco embrionárias que promovem pluripotência, autorrenovação e inibem a diferenciação (Boyer et al. 2005; Rodda et al. 2005; Pan and Thomson 2007; Rizzino and Wuebben 2016), sendo que promotores baseados em porções dos promotores de SOX2, Oct4 ou Nanog têm sido utilizados no monitoramento da reprogramação para pluripotência e estes estão elevados em CTTs (Hotta et al. 2009; Levings et al. 2009; Schmidt and Plath 2012; Swain et al. 2020). O uso deste sistema repórter foi bem sucedido em diferentes estudos para identificar CITs de câncer de mama, linfoma, câncer gástrico, câncer de próstata e condrossarcomas, que consistentemente apresentaram aumento do fenótipo tronco tumoral, da capacidade tumorigênica e de quimioresistência (Vaddi et al. 2019; Menendez et al. 2020; Pádua et al. 2020; Li et al. 2021a). Embora nós não tenhamos conseguido realizar a separação das CITs com

base neste sistema, devido aos obstáculos impostos pela pandemia do novo Coronavírus, nós geramos A549 e H358 com integração estável deste repórter e observamos, consistentemente com os nossos resultados de cultura de tumoresferas e expressão de marcadores de *stemness*, que a linhagem H358 apresenta uma maior proporção de células SORE6-GFP positivas.

Além do fenótipo tronco tumoral, também investigamos se a AURKA contribui para outras características malignas relacionadas à capacidade metastática, como migração e invasão. Primeiramente, nós observamos que células A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem capacidade migratória e invasiva aumentada, o que é acompanhado por um aumento na expressão de genes envolvidos na EMT. Estes resultados são consistentes com o fenótipo mais agressivo das CITs observado em diferentes estudos (Mani et al. 2008; Liu and Brown 2010; Acikgoz et al. 2020) e com o fato de que o fenótipo tronco está associado ao fenótipo metastático (Liu et al. 2006; Cochrane et al. 2015; Lawson et al. 2015; Kim et al. 2020).

Em seguida nós observamos que a inibição de AURKA com Alisertib nas nossas linhagens reduz a capacidade de migração e invasão, tanto da população parental, quanto em células oriundas de tumoresferas enriquecidas para CITs, sendo que na população parental esta redução foi acompanhada de uma redução na expressão de genes envolvidos na EMT. Estes resultados são apoiados por estudos que mostram que a AURKA possui um papel importante na migração e invasão em outros tipos de células tumorais (Do et al. 2014; Wu et al. 2016; Willems et al. 2019). Em células de câncer de ovário a superexpressão de AURKA resulta em um aumento da adesão e migração (Do et al. 2014). Em células de carcinoma de cabeça e pescoço, o silenciamento de AURKA inibe a fosforilação de FAK e de Akt e inibe a migração e invasão celulares (Wu et al. 2016). A inibição de AURKA com o Alisertib não só diminuiu a capacidade migratória de células de glioblastoma *in vitro*, como se mostrou essencial para promover a invasão *in vivo* (Willems et al. 2019).

Em câncer de mama observou-se que a AURKA promove o fenótipo tronco tumoral e mensesquimal pela regulação da via de Wnt mediada por Snail, um dos fatores de transcrição envolvido na EMT (Eterno et al. 2016). Outro estudo também mostrou que AURKA está envolvida na EMT e através da estabilização de Snail em células de câncer de hipofaringe (Chou et al. 2013a). Além dos dados relatados na literatura, observamos, para as duas linhagens avaliadas, que a inibição de AURKA reduziu a expressão de Snail a nível de mRNA, indicando que a AURKA regula possivelmente a expressão de Snail. Finalmente, nosso grupo demonstrou recentemente que a inibição de AURKA em células tumorais pancreáticas portadoras de KRAS oncogênico reduz a capacidade de migração dessas células, e que essa redução está correlacionada com a redução da expressão de MMP2 (Gomes-Filho et al. 2020).

Entretanto, o papel da AURKA sobre a capacidade migratória e invasiva de CITs ainda é um tema pouco explorado. Só existe um estudo recente que demonstrou que a localização nuclear e expressão de AURKA em células de câncer de mama regula positivamente o potencial metastático *in vitro* e *in vivo*, como também o fenótipo tronco tumoral (Whately et al. 2021). Os nossos resultados corroboram estes dados, sugerindo a possibilidade de que o fenótipo tronco-tumoral promovido pela AURKA contribua para promover migração, invasão e capacidade metastática.

Como a capacidade de promover angiogênese é uma característica de tumores invasivos necessária para o crescimento de tumores metastáticos e está associada com pior prognóstico clínico (Bielenberg and Zetter 2015), nós também avaliamos como a via KRAS-AURKA afeta a capacidade das células tumorais pulmonares de promover angiogênese.

O recrutamento de células endoteliais pelas células tumorais mediada por fatores pró-angiogênicos, como IL-8 e VEGF, desempenha um papel essencial na angiogênese. VEGF e IL-8 são secretados por células tumorais e atuam como quimioatrativo, induzindo a mobilidade

das células endoteliais durante a angiogênese tumoral (Lattanzio et al. 2013; Ju et al. 2017). Nosso grupo mostrou que a inibição de KRAS reduz a expressão destes fatores pela via de NF κ B/IKK β , bem como reduz a capacidade de migração das células endoteliais e a capacidade angiogênica *in vitro* e *in vivo* (Carneiro-Lobo et al. 2019). Tendo em vista que KRAS também promove a expressão de AURKA (dos Santos et al. 2016; Gomes-Filho et al. 2020), nós avaliamos se a angiogênese mediada por KRAS também pode ser promovida pela AURKA. Nós já havíamos visto que KRAS promove a expressão de IL-8 e VEGF e a formação de tubos angiogênicos nas linhagens A549 e H358 e que o meio condicionado de células A549 com inibição de KRAS reduz a migração de células HUVEC (Carneiro-Lobo et al. 2019). Neste trabalho nós confirmamos que o meio condicionado de células H358 com inibição de KRAS também reduz a migração de células HUVEC e que esta redução é resgatada pela administração de IL-8 e VEGF.

Em seguida, nós observamos que a inibição de AURKA afeta propriedades angiogênicas da linhagem H358. Nós observamos que a inibição de AURKA nesta linhagem reduz a expressão de IL-8 e VEGF e reduz a capacidade das células HUVEC de formarem tubos angiogênicos e migrarem *in vitro*, sendo que a capacidade migratória das células HUVEC é resgatada pela administração de IL-8 e VEGF. Estes resultados estão de acordo com estudos que mostram que a AURKA promove angiogênese em diferentes modelos tumorais através da regulação da expressão de VEGF. Por exemplo, a inibição da AURKA diminui a expressão de VEGF em células de neuroblastoma e a capacidade de células HUVEC de formarem vasos *in vitro* (Romain et al. 2014). Além disso, a via TPX2-AURKA aumenta a expressão de VEGFA, promovendo a capacidade angiogênica de células tumorais de bexiga, sendo que a inibição de AURKA ou TPX2 reduz o acúmulo de CD31 e VEGFA e a capacidade de migração, invasão e formação de tubos das células endoteliais (Li et al. 2021b). No entanto, a regulação de IL-8 no processo de angiogênese mediada por AURKA não foi explorado na literatura até o momento,

sendo este o primeiro relato de que AURKA possivelmente regula este processo via IL-8 e VEGF.

Por outro lado, nós observamos que a inibição da AURKA não afeta as propriedades angiogênicas da linhagem A549. O fato da inibição da AURKA afetar a capacidade angiogênica apenas da linhagem H358, que possui fenótipo tronco aumentado, sugere que a capacidade angiogênica está correlacionada ao fenótipo tronco. Estes resultados são apoiados por estudos que mostram uma correlação entre estes dois fenótipos (Bao et al. 2006; Yao et al. 2008; Ciccone et al. 2018).

Em conclusão, neste trabalho nós demos continuidade à caracterização da AURKA como um alvo terapêutico para câncer de pulmão com ativação oncogênica de KRAS. Acrescentando ao papel já descrito da AURKA para transformação maligna, proliferação celular e crescimento tumoral pulmonares (dos Santos et al. 2016), nós mostramos aqui que a AURKA promove o fenótipo tronco-tumoral, migração, invasão e angiogênese em células tumorais pulmonares com ativação de KRAS, características intimamente relacionadas à aquisição de capacidade metastática e pior sobrevida (Bielenberg and Zetter 2015; Liu et al. 2020; Liang et al. 2021; Zhao et al. 2021). Ainda que estas características não sejam uniformes nas células analisadas, nós observamos que as células com fenótipo mais agressivo são mais sensíveis à inibição de AURKA, sugerindo que a inibição desta quinase pode ser uma estratégia terapêutica adjuvante promissora a ser explorada na terapia de tumores pulmonares com ativação oncogênica de KRAS. Ao inibir as características relacionadas ao fenótipo tronco-tumoral de CITs, a inibição de AURKA tem o potencial de diminuir a disseminação metastática e a ocorrência de recidivas e, desta forma, ter um impacto terapêutico significativo.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos tirar as seguintes conclusões:

1. A KRAS oncogênica promove a expressão de genes de *stemness* em células tumorais pulmonares e a AURKA inibe a formação de tumoresferas de maneira dependente de KRAS.

2. A inibição de AURKA também reduz a expressão de genes de *stemness* e inibe a autorrenovação de CITs em linhagens pulmonares portadoras de mutação em KRAS.

3. Os marcadores de superfície de células tronco CD24, CD44, CD90, CD326 e CXCR4 não foram consistentes em identificar CITs em linhagens pulmonares, sendo que o sistema repórter SORE6-GFP parece ser promissor para essa seleção, especialmente para a linhagem H358;

4. Podemos observar ainda que a linhagem H358 possui um maior fenótipo tronco-tumoral comparada com a A549, visto que essa linhagem tem maior expressão de genes de *stemness*, maior capacidade de autorrenovação de CITs em passagens seriadas e maior proporção de células SORE6-GFP positivas;

5. As linhagens A549 e H358 oriundas de tumoresferas possuem maior fenótipo migratório e invasivo *in vitro* comparadas com as células parentais aderentes e a inibição de AURKA nestas linhagens reduz a expressão de genes relacionados à EMT e reduz a migração e invasão tanto das células parentais quanto das oriundas de tumoresferas;

5. A inibição de AURKA nas células H358 reduz a expressão dos fatores pró-angiogênicos VEGF e IL-8 e diminui capacidade das mesmas de induzirem a migração de células endoteliais e a de formação tubos angiogênicos *in vitro*.

6. A AURKA é um alvo terapêutico promissor a ser explorado na terapia de tumores pulmonares com ativação oncogênica de KRAS, sendo que a sua inibição tem o potencial de diminuir a disseminação metastática e a ocorrência de recidivas e, desta forma, de ter um impacto significativo sobre o prognóstico clínico.

7 REFERÊNCIAS

- Abbott BL. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol.* 2003 Sep;21(3):115–30.
- Abdoli Shadbad M, Hosseinkhani N, Asadzadeh Z, Derakhshani A, Karim Ahangar N, Hemmat N, et al. A Systematic Review to Clarify the Prognostic Values of CD44 and CD44+CD24- Phenotype in Triple-Negative Breast Cancer Patients: Lessons Learned and The Road Ahead. *Front Oncol.* 2021 Aug 9;11.
- Acikgoz E, Tatar C, Oktem G. Triptolide inhibits CD133 + /CD44 + colon cancer stem cell growth and migration through triggering apoptosis and represses epithelial-mesenchymal transition via downregulating expressions of snail, slug, and twist. *J Cell Biochem.* 2020 Jun;121(5–6):3313–24.
- Adjei AA, Mauer A, Bruzek L, Marks RS, Hillman S, Geyer S, et al. Phase II Study of the Farnesyl Transferase Inhibitor R115777 in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2003 May 1;21(9):1760–6.
- Akhtar N, Bansal JG. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer.* 2017 Sep;41(5):328–39.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983–3988.
- Alexiou D, Karayiannakis A., Syrigos K., Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, et al. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer.* 2001 Dec;37(18):2392–7.
- Ali SA, Justilien V, Jamieson L, Murray NR, Fields AP. Protein Kinase C γ Drives a NOTCH3-dependent Stem-like Phenotype in Mutant KRAS Lung Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2016 Mar;29(3):367–78.
- Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biol.* 2014 Sep 8;35(9):8483–523.
- American Cancer Society. Lung Cancer Survival Rates [Internet]. Early Detection, Diagnosis, and Staging. 2021. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
- Aran V, Zalis M, Montella T, de Sousa CAM, Ferrari BL, Gil Ferreira C. Evaluation of KRAS Concomitant Mutations in Advanced Lung Adenocarcinoma Patients. *Medicina (B Aires).* 2021 Sep 29;57(10):1039.
- Arasada RR, Amann JM, Rahman MA, Huppert SS, Carbone DP. EGFR Blockade Enriches for Lung Cancer Stem-like Cells through Notch3-Dependent Signaling. *Cancer Res.* 2014 Oct 1;74(19):5572–84.
- Babaei G, Aziz SG-G, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jan;133:110909.
- Bajaj J, Diaz E, Reya T. Stem cells in cancer initiation and progression. *J Cell Biol.* 2020 Jan 6;219(1).

- Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, et al. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res.* 2006 Aug 15;66(16):7843–8.
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 2009 Jan 17;457(7229):608–11.
- Baudino T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol.* 2015 Jul 22;12(1):3–20.
- Bernhardt EB, Jalal SI. Small Cell Lung Cancer. In: Reckamp KL, editor. *Lung Cancer.* Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 301–22.
- Bielenberg DR, Zetter BR. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J.* 2015 Jul;21(4):267–73.
- Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature.* 2014 Jul 10;511(7508):246–50.
- Boutin AT, Liao W-T, Wang M, Hwang SS, Karpinets T V., Cheung H, et al. Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes Dev.* 2017 Feb 15;31(4):370–82.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2005 Sep;122(6):947–56.
- Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST, Peng L, Davis PF, Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg.* 2016 Apr 15;3.
- Brady AK, McNeill JD, Judy B, Bauml J, Evans TL, Cohen RB, et al. Survival outcome according to KRAS mutation status in newly diagnosed patients with stage IV non-small cell lung cancer treated with platinum doublet chemotherapy. *Oncotarget.* 2015;6(30):30287–94.
- Buday L, Vas V. Novel regulation of Ras proteins by direct tyrosine phosphorylation and dephosphorylation. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Dec 16;39(4):1067–73.
- Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Gräff A, Silberstein LE, Fujii N, et al. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene.* 2003 Nov 6;22(50):8093–101.
- Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):27.
- Cai H, Lu W, Zhang Y, Liu H, Wang Z, Shen Y. Specific inhibition of Notch1 signaling suppresses properties of lung cancer stem cells. *J Cancer Res Ther.* 2019;15(7):1547.
- Calvet CY, André FM, Mir LM. The Culture of Cancer Cell Lines as Tumorspheres Does Not Systematically Result in Cancer Stem Cell Enrichment. Hjelmeland AB, editor. *PLoS One.* 2014 Feb 24;9(2):e89644.
- Cammareri P, Scopelliti A, Todaro M, Eterno V, Francescangeli F, Moyer MP, et al. Aurora-a is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010;70(11):4655–65.
- Carmeliet P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology.* 2005;69(3):4–

- 10.
- Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of Aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Nov;4(11):842–54.
- Carneiro-Lobo TC, Scalabrini LC, Magalhães L da S, Cardeal LB, Rodrigues FS, Santos EO dos, et al. IKK β targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: a potential anti-angiogenic therapeutic target. *Lung Cancer.* 2019;130:169–78.
- Cavallaro S. CXCR4/CXCL12 in Non-Small-Cell Lung Cancer Metastasis to the Brain. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 15;14(1):1713–27.
- Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 10;108(19):7950–5.
- Chan P-C, Chen H-C. p120RasGAP-Mediated Activation of c-Src Is Critical for Oncogenic Ras to Induce Tumor Invasion. *Cancer Res.* 2012;72(9):2405–15.
- Chefetz I, Holmberg JC, Alvero AB, Visintin I, Mor G. Inhibition of Aurora-A kinase induces cell cycle arrest in epithelial ovarian cancer stem cells by affecting NF κ B pathway. *Cell Cycle.* 2011;10(13):2206–14.
- Chen C-L, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* 2016 Jan;23(1):206–19.
- Chen C, Song G, Xiang J, Zhang H, Zhao S, Zhan Y. AURKA promotes cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr;486(2):514–20.
- Chen G, Zhou Z, Jin J, Zhou Y, Liu Y, Wang W. CXCR4 is a prognostic marker that inhibits the invasion and migration of gastric cancer by regulating VEGF expression. *Oncol Lett.* 2021 Jun 4;22(2):587.
- Chen S, Li X, Lu D, Xu Y, Mou W, Wang L, et al. SOX2 regulates apoptosis through MAP4K4-Survivin signaling pathway in human lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2014 Mar;35(3):613–23.
- Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):269–309.
- Choi S-H, Kim JK, Chen C-T, Wu C, Marco MR, Barriga FM, et al. KRAS Mutants Upregulate Integrin β 4 to Promote Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Res.* 2022 Apr 26;OF1–15.
- Chou C-H, Yang N-K, Liu T-Y, Tai S-K, Hsu DS-S, Chen Y-W, et al. Chromosome Instability Modulated by BMI1–AURKA Signaling Drives Progression in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2013a Jan 15;73(2):953–66.
- Chou Y-T, Lee C-C, Hsiao S-H, Lin S-E, Lin S-C, Chung C-H, et al. The Emerging Role of SOX2 in Cell Proliferation and Survival and Its Crosstalk with Oncogenic Signaling in Lung Cancer. *Stem Cells.* 2013b Dec;31(12):2607–19.
- Chuang T-P, Wang J-Y, Jao S-W, Wu C-C, Chen J-H, Hsiao K-H, et al. Over-expression of AURKA, SKA3 and DSN1 contributes to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Oncotarget.* 2016 Jul 19;7(29):45803–18.
- Ciccione V, Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Morbidelli L, Ziche M. Stemness marker

- ALDH1A1 promotes tumor angiogenesis via retinoic acid/HIF-1 α /VEGF signalling in MCF-7 breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Dec 12;37(1):311.
- Cochrane C, Szczepny A, Watkins D, Cain J. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2015 Aug 11;7(3):1554–85.
- Cohen SJ, Ho L, Ranganathan S, Abbruzzese JL, Alpaugh RK, Beard M, et al. Phase II and Pharmacodynamic Study of the Farnesyltransferase Inhibitor R115777 as Initial Therapy in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2003 Apr 1;21(7):1301–6.
- Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):828–51.
- Dar AA, Belkhiri A, El-Rifai W. The aurora kinase A regulates GSK-3 β in gastric cancer cells. *Oncogene*. 2009 Feb 8;28(6):866–75.
- Das B, Pal B, Bhuyan R, Li H, Sarma A, Gayan S, et al. MYC Regulates the HIF2 α Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Res*. 2019 Aug 15;79(16):4015–25.
- Das PK, Pillai S, Rakib MA, Khanam JA, Gopalan V, Lam AKY, et al. Plasticity of Cancer Stem Cell: Origin and Role in Disease Progression and Therapy Resistance. *Stem Cell Rev Reports*. 2020 Apr 21;16(2):397–412.
- Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*. 2017 Jan;151(1):193–203.
- Diaz Osterman CJ, Ozmadenci D, Kleinschmidt EG, Taylor KN, Barrie AM, Jiang S, et al. FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *Elife*. 2019 Sep 3;8.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):780–3.
- Dietlein F, Kalb B, Jokic M, Noll EM, Strong A, Tharun L, et al. A Synergistic Interaction between Chk1- and MK2 Inhibitors in KRAS-Mutant Cancer. *Cell*. 2015 Jul;162(1):146–59.
- Do T-V, Xiao F, Bickel LE, Klein-Szanto AJ, Pathak HB, Hua X, et al. Aurora kinase A mediates epithelial ovarian cancer cell migration and adhesion. *Oncogene*. 2014 Jan 21;33(5):539–49.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer; 2003. p. 11–22.
- Du F, Cao T, Xie H, Li T, Sun L, Liu H, et al. KRAS Mutation-Responsive miR-139-5p inhibits Colorectal Cancer Progression and is repressed by Wnt Signaling. *Theranostics*. 2020;10(16):7335–50.
- End DW, Smets G, Todd A V, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P, et al. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 2001 Jan 1;61(1):131–7.
- Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med*. 2008 Dec 30;14(12):1351–6.

- Esteban-Villarrubia J, Soto-Castillo JJ, Pozas J, San Román-Gil M, Orejana-Martín I, Torres-Jiménez J, et al. Tyrosine Kinase Receptors in Oncology. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 12;21(22):8529.
- Eterno V, Zambelli A, Villani L, Tuscano A, Manera S, Spitaleri A, et al. AurkA controls self-renewal of breast cancer-initiating cells promoting wnt3a stabilization through suppression of miR-128. *Sci Rep*. 2016 Jun 24;6(1):28436.
- Eun K, Ham SW, Kim H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep*. 2017 Mar;50(3):117–25.
- Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, Lenczowski JM, Tichelaar JW, Lizak MJ, et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev*. 2001;15(24):3249–62.
- Fleming JB, Shen G-L, Holloway SE, Davis M, Brekken RA. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. *Mol Cancer Res*. 2005;3(7):413–23.
- Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2005;1756(2):127–44.
- Gálvez BG, Matías-Román S, Yáñez-Mó M, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. ECM regulates MT1-MMP localization with $\beta 1$ or $\alpha \beta 3$ integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol*. 2002 Nov 11;159(3):509–21.
- Gao D, Joshi N, Choi H, Ryu S, Hahn M, Catena R, et al. Myeloid Progenitor Cells in the Premetastatic Lung Promote Metastases by Inducing Mesenchymal to Epithelial Transition. *Cancer Res*. 2012 Mar 15;72(6):1384–94.
- Garg M. Epithelial plasticity and cancer stem cells: Major mechanisms of cancer pathogenesis and therapy resistance. *World J Stem Cells*. 2017;9(8):118.
- Garner H, de Visser KE. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. *Nat Rev Immunol*. 2020 Aug 5;20(8):483–97.
- Ghimessy A, Radeckzy P, Laszlo V, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Fillinger J, et al. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Dec 16;39(4):1159–77.
- Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. 2021;12(9):2735–46.
- Gilbert CA, Ross AH. Cancer stem cells: Cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*. 2009 Dec 1;108(5):1031–8.
- Goldenson B, Crispino JD. The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*. 2015;34(5):537–45.
- Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP, Witte ON. Identification of a Cell of Origin for Human Prostate Cancer. *Science* (80-). 2010;329(5991):568–71.
- Gomes-Filho SM, dos Santos EO, Bertoldi ERM, Scalabrini LC, Heidrich V, Dazzani B, et al. Aurora A kinase and its activator TPX2 are potential therapeutic targets in KRAS-induced pancreatic cancer. *Cell Oncol*. 2020 Jun 19;43(3):445–60.
- Goto S, Kawabata T, Li T-S. Enhanced Expression of ABCB1 and Nrf2 in CD133-Positive Cancer Stem Cells Associates with Doxorubicin Resistance. *Stem Cells Int*. 2020 Aug

- 12;2020:1–13.
- Grigorenko BL, Kots ED, Nemukhin A V. Diversity of mechanisms in Ras–GAP catalysis of guanosine triphosphate hydrolysis revealed by molecular modeling. *Org Biomol Chem*. 2019;17(19):4879–91.
- Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, Garbe Y, Alison MR, Corbeil D, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol*. 2013 Feb;229(3):355–78.
- Guerrero S, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Mangués R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*. 2000 Dec 1;60(23):6750–6.
- Guo L, Zheng P, Fan H, Wang H, Xu W, Zhou W. Ultrasound reverses chemoresistance in breast cancer stem cell like cells by altering ABCG2 expression. *Biosci Rep*. 2017 Dec 22;37(6).
- Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*. 2019 Jan;24(1):65–78.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. Vol. 102, *British Journal of Cancer*. Br J Cancer; 2010. p. 789–95.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):313–23.
- Ho S-Y, Ling T-Y, Lin H-Y, Liou JT-J, Liu F-C, Chen I-C, et al. SDF-1/CXCR4 Signaling Maintains Stemness Signature in Mouse Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1–14.
- Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. Vol. 25, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2013. p. 254–64.
- Hotta A, Cheung AYL, Farra N, Vijayaragavan K, Séguin CA, Draper JS, et al. Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):370–6.
- Huang T, Song X, Xu D, Tiek D, Goenka A, Wu B, et al. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics*. 2020;10(19):8721–43.
- Hwang J, Yoon J, Cho Y, Cha P, Park J, Choi K. A mutant KRAS-induced factor REG4 promotes cancer stem cell properties via Wnt/ β -catenin signaling. *Int J Cancer*. 2020 May 15;146(10):2877–90.
- Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, et al. Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *J Transl Med*. 2011 Dec 30;9(1):100.
- INCA. Atlas de Mortalidade por Câncer [Internet]. Instituto Nacional de Câncer. [cited 2021 Oct 8]. Available from: <https://www.inca.gov.br/aplicativos/atlas-de-mortalidade-por-cancer>
- INCA. Dados e números da prevalência do tabagismo [Internet]. Instituto Nacional de Câncer

- Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco. 2021a. Available from: <https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/dados-e-numeros-prevalencia-tabagismo#:~:text=Segundo dados do Vigitel 2020,7%2C6 %25 entre mulheres.>
- INCA. Estatísticas de câncer [Internet]. Instituto Nacional de Câncer - Causas e Prevenção. 2021b [cited 2021 Sep 8]. Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
- Jäger B, Klatt D, Plappert L, Golpon H, Lienenklaus S, Barbosa PD, et al. CXCR4/MIF axis amplifies tumor growth and epithelial-mesenchymal interaction in non-small cell lung cancer. *Cell Signal*. 2020 Sep;73:109672.
- Janeček M, Rossmann M, Sharma P, Emery A, Huggins DJ, Stockwell SR, et al. Allosteric modulation of AURKA kinase activity by a small-molecule inhibitor of its protein-protein interaction with TPX2. *Sci Rep*. 2016 Sep 24;6(1):28528.
- Jeng Y-M, Peng S-Y, Lin C-Y, Hsu H-C. Overexpression and Amplification of Aurora-A in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15;10(6):2065–71.
- Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, et al. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 26;108(30):12425–30.
- Jo P, Bernhardt M, Nietert M, König A, Azizian A, Schirmer MA, et al. KRAS mutation status concordance between the primary tumor and the corresponding metastasis in patients with rectal cancer. *Deb S*, editor. *PLoS One*. 2020 Oct 1;15(10):e0239806.
- Ju L, Zhou Z, Jiang B, Lou Y, Guo X. Autocrine VEGF and IL-8 Promote Migration via Src/Vav2/Rac1/PAK1 Signaling in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(4):1346–59.
- Jung M-J, Rho J-K, Kim Y-M, Jung JE, Jin YB, Ko Y-G, et al. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene*. 2013 Jan 10;32(2):209–21.
- Karabulut S, Tas F, Tastekin D, Karabulut M, Yasasever CT, Ciftci R, et al. The diagnostic, predictive, and prognostic role of serum epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels in breast cancer. *Tumor Biol*. 2014 Sep 3;35(9):8849–60.
- von Karstedt S, Conti A, Nobis M, Montinaro A, Hartwig T, Lemke J, et al. Cancer Cell-Autonomous TRAIL-R Signaling Promotes KRAS-Driven Cancer Progression, Invasion, and Metastasis. *Cancer Cell*. 2015 Apr;27(4):561–73.
- Kim BR, Na YJ, Kim JL, Jeong YA, Park SH, Jo MJ, et al. RUNX3 suppresses metastasis and stemness by inhibiting Hedgehog signaling in colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2020 Feb 5;27(2):676–94.
- Kim R-K, Suh Y, Yoo K-C, Cui Y-H, Kim H, Kim M-J, et al. Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. *Exp Mol Med*. 2015 Jan 30;47(1):e137–e137.
- Kim RJ, Kim SR, Roh KJ, Park SB, Park JR, Kang KS, et al. Ras activation contributes to the maintenance and expansion of Sca-1^{pos} cells in a mouse model of breast cancer. *Cancer Lett*. 2010 Jan 28;287(2):172–81.
- Kim Y, Kumar S. CD44-Mediated Adhesion to Hyaluronic Acid Contributes to Mechanosensing and Invasive Motility. *Mol Cancer Res*. 2014 Oct 1;12(10):1416–29.

- Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajduch M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008;152(1):27–33.
- Kumbar V, Muddapur U, Bhat K, Shwetha H, Kugaji M, Peram M, et al. Cancer stem cell traits in tumor spheres derived from primary laryngeal carcinoma cell lines. *Contemp Clin Dent.* 2021;12(3):247.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar 21;15(3):178–96.
- Landen CN, Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, et al. Overexpression of the Centrosomal Protein Aurora-A Kinase is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 15;13(14):4098–104.
- Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP, et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest.* 2016 Sep 1;126(9):3219–35.
- Lattanzio L, Tonissi F, Torta I, Gianello L, Russi E, Milano G, et al. Role of IL-8 induced angiogenesis in uveal melanoma. *Invest New Drugs.* 2013 Oct 1;31(5):1107–14.
- Lau WH, Zhu XG, Ho SWT, Chang SC, Ding JL. Combinatorial treatment with polyI:C and anti-IL6 enhances apoptosis and suppresses metastasis of lung cancer cells. *Oncotarget.* 2017 May 16;8(20):32884–904.
- Lawson DA, Bhakta NR, Kessenbrock K, Prummel KD, Yu Y, Takai K, et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature.* 2015 Oct 1;526(7571):131–5.
- Leon G, MacDonagh L, Finn SP, Cuffe S, Barr MP. Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacol Ther.* 2016 Feb;158:71–90.
- Leung L, Radulovich N, Zhu C-Q, Wang D, To C, Ibrahimov E, et al. Loss of Canonical Smad4 Signaling Promotes KRAS Driven Malignant Transformation of Human Pancreatic Duct Epithelial Cells and Metastasis. *PLoS One.* 2013;8(12):e84366.
- Levings PP, McGarry S V, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC, et al. Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5648–55.
- Levinson NM. The multifaceted allosteric regulation of Aurora kinase A. *Biochem J.* 2018 Jun 29;475(12):2025–42.
- Li D, Zhu J, Firozi PF, Abbruzzese JL, Evans DB, Cleary K, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(3):991–7.
- Li J, Haque M, Shang C, Hassan B, Liu D, Chen W, et al. Identification and Characterization of Cancer Stem-Like Cells in ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma Using the SORE6 Reporter. *Curr Issues Mol Biol.* 2021a Jul 2;43(2):543–57.
- Li T, Chen Y, Zhang J, Liu S. LncRNA TUG1 promotes cells proliferation and inhibits cells apoptosis through regulating AURKA in epithelial ovarian cancer cells. *Medicine (Baltimore).* 2018a Sep;97(36):e12131.

- Li X, Wei Z, Yu H, Xu Y, He W, Zhou X, et al. Secretory autophagy-induced bladder tumour-derived extracellular vesicle secretion promotes angiogenesis by activating the TPX2-mediated phosphorylation of the AURKA-PI3K-AKT axis. *Cancer Lett.* 2021b Dec;523:10–28.
- Li X, Zhou N, Wang J, Liu Z, Wang X, Zhang Q, et al. Quercetin suppresses breast cancer stem cells (CD44 + /CD24 –) by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway. *Life Sci.* 2018b Mar;196:56–62.
- Liang J, Oyang L, Rao S, Han Y, Luo X, Yi P, et al. Rac1, A Potential Target for Tumor Therapy. *Front Oncol.* 2021 May 17;11.
- Lim SK, Gopalan G. Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway. *Biochem J.* 2007 Apr 1;403(1):119–27.
- Lin L, Jou D, Wang Y, Ma H, Liu T, Fuchs J, et al. STAT3 as a potential therapeutic target in ALDH+ and CD44+/CD24+ stem cell-like pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2016 Dec;49(6):2265–74.
- Liu J, Brown RE. Immunohistochemical detection of epithelialmesenchymal transition associated with stemness phenotype in anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010;3(8):755–62.
- Liu M, Casimiro MC, Wang C, Shirley LA, Jiao X, Katiyar S, et al. p21CIP1 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(45):19035–9.
- Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports.* 2014 Jan;2(1):78–91.
- Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn N, Jackson KW, et al. Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells. *Cancer Res.* 2006 Jun 15;66(12):6063–71.
- Liu Y-C, Yeh C-T, Lin K-H. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. *Cells.* 2020 May 26;9(6):1331.
- Liu Y-P, Yang C-J, Huang M-S, Yeh C-T, Wu ATH, Lee Y-C, et al. Cisplatin Selects for Multidrug-Resistant CD133 + Cells in Lung Adenocarcinoma by Activating Notch Signaling. *Cancer Res.* 2013 Jan 1;73(1):406–16.
- Liu Y, Wang D, Zhou M, Chen H, Wang H, Min J, et al. The KRAS/Lin28B axis maintains stemness of pancreatic cancer cells via the let-7i/TET3 pathway. *Mol Oncol.* 2021 Jan 28;15(1):262–78.
- Lo HC, Xu Z, Kim IS, Pingel B, Aguirre S, Kodali S, et al. Resistance to natural killer cell immunosurveillance confers a selective advantage to polyclonal metastasis. *Nat Cancer.* 2020 Jul 1;1(7):709–22.
- Lock R, Kenific CM, Leidal AM, Salas E, Debnath J. Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov.* 2014;4(4):466–79.
- Loh C-Y, Chai J, Tang T, Wong W, Sethi G, Shanmugam M, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells.* 2019 Sep 20;8(10):1118.

- Long Q, An X, Chen M, Wang N, Sui S, Li Y, et al. PUF60/AURKA Axis Contributes to Tumor Progression and Malignant Phenotypes in Bladder Cancer. *Front Oncol.* 2020 Oct 7;10.
- Lu H, Ju D, Yang G, Zhu L, Yang X, Li J, et al. Targeting cancer stem cell signature gene SMOC-2 Overcomes chemoresistance and inhibits cell proliferation of endometrial carcinoma. *EBioMedicine.* 2019 Feb;40:276–89.
- Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol.* 2002;192(2):125–30.
- Maiuthed A, Chantarawong W, Chanvorachote P. Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds. *Anticancer Res.* 2018 Jul 3;38(7):3797–809.
- Majidpoor J, Mortezaee K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol.* 2021 Jan 4;38(1):3.
- Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr H-A, Delaloye J-F, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature.* 2011 Dec 7;481(7379):85–9.
- Malumbres M, Pérez De Castro I. Aurora kinase A inhibitors: Promising agents in antitumoral therapy. Vol. 18, *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* Informa Healthcare; 2014. p. 1377–93.
- Manchado E, Weissmueller S, Morris JP, Chen C-C, Wullenkord R, Lujambio A, et al. A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer. *Nature.* 2016 Jun 30;534(7609):647–51.
- Mani C, Reddy PH, Palle K. DNA repair fidelity in stem cell maintenance, health, and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2020 Apr;1866(4):165444.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* 2008 May 16;133(4):704–15.
- Manjunath Y, Upparahalli S V., Avella DM, Deroche CB, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, et al. PD-L1 Expression with Epithelial Mesenchymal Transition of Circulating Tumor Cells Is Associated with Poor Survival in Curatively Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Jun 11;11(6):806.
- Mannino M, Gomez-Roman N, Hochegger H, Chalmers AJ. Differential sensitivity of Glioma stem cells to Aurora kinase A inhibitors: implications for stem cell mitosis and centrosome dynamics. *Stem Cell Res.* 2014;13(1):135–43.
- Martin D, Galisteo R, Gutkind JS. CXCL8/IL8 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and the Autocrine Activation of VEGFR2 in Endothelial Cells by Activating NFκB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) Complex. *J Biol Chem.* 2009 Mar;284(10):6038–42.
- Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E, et al. Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells. *J Biol Chem.* 2003 Dec;278(51):51786–95.
- Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005;92(1):131–9.
- Mather JP, Roberts PE, Pan Z, Chen F, Hooley J, Young P, et al. Isolation of Cancer Stem Like

- Cells from Human Adenosquamous Carcinoma of the Lung Supports a Monoclonal Origin from a Multipotential Tissue Stem Cell. Fields AP, editor. PLoS One. 2013 Dec 4;8(12):e79456.
- Melzer C, von der Ohe J, Lehnert H, Ungefroren H, Hass R. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. *Mol Cancer*. 2017 Dec 1;16(1):28.
- Menendez ST, Rey V, Martinez-Cruzado L, Gonzalez MV, Morales-Molina A, Santos L, et al. SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 13;12(4):964.
- Meng X, Li M, Wang X, Wang Y, Ma D. Both CD133 + and CD133 – subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 2009 Jun;100(6):1040–6.
- Meraldi P. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J*. 2002 Feb 15;21(4):483–92.
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling Interplay in Ras Superfamily Function. *Curr Biol*. 2005;15(14):R563–74.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar;410(6824):50–6.
- Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci*. 2019 Oct;234:116781.
- Nakajima EC, Drezner N, Li X, Mishra-Kalyani PS, Liu Y, Zhao H, et al. FDA Approval Summary: Sotorasib for KRAS G12C -Mutated Metastatic NSCLC. *Clin Cancer Res*. 2022 Apr 14;28(8):1482–6.
- Nian W-Q, Chen F-L, Ao X-J, Chen Z-T. CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line have cancer metastatic stem cell characteristics. *Mol Cell Biochem*. 2011 Sep 7;355(1–2):241–8.
- Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Golemis EA. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(4):661–87.
- Ochi T, Fujiwara H, Suemori K, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, et al. Aurora-A kinase: a novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):66–74.
- Ogawa E, Takenaka K, Katakura H, Adachi M, Otake Y, Toda Y, et al. Perimembrane Aurora-A Expression is a Significant Prognostic Factor in Correlation with Proliferative Activity in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Ann Surg Oncol*. 2008 Feb 28;15(2):547–54.
- Okada M, Shibuya K, Sato A, Seino S, Suzuki S, Seino M, et al. Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation. *Oncotarget*. 2014;5(13):5100–12.
- Padavano J, Henkhaus RS, Chen H, Skovan BA, Cui H, Ignatenko NA. Mutant K-RAS Promotes Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer through GTPase Signaling Pathways. *Cancer Growth Metastasis*. 2015 Jan 19;8s1:CGM.S29407.
- Pádua D, Barros R, Amaral AL, Mesquita P, Freire AF, Sousa M, et al. A SOX2 Reporter System Identifies Gastric Cancer Stem-Like Cells Sensitive to Monensin. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 20;12(2):495.
- Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*. 2007 Jan 9;17(1):42–9.

- Park JT, Johnson N, Liu S, Levesque M, Wang YJ, Ho H, et al. Differential in vivo tumorigenicity of diverse KRAS mutations in vertebrate pancreas: A comprehensive survey. *Oncogene*. 2015 May 28;34(21):2801–6.
- Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497–512.
- Pavon LF, Sibov TT, de Oliveira DM, Marti LC, Cabral FR, de Souza JG, et al. Mesenchymal stem cell-like properties of CD133+ glioblastoma initiating cells. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):40546–57.
- Peng F, Xu J, Cui B, Liang Q, Zeng S, He B, et al. Oncogenic AURKA-enhanced N6-methyladenosine modification increases DROSHA mRNA stability to transactivate STC1 in breast cancer stem-like cells. *Cell Res*. 2021 Mar 28;31(3):345–61.
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr 5;9(4):265–73.
- Prior IA, Hancock JF. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Apr;23(2):145–53.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):761–74.
- Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue C, Garcia-Carracedo D, Wang W, Kuo C-Y, et al. Disruption of p16 and Activation of Kras in Pancreas Increase Ductal Adenocarcinoma Formation and Metastasis in vivo. *Oncotarget*. 2011;2(11):862–73.
- Quail DF, Taylor MJ, Postovit L-M. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(3):197–216.
- Quinlan MP, Quatela SE, Philips MR, Settleman J. Activated Kras, but Not Hras or Nras, May Initiate Tumors of Endodermal Origin via Stem Cell Expansion. *Mol Cell Biol*. 2008 Apr 15;28(8):2659–74.
- Quinlan MP, Settleman J. Explaining the preponderance of Kras mutations in human cancer: An isoform-specific function in stem cell expansion. *Cell Cycle*. 2008 May 15;7(10):1332–5.
- Reita D, Pabst L, Pencreach E, Guérin E, Dano L, Rimelen V, et al. Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 4;14(5):1321.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):105–11.
- Rizzino A, Wuebben EL. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2016 Jun;1859(6):780–91.
- Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, Loh Y-H, Wang B, Ng H-H, et al. Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005 Jul;280(26):24731–7.
- Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In 2016. p. 25–46.
- Romain C, Paul P, Kim KW, Lee S, Qiao J, Chung DH. Targeting Aurora kinase-A downregulates cell proliferation and angiogenesis in neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2014 Jan;49(1):159–65.

- Rosso M, Majem B, Devis L, Lapyckyj L, Besso MJ, Llauradó M, et al. E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. Castresana JS, editor. *PLoS One*. 2017 Sep 21;12(9):e0184439.
- Roudi R, Madjd Z, Ebrahimi M, Samani F, Samadikuchaksaraei A. CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Cell Mol Biol Lett*. 2014 Jan 1;19(1).
- Ruiz-Cordero R, Devine WP. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. *Surg Pathol Clin*. 2020 Mar;13(1):17–33.
- Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):2703–11.
- dos Santos EO. Investigação das Quinases Aurora A e Aurora B na tumorigenicidade mediada pelo onogene KRAS. Universidade de São Paulo; 2016.
- dos Santos EO, Carneiro-Lobo TC, Aoki MN, Levantini E, Bassères DS. Aurora kinase targeting in lung cancer reduces KRAS-induced transformation. *Mol Cancer*. 2016 Feb 3;15(1).
- Scalabrini LC. O papel da quinase Aurora A na biologia das células iniciadoras de tumor pulmonares com mutação em KRAS. Universidade de São Paulo; 2016.
- Schmidt R, Plath K. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biol*. 2012 Oct 22;13(10):251.
- Schwartz AG, Cote ML. Epidemiology of Lung Cancer. In: Ahmad A, Gadgeel S, editors. *Lung Cancer and Personalized Medicine*. Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 21–41.
- Seguin L, Kato S, Franovic A, Camargo MF, Lesperance J, Elliott KC, et al. An integrin $\beta 3$ –KRAS–RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol*. 2014 May 20;16(5):457–68.
- Shah KN, Bhatt R, Rotow J, Rohrberg J, Olivas V, Wang VE, et al. Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer. *Nat Med*. 2019 Jan 26;25(1):111–8.
- Sharma S, Kemeny N, Kelsen DP, Ilson D, O'Reilly E, Zaknoen S, et al. A phase II trial of farnesyl protein transferase inhibitor SCH 66336, given by twice-daily oral administration, in patients with metastatic colorectal cancer refractory to 5-fluorouracil and irinotecan. *Ann Oncol*. 2002 Jul;13(7):1067–71.
- Shevchenko V, Arnotskaya N, Korneyko M, Zaytsev S, Khotimchenko Y, Sharma H, et al. Proteins of the Wnt signaling pathway as targets for the regulation of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Oncol Rep*. 2019 Mar 5;
- Shi MF, Jiao J, Lu WG, Ye F, Ma D, Dong QG, et al. Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Nov 12;67(22):3915–25.
- Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Oct;14(10):611–29.
- Shimizu T, Nakamura T, Inaba H, Iwasa H, Maruyama J, Arimoto-Matsuzaki K, et al. The

- RAS-interacting chaperone UNC119 drives the RASSF6–MDM2–p53 axis and antagonizes RAS-mediated malignant transformation. *J Biol Chem.* 2020 Aug;295(32):11214–30.
- Shu J, Wang L, Han F, Chen Y, Wang S, Luo F. BTBD7 Downregulates E-Cadherin and Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer. *Biomed Res Int.* 2019 Nov 27;2019:1–11.
- Simanshu DK, Nissley D V., McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell.* 2017 Jun;170(1):17–33.
- Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med.* 2021 Jun 24;384(25):2371–81.
- Smakman N, Veenendaal LM, van Diest P, Bos R, Offringa R, Borel Rinkes IHM, et al. Dual effect of Kras(D12) knockdown on tumorigenesis: increased immune-mediated tumor clearance and abrogation of tumor malignancy. *Oncogene.* 2005;24(56):8338–42.
- Sosa MS, Parikh F, Maia AG, Estrada Y, Bosch A, Bragado P, et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat Commun.* 2015 May 30;6(1):6170.
- Subramanian J, Govindan R. Molecular profile of lung cancer in never smokers. *Eur J Cancer Suppl.* 2013 Sep;11(2):248–53.
- Sun X, Lv X, Yan Y, Zhao Y, Ma R, He M, et al. Hypoxia-mediated cancer stem cell resistance and targeted therapy. *Biomed Pharmacother.* 2020 Oct;130:110623.
- Sundberg M, Jansson L, Ketolainen J, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, et al. CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2009 Mar;2(2):113–24.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May 4;71(3):209–49.
- Swain N, Thakur M, Pathak J, Swain B. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020;24(2):368.
- Taki M, Abiko K, Ukita M, Murakami R, Yamanoi K, Yamaguchi K, et al. Tumor Immune Microenvironment during Epithelial–Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res.* 2021 Sep 1;27(17):4669–79.
- Tang A, Gao K, Chu L, Zhang R, Yang J, Zheng J. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. *Oncotarget.* 2017 Apr 4;8(14):23937–54.
- Tang B, Raviv A, Esposito D, Flanders KC, Daniel C, Nghiem BT, et al. A Flexible Reporter System for Direct Observation and Isolation of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2015 Jan;4(1):155–69.
- Thankamony AP, Saxena K, Murali R, Jolly MK, Nair R. Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal. *Front Mol Biosci.* 2020 Apr 30;7.
- Trenker R, Jura N. Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Curr Opin Cell Biol.* 2020 Apr;63:174–85.
- Tsai C-C, Su P-F, Huang Y-F, Yew T-L, Hung S-C. Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1

- to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell*. 2012 Jul;47(2):169–82.
- Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev*. 2013 Oct 15;27(20):2192–206.
- Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R, Narisawa-Saito M, Nakashima K, et al. Oncogenic Ras/ERK Signaling Activates CDCP1 to Promote Tumor Invasion and Metastasis. *Mol Cancer Res*. 2014;12(10):1449–59.
- Unni AM, Lockwood WW, Zejnullahu K, Lee-Lin SQ, Varmus H. Evidence that synthetic lethality underlies the mutual exclusivity of oncogenic KRAS and EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Elife*. 2015 Jun 5;4(JUNE):1–23.
- Vaddi PK, Stamnes MA, Cao H, Chen S. Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 8;11(9):1331.
- Veerakumarasivam A, Goldstein LD, Saeb-Parsy K, Scott HE, Warren A, Thorne NP, et al. AURKA overexpression accompanies dysregulation of DNA-damage response genes in invasive urothelial cell carcinoma. *Cell Cycle*. 2008 Nov 15;7(22):3525–33.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):717–28.
- Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*. 2000 Oct 5;19(42):4906–16.
- Wang J, Hu T, Wang Q, Chen R, Xie Y, Chang H, et al. Repression of the AURKA-CXCL5 axis induces autophagic cell death and promotes radiosensitivity in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2021a Jul;509:89–104.
- Wang J, Nikhil K, Viccaro K, Chang L, Jacobsen M, Sandusky G, et al. Aurora A-Twist1 axis promotes highly aggressive phenotypes in pancreatic carcinoma. *J Cell Sci*. 2017 Jan 1;
- Wang K, Dong S, Higazy D, Jin L, Zou Q, Chen H, et al. Inflammatory Environment Promotes the Adhesion of Tumor Cells to Brain Microvascular Endothelial Cells. *Front Oncol*. 2021b Jun 16;11.
- Wang M-T, Holderfield M, Galeas J, Delrosario R, To MD, Balmain A, et al. K-Ras Promotes Tumorigenicity through Suppression of Non-canonical Wnt Signaling. *Cell*. 2015 Nov;163(5):1237–51.
- Waters AM, Der CJ. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Sep;8(9):a031435.
- Weng C-C, Ding P-Y, Liu Y-H, Hawse JR, Subramaniam M, Wu C-C, et al. Mutant Kras-induced upregulation of CD24 enhances prostate cancer stemness and bone metastasis. *Oncogene*. 2019 Mar 22;38(12):2005–19.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 5):843–6.
- Whately KM, Voronkova MA, Maskey A, Gandhi J, Loskutov J, Choi H, et al. Nuclear Aurora-A kinase-induced hypoxia signaling drives early dissemination and metastasis in breast cancer: implications for detection of metastatic tumors. *Oncogene*. 2021 Sep 16;40(37):5651–64.

- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci.* 2008 Mar 15;121(6):727–35.
- WHO. Cancer Today [Internet]. World Health Organization - International Agency for Research on Cancer. 2021 [cited 2021 Sep 8]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&g
- Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, et al. K- and N-Ras Are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors. *J Biol Chem.* 1997 May;272(22):14459–64.
- Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, Lombard A, Goffart N, Lumapat PN, et al. Aurora A plays a dual role in migration and survival of human glioblastoma cells according to the CXCL12 concentration. *Oncogene.* 2019 Jan 6;38(1):73–87.
- Wu J, Yang L, Shan Y, Cai C, Wang S, Zhang H. AURKA promotes cell migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma through regulation of the AURKA/Akt/FAK signaling pathway. *Oncol Lett.* 2016 Mar;11(3):1889–94.
- Xu H-T, Ma L, Qi F-J, Liu Y, Yu J-H, Dai S-D, et al. Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Pathol Int.* 2006;56(7):375–80.
- Xu W, Wang Z, Zhang W, Qian K, Li H, Kong D, et al. Mutated K-ras activates CDK8 to stimulate the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer in part via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Lett.* 2015;356(2):613–27.
- 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. *Oncol Rep.* 2013 Dec;30(6):2733–40.
- Yang K, Li Y, Lian G, Lin H, Shang C, Zeng L, et al. KRAS promotes tumor metastasis and chemoresistance by repressing RKIP via the MAPK-ERK pathway in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2018 Jun 1;142(11):2323–34.
- Yang N, Wang C, Wang Z, Zona S, Lin S-X, Wang X, et al. FOXM1 recruits nuclear Aurora kinase A to participate in a positive feedback loop essential for the self-renewal of breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2017 Jun 23;36(24):3428–40.
- Yang P, Qiao Y, Meng M, Zhou Q. Cancer/Testis Antigens as Biomarker and Target for the Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Lung Cancer. *Front Oncol.* 2022 Apr 27;12.
- Yao X-H, Ping Y-F, Chen J-H, Xu C-P, Chen D-L, Zhang R, et al. Glioblastoma stem cells produce vascular endothelial growth factor by activation of a G-protein coupled formylpeptide receptor FPR. *J Pathol.* 2008 Mar 26;215(4):369–76.
- Yin H, Wang Y, Chen W, Zhong S, Liu Z, Zhao J. Drug-resistant CXCR4-positive cells have the molecular characteristics of EMT in NSCLC. *Gene.* 2016 Dec;594(1):23–9.
- Yoshida GJ. Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Dec 27;37(1):173.
- Zhang C, Gao H, Li C, Tu J, Chen Z, Su W, et al. TGF β 1 Promotes Breast Cancer Local Invasion and Liver Metastasis by Increasing the CD44 high /CD24 – Subpopulation. *Technol Cancer Res Treat.* 2018a Jan 15;17:153303381876449.

- Zhang D-G, Jiang A-G, Lu H-Y, Zhang L-X, Gao X-Y. Isolation, cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells. *Oncol Lett.* 2015 Jan;9(1):47–54.
- Zhang J, Chen X, Bian L, Wang Y, Liu H. CD44+/CD24+-Expressing Cervical Cancer Cells and Radioresistant Cervical Cancer Cells Exhibit Cancer Stem Cell Characteristics. *Gynecol Obstet Invest.* 2019;84(2):174–82.
- Zhang X, Cao J, Miller SP, Jing H, Lin H. Comparative Nucleotide-Dependent Interactome Analysis Reveals Shared and Differential Properties of KRas4a and KRas4b. *ACS Cent Sci.* 2018b Jan 24;4(1):71–80.
- Zhao X-F, Yang Y-S, Gao D-Z, Park YK. TMPRSS4 overexpression promotes the metastasis of colorectal cancer and predicts poor prognosis of stage III–IV colorectal cancer. *Int J Biol Markers.* 2021 Aug 1;36(3):23–32.
- Zhao Y, Hu X, Wei L, Song D, Wang J, You L, et al. PARP10 suppresses tumor metastasis through regulation of Aurora A activity. *Oncogene.* 2018 May 8;37(22):2921–35.
- Zheng F-M, Long Z-J, Hou Z-J, Luo Y, Xu L-Z, Xia J-L, et al. A novel small molecule aurora kinase inhibitor attenuates breast tumor-initiating cells and overcomes drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(8):1991–2003.
- Zheng F, Yue C, Li G, He B, Cheng W, Wang X, et al. Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype. *Nat Commun.* 2016;7:10180.
- Zhou B, Der CJ, Cox AD. The role of wild type RAS isoforms in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Oct;58:60–9.
- Zhu C, Deng X, Wu J, Zhang J, Yang H, Fu S, et al. MicroRNA-183 promotes migration and invasion of CD133+/CD326+ lung adenocarcinoma initiating cells via PTPN4 inhibition. *Tumor Biol.* 2016 Aug 7;37(8):11289–97.
- Zhu K, Yan H, Wang R, Zhu H, Meng X, Xu X, et al. Mutations of KRAS and PIK3CA as independent predictors of distant metastases in colorectal cancer. *Med Oncol.* 2014;31(7):16.

SÚMULA CURRICULAR

1 - Dados pessoais:

Nome: Luiza Coimbra Scalabrini

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

2 - Educação:

1. Instituto Sagrada Família, ISFUC, Brasil, 2006.

Ensino Médio

2. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG, 2014.

Bacharel em Bioquímica

a. University of West Florida, Pensacola, EUA, 2012.

BSc Chemistry – 6 meses, Bolsista UFRV

3. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, 2016.

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

4. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, 2017 (em andamento).

Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

3 – Publicações:

3.1) Manuscritos publicados:

RODRIGUES, FELIPE SILVA; MIRANDA, VANESSA SILVA; CARNEIRO-LOBO, TATIANA CORREA; SCALABRINI, LUIZA COIMBRA; KRUSPIG, BJÖRN; LEVANTINI, ELENA; MURPHY, DANIEL J.; BASSÈRES, DANIELA SANCHEZ. IKK β Kinase Promotes Stemness, Migration, and Invasion in KRAS-Driven Lung Adenocarcinoma Cells. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, v. 21, p. 5806, 2020.

GOMES-FILHO, SANDRO MASCENA; DOS SANTOS, EDMILSON OZORIO; BERTOLDI, ESTER RISÉRIO MATOS; **SCALABRINI, LUIZA COIMBRA**; HEIDRICH, VITOR; DAZZANI, BIANCA; LEVANTINI, ELENA; REIS, EDUARDO MORAES; BASSÈRES, DANIELA SANCHEZ. Aurora A kinase and its activator TPX2 are potential therapeutic targets in KRAS-induced pancreatic cancer. *CELLULAR ONCOLOGY*, v. 43, p. 445-460, 2020.

CARNEIRO-LOBO, TATIANA CORREA; **SCALABRINI, LUIZA COIMBRA**; DA SILVA MAGALHÃES, LEILA; CARDEAL, LAURA B.; RODRIGUES, FELIPE SILVA; DOS SANTOS, EDMILSON OZORIO; BALDWIN, ALBERT S.; LEVANTINI, ELENA; GIORDANO, RICARDO J.; SANCHEZ BASSÈRES, DANIELA. IKK β targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: a potential anti-angiogenic therapeutic target. *LUNG CANCER*, v. 130, p. 169-178, 2019.

3.2) Manuscritos em preparação:

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

3.2) Resumos publicados em anais de eventos:

SCALABRINI, L. C.; CARNEIRO-LOBO, T. C.; HASENKAMP, L. A.; BASSÈRES, D. S.. Targeting Aurora A kinase activity in lung cancer initiating cells driven by oncogenic KRAS. In: I Simpósio de Câncer de São Paulo, 2020, São Paulo. I Simpósio de Câncer de São Paulo - Livro de Resumos, 2020. p. 33-34.

SCALABRINI, L. C.; CARNEIRO-LOBO, T. C.; HASENKAMP, L. A.; BASSERES, D. S.. Targeting Aurora A kinase activity in lung cancer initiating cells driven by oncogenic KRAS. In: Cancer Stem Cells: Impact on Treatment 2nd International Conference, 2018, Seefeld in Tyrol. Cancer Stem Cells: Impact on Treatment 2nd International Conference, 2018. p. 61-62.

SCALABRINI, L. C.; CARNEIRO-LOBO, T. C.; HASENKAMP, L. A.; BASSERES, D. S.. TARGETING AURORA A KINASE ACTIVITY IN LUNG CANCER INITIATING CELLS DRIVEN BY ONCOGENIC KRAS. In: *Frontiers in Molecular Oncology*, 2018, São Paulo. *Frontiers in Molecular Oncology. International Conference*, 2018. Oral presentation.

SCALABRINI, L. C.; CARNEIRO-LOBO, T. C.; HASENKAMP, L. A.; BASSERES, D. S.. Targeting Aurora A kinase activity in lung cancer initiating cells driven by oncogenic KRAS. In: *46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 2017, Águas de Lindóia. *46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 2017. p. R08106-R08106.

SCALABRINI, L. C. CARNEIRO-LOBO, T. C., HASENKAMP, L. A., BASSERES, D. S. Targeting Aurora A kinase activity in lung cancer cells driven by oncogenic KRAS impairs lung cancer initiating cell function. In: *XVIII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology*. In: *SBBC, 2016, SÃO PAULO. XVIII SBBC Congress Abstracts*, 2016. p.30 – 30.

CARNEIRO-LOBO, T. C.; SANTOS, E. O.; **SCALABRINI, L. C.**; BALDWIN, A. S.; GIORDANO, R. J.; BASSERES, D. S. IKK β is a potential anti-angiogenic therapeutic target in KRAS-induced lung cancer. In: *AACR Precision Medicine Series: targeting the vulnerabilities of cancer*, 2016, Miami, USA. *AACR-PMS Targeting the vulnerabilities of cancer program and proceedings*, 2016, 2016. p. 73-73.

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

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

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

4. Prêmios:

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

5. Participação em eventos científicos:

1. I Simpósio de Câncer de São Paulo, 2020
2. Cancer Stem Cells: Impact on Treatment 2nd International Conference, 2018.
3. Frontiers in Molecular Oncology, 2018.
4. 46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2017.
5. XVIII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC). 2016.
6. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)/ 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). 2015.

6 – Outras atividades:

1. Bolsista Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2015.
2. I Ciclo de Palestras de Empreendedorismo Tecnológico. 2011.
3. I Curso de Introdução de Bioquímica Médica e Bases Moleculares de Algumas Doenças. 2011.

4. Produção e Caracterização de Enzimas de Interesse Biotecnológico. 2011.
5. Inovar II Seminário sobre Empreendedorismo, Inovação e Desenvolvimento. 2011.
6. Curso de Noções básicas de técnicas em biologia molecular. 2010.

5. Ocupação:

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

Bolsista de Doutorado, CNPq, Jan/2017 a Mar/2021.