

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**(Bioquímica)**

**LUTERO AUGUSTO HASENKAMP**

**Caracterização de vias oncogênicas em câncer de**  
**pâncreas: microRNAs e IKK $\beta$**

*Versão Corrigida*

**São Paulo**

**Data do depósito na SPG:**

**10/04/2023**

**LUTERO AUGUSTO HASENKAMP**

**Caracterização de vias oncogênicas em câncer de  
pâncreas: microRNAs e IKK $\beta$**

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

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères**

**São Paulo**

**2023**

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

H348c Hasenkamp, Lutero Augusto  
Caracterização de vias oncogênicas em câncer de pâncreas: microRNAs e IKKbeta / Lutero Augusto Hasenkamp. - São Paulo, 2023.  
118 p.

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

Orientador: Bassères, Daniela Sanchez

1. câncer de pâncreas. 2. KRAS. 3. microRNAs. 4. CITs. 5. IKKbeta. I. T. II. Bassères, Daniela Sanchez, orientador.



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

"Caracterização de vias oncogênicas em câncer de pâncreas: microRNAs e IKK $\beta$ "

## **LUTERO AUGUSTO HASENKAMP**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor 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. Mari Cleide Sogayar  
IQ - USP

---

Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli  
ICB - USP

---

Profa. Dra. Irina Kerkis  
INSTITUTO BUTANTAN

SÃO PAULO  
01 de setembro de 2023

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro, gostaria de agradecer a minha mãe Rosane Hasenkamp pela parceria em todos os momentos da minha vida, por ser meu alicerce e confidente nos períodos difíceis. Seu entusiasmo pelo conhecimento, colocando os bens intelectuais acima dos materiais, sempre me inspirou desde pequeno e sem sombra de dúvidas foi essencial para me tornar o que sou hoje.

Aos queridos amigos que a USP me proporcionou ao longo desses mais de 10 anos, em especial aqueles que fizeram parte do meu dia a dia nesse período da pós-graduação, com quem fiz parcerias, dividi alegrias e tristezas e com quem construí laços sinceros de amizade. Dentre estes estão os ex-membros do LBMC: Luiza, Vanessa, Felipe, Sandro e Thalita que me receberam e me integraram ao laboratório, me ensinando muito em todo o período que passamos juntos no laboratório, desde que ficávamos no bloco 9. Em especial ao Gabriel, que me ajudou muito nas etapas mais finais deste projeto. Aos amigos de laboratório Beatriz e Allan pelos momentos de descontração e pelo suporte mútuo dentro e fora do IQ.

Aos professores do LAPIC, a Profa. Daniela Bassères, minha orientadora, por ter confiado em mim para conduzir esse estudo, pelas trocas de conhecimento e discussões científicas que sempre muito me enriqueceram. Ao Prof. Eduardo Moraes Reis e seus alunos, pela sempre disponibilidade em contribuir para o projeto com ideias e críticas construtivas. A Profa. Deborah Schechtman por todos os conselhos acadêmicos/científicos e pelos momentos de amizade, buscando sempre nos ajudar.

A todos os colegas de fora do IQ-USP, em especial ao amigo Pablo Scharf e sua orientadora Prof. Sandra Farsky (FCF-USP), que dispuseram o seu citômetro de fluxo para que pudéssemos avaliar diferentes amostras, bem como ao Prof. Ricardo Weinlich e sua Assistente de Pesquisa Bárbara Moraschi que nos permitiram e auxiliaram nos experimentos de *cell sorting*, quando todos os demais lugares nos fecharam as portas repetidas vezes.

Por fim, agradeço as Agências de fomento à pesquisa, CAPES, FAPESP e CNPq pelo financiamento direto e/ou indireto a condução do estudo aqui relatado, em especial ao CNPq, pelo financiamento da minha bolsa de doutorado, subsídio essencial para que pudesse me dedicar integralmente aos estudos e experimentos conduzidos.

## RESUMO

Hasenkamp, L.A. **Caracterização de vias oncogênicas em câncer de pâncreas: microRNAs e IKK $\beta$** . 2023. 118p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) é o tumor sólido mais letal em humanos, sendo que menos de 10% dos pacientes sobrevivem 5 anos ou mais. Essa baixa sobrevida é atribuída ao fenótipo altamente metastático, à recidiva e à ineficácia das terapias disponíveis. Assim, a presente tese buscou caracterizar vias oncogênicas que contribuem para a malignidade de PDAC, visando assim aumentar o conhecimento necessário para desenvolvimento de novas terapias, sendo esta tese dividida em dois capítulos.

No Capítulo 1, avaliamos a via de microRNAs (miRNAs) regulados pela KRAS oncogênica, que está presente em mais de 90% dos tumores de PDAC e ainda permanece sem tratamento disponível para este tipo de tumor. Dado que miRNAs efetores de KRAS ainda são pouco explorados, nosso objetivo foi identificar miRNAs induzidos pela KRAS oncogênica, que contribuem para o fenótipo maligno do PDAC. Usando um ensaio de microarranjo de DNA, identificamos 17 miRNAs regulados positivamente por KRAS. A análise global de alvos destacou o supressor tumoral PTEN como o alvo regulado pelo maior número destes miRNAs (7 dos 17). Por meio da superexpressão e redução de expressão de KRAS, confirmamos que KRAS regula negativamente PTEN e regula positivamente 4 destes 7 miRNAs que têm PTEN como alvo. Para avaliar se a regulação de PTEN por KRAS poderia ser mediada por estes miRNAs, usamos ensaios de luciferase contendo trechos do 3'UTR de PTEN. Tanto a KRAS, quanto o mir-19b-3p são capazes de regular a atividade de luciferase em PDAC. Como conclusão deste capítulo, nós identificamos uma assinatura de miRNAs induzidos por KRAS em PDAC que tem PTEN como alvo e validamos o miR-19b-3p como um dos miRNAs efetores na regulação dos níveis de PTEN por KRAS, contribuindo para o fenótipo maligno de PDAC.

No Capítulo 2, investigamos o papel da quinase IKK $\beta$  para o fenótipo tronco-tumoral das células iniciadoras de tumor (CITs) pancreáticas, que constituem uma subpopulação de células tumorais consideradas responsáveis pela metástase e recidiva tumoral. A IKK $\beta$  desempenha um papel chave na ativação da via do NF- $\kappa$ B, constitutivamente ativa em cerca de 70% dos casos de PDAC e que promove o fenótipo tronco-tumoral em diversos tipos de tumores. Assim, nosso objetivo foi determinar como a IKK $\beta$  afeta o fenótipo tronco-tumoral e metastático de células pancreáticas visando o desenvolvimento desta quinase como alvo terapêutico. Para avaliar CITs em linhagens de PDAC, utilizamos a cultura de tumoresferas e estabelecemos a linhagem AsPC-1-SORE6 expressando o gene repórter GFP sob o controle dos fatores de pluripotência SOX2 e OCT4. Embora a inibição da expressão de IKK $\beta$  por interferência de RNA tenha reduzido a formação de tumoresferas, a inibição farmacológica de IKK $\beta$  foi ineficaz em inibir o fenótipo tronco-tumoral das CITs pancreáticas, não alterando a formação de tumoresferas ou alterando transitoriamente a frequência da população SORE6-GFP+. Por outro lado, a inibição de IKK $\beta$  reduziu a migração e invasão celulares. Em conclusão, a IKK $\beta$  afeta o fenótipo tronco-tumoral de maneira quinase-independente e interfere na migração e invasão celulares, características importantes para metástase, podendo representar um potencial alvo terapêutico anti-metastático em PDAC.

**Palavras-chaves:** câncer de pâncreas, KRAS, microRNAs, PTEN, CITs, IKK $\beta$ .

## ABSTRACT

Hasenkamp, L.A. **Characterization of oncogenic pathways in pancreatic cancer: microRNAs and IKK $\beta$** . 2023. 118p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the deadliest solid tumor in humans, with a 5-year survival rate of less than 10%. This low survival rate is attributed to its highly metastatic phenotype, tumor relapse and to the inefficacy of available therapies. Thus, this thesis sought to characterize oncogenic pathways that contribute to PDAC malignancy, aiming to increase the knowledge needed for the development of new therapies, with the thesis being divided into two chapters.

In Chapter 1, we evaluated the microRNA (miRNA) pathway regulated by oncogenic KRAS, which is mutated in more than 90% of PDAC tumors and lack effective therapies for this type of tumor. Given that miRNAs that act as KRAS effectors are still poorly explored, our objective was to identify miRNAs induced by oncogenic KRAS that contribute to the malignant phenotype of PDAC. Using DNA microarray, we identified 17 KRAS-upregulated miRNAs. miRNA target analysis highlighted the tumor suppressor PTEN as the miRNA target most often regulated by these miRNAs (7 out of 17). Through overexpression and downregulation of KRAS, we confirmed that KRAS negatively regulates PTEN levels and upregulates 4 of the 7 miRNAs that are predicted to target PTEN. To investigate whether the negative regulation of PTEN by KRAS could be mediated by these miRNAs, we used luciferase reporters containing PTEN 3'UTR inserts. Both KRAS and mir-19b-3p were able to regulate luciferase reporter activity in PDAC. As a conclusion of this chapter, we identified a signature of KRAS-induced miRNAs in PDAC that target PTEN and have validated miR-19b-3p as one of the effector miRNAs in the regulation of PTEN levels by KRAS, contributing to the malignant phenotype of PDAC.

In Chapter 2, we investigated the role of IKK $\beta$  kinase for the cancer stem phenotype of pancreatic tumor initiating cells (TICs), which constitute a subpopulation of tumor cells considered responsible for metastasis and tumor recurrence. IKK $\beta$  plays a key role in activating the NF- $\kappa$ B pathway, which is constitutively active in about 70% of PDAC cases and promotes the cancer stem phenotype in several types of tumors. Thus, our objective was to determine how IKK $\beta$  affects the cancer stem and metastatic phenotype of pancreatic cells aiming at the development of this kinase as a therapeutic target. To evaluate TICs in PDAC cell lines, we used the tumor sphere assays and established the AsPC-1-SORE6 cell line expressing the GFP reporter gene under control of pluripotency factors SOX2 and OCT4. Although inhibition of IKK $\beta$  expression by RNA interference reduced tumor sphere formation, its pharmacological inhibition did not impair the cancer stem phenotype of pancreatic CITs, not affecting tumor sphere formation or only transiently altering the SORE6-GFP+ population frequency. On the other hand, IKK $\beta$  inhibition reduced cell migration and invasion. In conclusion, IKK $\beta$  seems to affect the cancer stem phenotype in a kinase-independent manner and interferes with cell migration and invasion, important hallmarks of metastasis, and may represent a potential anti-metastatic therapeutic target for PDAC.

**Keywords:** Pancreatic cancer, KRAS, microRNAs, PTEN, TICs, IKK $\beta$ .

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
1.1 Câncer de pâncreas .....	11
<b>CAPÍTULO 1: Via de miRNAs regulados pela KRAS oncogênica em câncer de pâncreas.</b>	
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
2.1 KRAS .....	14
2.2 KRAS no câncer de pâncreas .....	16
2.3 MicroRNAs .....	17
2.4 MicroRNAs e KRAS no PDAC .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 Linhagens celulares e condições de cultura celular .....	19
4.2 Ensaio de microarranjo de miRNAs .....	20
4.3 Predição de alvos e sítios dos miRNAs .....	20
4.4 Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i> .....	21
4.5 Análise de co-expressão dos miRNAs em relação a PTEN e KRAS oncogênica .....	22
4.6 Extração de RNA total e transcrição reversa .....	22
4.7 Análise de expressão relativa por RT-qPCR .....	23
4.8 Transfecções celulares .....	23
4.9 Clonagem de inserto do 3'UTR de PTEN na <i>firefly</i> luciferase .....	24
4.10 Ensaio de Luciferase .....	25
4.11 Ensaio de colônia .....	25
4.12 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo .....	26
4.13 Análise estatística .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 2: Investigação da IKK<math>\beta</math> como potencial alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pancreáticas.</b>	
<b>8. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
8.1 Células iniciadoras de tumor (CITs) .....	49
8.2 CITs e o câncer pancreático .....	53
8.3 A via de NF- $\kappa$ B .....	55



8.4 Ativação da via do NF- $\kappa$ B.....	57
8.5 A quinase IKK $\beta$ .....	58
8.6 A importância de IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B no câncer.....	60
<b>9. HIPÓTESE E OBJETIVOS .....</b>	<b>62</b>
<b>10. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
10.1 Linhagens celulares e cultivo.....	63
10.2 Titulação dos anticorpos para marcadores de CITs.....	63
10.3 Citometria de Fluxo e separação celular.....	63
10.4 Ensaio de formação de tumoresferas .....	64
10.5 Inibição farmacológica de IKK $\beta$ .....	65
10.6 Análise de expressão relativa por RT-qPCR .....	65
10.7 Análise proteica por Western blotting .....	65
10.8 Ensaio de migração e invasão.....	66
10.9 Geração de lentivírus .....	66
10.10 Transdução celular.....	67
10.11 Seleção de clones com “ <i>knockdown</i> ” por shRNA .....	67
10.12 Análise estatística .....	67
<b>11. RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
11.1 Identificação de CITs por marcadores de superfície nas linhagens de PDAC .....	68
11.2 Enriquecimento de CITs pancreáticas por cultura de tumoresferas .....	71
11.3 A inibição farmacológica de IKK $\beta$ reduz o fenótico tronco-tumoral em PDAC.....	73
11.4 Geração do modelo SORE6-GFP e validação nas linhagens de PDAC .....	75
11.5 A Inibição farmacológica da IKK $\beta$ no modelo celular SORE6-GFP reduz transitoriamente a proporção de células GFP-positivas.....	82
11.6 Silenciamento gênico de IKK $\beta$ .....	85
11.7 A inibição de IKK $\beta$ reduz a migração e invasão celular diminuindo a transição epitélio-mesenquimal .....	88
<b>12. DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>13. CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
<b>14. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
<b>Anexo 1 – Sequência completa do 3’UTR de PTEN humana com os insertos clonados .....</b>	<b>117</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação da ativação de KRAS.....	15
Figura 2. Frequência dos tipos de mutações em KRAS presentes no PDAC..	16
Figura 3. Biogênese dos microRNAs..	17
Figura 4. Regulação negativa do PTEN por KRAS em diferentes modelos de linhagens de células pancreáticas.....	29
Figura 5. O miR-21 e o miR-221 mostram expressão aumentada em amostras de pacientes portadores de PDAC com KRAS mutante no banco de dados do TCGA.	31
Figura 6. MiR-19b e MiR-29b apresentam correlação negativa de expressão com PTEN em amostras de pacientes portadores de PDAC disponíveis no TCGA. ....	31
Figura 7. A inibição de KRAS reduz a expressão de miRNAs que tem PTEN como alvo.....	32
Figura 8. A superexpressão de KRASG12V nas células AsPC-1 reduz a expressão da maioria dos miRNAs que tem PTEN como alvo. ....	33
Figura 9. KRAS é capaz de regular a atividade do gene repórter da luciferase na presença da região 3'-UTR de PTEN.....	35
Figura 10. O miR-19b-3p regula os níveis de PTEN. ....	37
Figura 11. MiR-19b tem efeitos contraditórios sobre a clonogenicidade celular em PDAC. ....	39
Figura 12. Expressão suprafisiológica do MiR-19b regula negativamente a expressão de KRAS, além de PTEN. ....	39
Figura 13. A inibição do miR-19b-3p promove a morte celular de células AsPC-1 tratadas ou não com gencitabina. ....	41
Figura 14. Esquema dos diferentes modelos propostos para geração da heterogeneidade intratumoral.....	51
Figura 15. Membros das famílias de proteínas NF- $\kappa$ B e dos inibidores I $\kappa$ B. ....	56
Figura 16. Vias de ativação do NF- $\kappa$ B.....	58
Figura 17. Esquema dos principais domínios protéicos das duas subunidades catalíticas do complexo IKK: IKK $\alpha$ e IKK $\beta$ .....	59
Figura 18. Esquema de gates por citometria de fluxo utilizados.....	65
Figura 19. A proporção de células positivas para os marcadores de CITs CD24, CD44, ESA e CD133 é variável em diferentes linhagens pancreáticas..	70
Figura 20. Tumoresferas geradas das diferentes linhagens de PDAC.....	71

Figura 21. Tumoresferas de linhagens de PDAC apresentam aumento de expressão de genes funcionais para CITs.....	72
Figura 22. O Composto A inibe a atividade de IKK $\beta$ em células de PDAC.....	73
Figura 23. O composto A não afeta significativamente a capacidade de formação de tumoresferas de linhagens de PDAC..	74
Figura 24. O Composto A tem efeito heterogêneo sobre a expressão de genes relacionados a CITs em PDAC.....	75
Figura 25. Esquema do vetor lentiviral SORE6 com repórter GFP para CITs.....	76
Figura 26. A proporção de células GFP positivas nas linhagens de PDAC portadoras da construção SORE6-GFP é variável.....	78
Figura 27. Estratégia empregada para purificação ( <i>sorting</i> ) das células AsPC-1-SORE6 GFP positivas e negativas, com a validação pós <i>sorting</i> .	79
Figura 28. Células SORE6 com fenótipo tronco (GFP-positivas) dão origem a células sem fenótipo tronco (GFP-negativas).....	80
Figura 29. Células AsPC-1-SORE6 GFP-positivas apresentam aumento de características associadas ao fenótipo tronco-tumoral.....	83
Figura 30. A inibição farmacológica de IKK $\beta$ em células AsPC-1 SORE6-GFP não purificadas reduz transitoriamente a proporção de células GFP-positivas.....	85
Figura 31. A inibição farmacológica de IKK $\beta$ em células oriundas de cultura de células GFP-positivas purificadas da linhagem AsPC-1 SORE6-GFP não afeta significativamente a proporção de células GFP-positivas.	84
Figura 32. Clones da linhagem AsPC-1 com expressão induzível por doxiciclina de um shRNA para IKK $\beta$ apresentam redução na expressão proteica de IKK $\beta$ .	86
Figura 33. A inibição induzível da expressão de IKK $\beta$ por interferência de RNA com shRNA em células AsPC-1 reduz a formação de tumoresferas.....	87
Figura 34. A inibição da expressão de IKK $\beta$ por interferência de RNA com siRNAs em células AsPC-1 reduz a formação de tumoresferas.	88
Figura 35. A inibição de IKK $\beta$ por interferência de RNA reduz a migração e invasão celular.....	90
Figura 36. A inibição de IKK $\beta$ por interferência de RNA aumenta a expressão de E-caderina e diminui N-caderina e Snail.....	91
Figura 37. Uma nova alíquota do Composto A não inibe a fosforilação de alvos da IKK $\beta$ .....	92
Figura 38. A inibição farmacológica de IKK $\beta$ com TPCA-1 reduz a migração celular.	93

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Câncer de pâncreas

O câncer de pâncreas é atualmente a quarta principal causa de morte por câncer nos Estados Unidos (EUA) e a sétima em todo o mundo (SIEGEL *et al.*, 2021). Esses números estão aumentando anualmente e estima-se que esse tipo de neoplasia se tornará a segunda principal causa de morte por câncer nos EUA até 2030 (RAHIB *et al.*, 2014). No Brasil, a estimativa anual para o triênio 2023 a 2025 é de 10.980 novos casos de câncer de pâncreas, ocupando a 13ª posição em incidência dentre todos os cânceres e atualmente a 8ª em mortalidade por câncer, com 11.893 óbitos em 2020 (INCA, 2022; SANTOS *et al.*, 2023).

O pâncreas trata-se de um órgão glandular misto, no qual mais de 95% das neoplasias malignas surgem das porções exócrinas deste órgão, que compreende as células ductais e acinares, responsáveis por produzir e conduzir o suco pancreático, que contém diversas enzimas digestivas (POUR; PANDEY; BATRA, 2003). O tipo mais comum de câncer pancreático é o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), que representa mais de 80% das neoplasias pancreáticas, originando-se em 60-70% dos casos na região da cabeça, 10-15% na cauda e 5-10% no corpo do pâncreas (KLEEFF *et al.*, 2016; TOMASELLO *et al.*, 2019). O PDAC é o tumor sólido mais letal em humanos, sendo que menos de 10% dos pacientes sobrevive 5 anos ou mais ao diagnóstico (SIEGEL *et al.*, 2021).

A baixa taxa de sobrevivência desse tipo de câncer é atribuída principalmente a dois fatores. Primeiro, como a doença é assintomática nos estágios iniciais, os pacientes são frequentemente diagnosticados quando apresentam estágio avançado, quando não são mais elegíveis para a cirurgia de ressecção (melhor tratamento atual), frequentemente apresentando metástases locais e distantes do foco de origem (TAKIKAWA *et al.*, 2022). Segundo, a terapia disponível atualmente para os pacientes não é eficaz, sendo frequente a resistência à quimioterapia e radioterapia, bem como o aparecimento de recidiva, mesmo após a ressecção curativa (PRINCIPE *et al.*, 2021; WINTER, J. M. *et al.*, 2012). Ainda assim, nos casos em que a ressecção é realizada, a sobrevida superior a 5 anos ocorre em menos de 25% dos casos (WINTER, J. M. *et al.*, 2012).

Apesar dos robustos avanços nas descobertas de biomarcadores de diagnóstico em PDAC, como a descoberta de antígenos específicos (e.g. CA19-9) e diversos RNAs não codificadores que tem o potencial de permitir um diagnóstico mais precoce do câncer de pâncreas e assim aumentar as chances de uma ressecção curativa, muitos destes marcadores ainda não tem eficiência preditiva comprovada e não estão em uso clínico (BOYD *et al.*, 2023; O'NEILL; STOITA, 2021). Além disso, as vias moleculares e os efetores críticos do processo de malignidade do PDAC, presentes tanto em tumores iniciais quanto avançados, ainda são pouco compreendidos. Esta falta de conhecimento impede avanços no desenvolvimento de novas terapias, que podem ser mais efetivas e melhorar o prognóstico de pacientes portadores deste tipo de neoplasia.

Assim, a presente tese buscou a caracterização de vias oncogênicas, que contribuem para a malignidade deste tipo de câncer, visando assim aumentar o repertório de conhecimento necessário para desenvolvimento de novas terapias. A tese é dividida em dois capítulos que se seguem, sendo que no primeiro avaliamos microRNAs (miRNAs) regulados pela KRAS em PDAC e no segundo investigamos a quinase IKK $\beta$  como um potencial alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor (CITs) pancreáticas.

**CAPÍTULO 1: Via de miRNAs regulados pela  
KRAS oncogênica em câncer de pâncreas.**

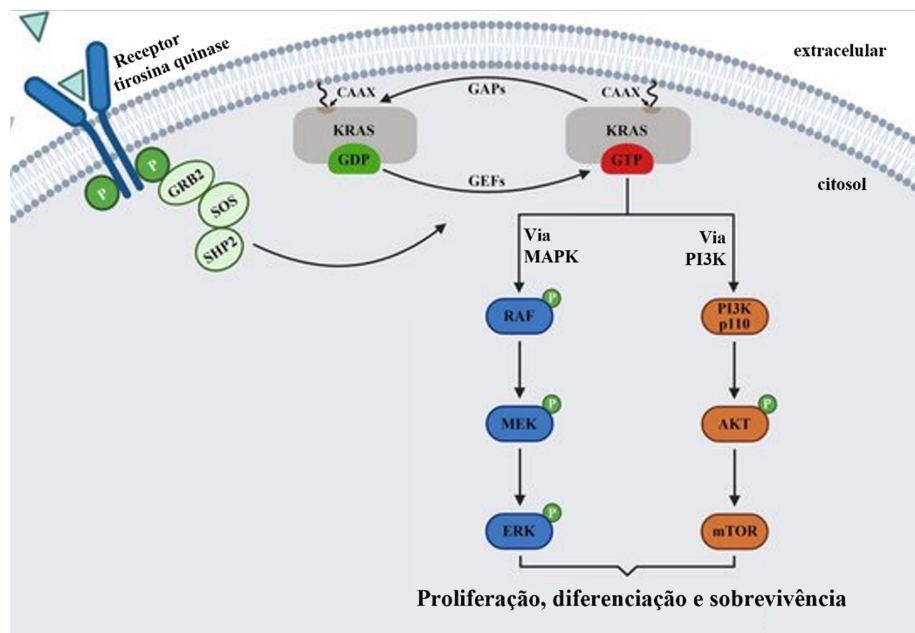
## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 KRAS

O gene *KRAS*, localizado no cromossomo 12p12.1, pertence à família de oncogenes *RAS*, que inclui também os genes *HRAS* e *NRAS*, apresentando todos uma homologia de cerca de 85% e codificando pequenas GTPases monoméricas de aproximadamente 21 kDa. Nas células, este grupo de proteínas encontra-se ancorado na membrana plasmática interna onde fazem parte da transdução de sinais extracelulares para efetores intracelulares, ativando diversas vias de sinalização que promovem proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (DI MAGLIANO; LOGSDON, 2013).

A proteína *KRAS* na sua forma não oncogênica atua como um interruptor molecular binário, ciclando entre seu estado ativo quando ligada ao trifosfato de guanossina (GTP) e inativo quando ligada ao difosfato de guanossina (GDP). Quando *KRAS* está ativada (ligada a GTP), esta modula características de sobrevivência celular ativando diversas cascatas de sinalização, que incluem a ativação da via das quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a via da fosfoinositídeo quinase/proteína B quinase (PI3K/AKT), dentre outras (KIM, H. J. *et al.*, 2021; PARIKH *et al.*, 2022) (**Fig. 1**).

Para ativação das proteínas *RAS* em condições fisiológicas (**Fig. 1**), primeiro faz-se necessária a ligação de fatores extracelulares a receptores tirosina quinase (RTK) presentes na membrana das células, como por exemplo os receptores de fatores de crescimento epidermal (EGFR) e derivado de plaquetas (PDGFR), causando a sua homo ou heterodimerização e conseqüentemente a fosforilação cruzada de resíduos de tirosina da porção citoplasmática destes receptores. Esses resíduos agora fosforilados servem de ancoragem para proteínas adaptadoras, como a GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*), que recrutam os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), a exemplo da SOS (*Son of Sevenless*) ou Cdc25 (*Cell division control protein 25*), capazes de gerar mudanças conformacionais em *RAS*-GDP, que resultam na dissociação de GDP e entrada de GTP, já que no citoplasma o GTP está presente em concentração muito superior à do GDP (**Fig. 1**).



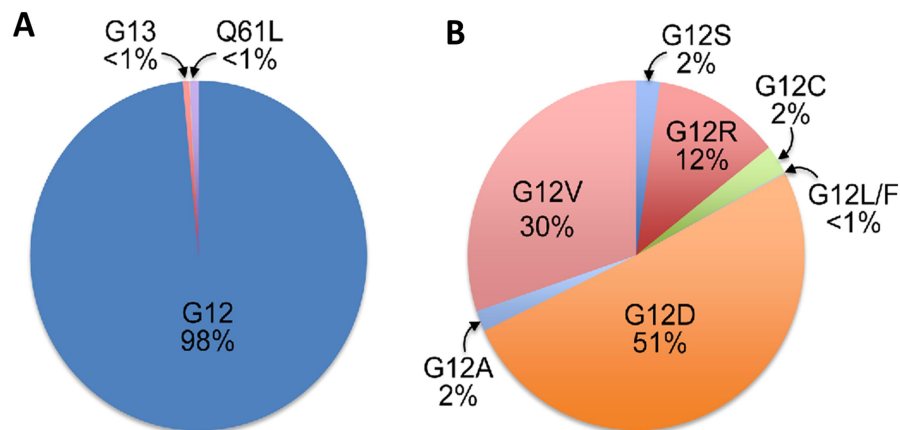
**Figura 1. Regulação da ativação de KRAS.** A ligação de um fator extracelular ao seu receptor do tipo tirosina quinase leva à sua dimerização e auto fosforilação. Os resíduos de tirosina fosforilados permitem o recrutamento da proteína adaptadora GRB2, que com seus parceiros moleculares leva à ativação das GEFs, que por sua vez interagem com a forma inativa de KRAS (KRAS-GDP) induzindo a troca do nucleotídeo de guanina. KRAS ativa (ligada a GTP) leva à ativação de diversos efetores, aqui representados pelas 2 principais vias (MAPK e PI3K), que culminam na sobrevivência e proliferação celular. Ao cessar o sinal extracelular, as GAPs interagem com a forma ativa de KRAS (KRAS-GTP) promovendo a hidrólise do GTP em GDP e inativando as vias a jusante. Adaptado de ZHU *et al.*, 2021.

Já a inativação das proteínas RAS dá-se pela hidrólise de GTP a GDP, uma vez cessado o estímulo extracelular. As proteínas RAS possuem capacidade GTPásica intrínseca, porém esta apresenta cinética muito lenta, requerendo assim o auxílio das proteínas GAPs (*GTPase Activating Proteins*) para acelerar a catálise e torná-la inativa (ligada a GDP) (**Fig. 1**). Entretanto, em tumores é justamente este processo de inativação que se encontra comprometido por mutações oncogênicas. Em KRAS, as mutações pontuais mais prevalentes envolvem o domínio de ligação às GAPs (códon 12 e 13) ou o domínio catalítico (códon 61), resultando na perda da capacidade de hidrolisar o GTP em GDP, retendo KRAS na sua forma ativa (ligada a GTP), resultando assim em uma estimulação constitutiva de diversos efetores que propiciam a proliferação celular descontrolada, transformação maligna e resistência à apoptose (DELPU *et al.*, 2011; WATERS; DER, 2018).



## 2.2 KRAS no câncer de pâncreas

Mutações oncogênicas em KRAS são altamente prevalentes em PDAC, ocorrendo em aproximadamente 85% dos casos e estão presentes desde os eventos iniciais da carcinogênese pancreática (DELPY *et al.*, 2011; DI MAGLIANO; LOGSDON, 2013). No PDAC, mais de 98% das mutações ativadoras de KRAS são do tipo *missense* no códon 12 do seu gene (**Fig. 2-A**), gerando a troca do aminoácido codificante glicina (G12) por diferentes aminoácidos (**Fig. 2-B**). Neste tipo de tumor, existe uma maior prevalência das mutações G12D e G12V, que geram a troca da glicina para aspartato e valina, respectivamente (**Fig. 2-B**). Apesar do sucesso recente de uma terapia direcionada especificamente para KRAS G12C através do inibidor Sotorasibe, que se liga covalentemente à cisteína do códon 12 mutado, em PDAC este inibidor não tem impacto significativo na terapia, uma vez que a mutação G12C representa menos de 2% do total de casos (SKOULIDIS *et al.*, 2021).



**Figura 2. Frequência dos tipos de mutações em KRAS presentes no PDAC. (A)** mutações oncogênicas nos diferentes códon de KRAS. **(B)** tipos de mutações mais frequentes no códon 12 com substituição do aminoácido glicina (G) por outros. Adaptado de BRYANT *et al.*, 2014.

Assim, mediante o fato da não existência até o momento de inibidores efetivos para as demais mutações em KRAS e sua alta prevalência no PDAC, faz-se necessário cada vez mais ampliar o conhecimento sobre seus efetores e vias moleculares que contribuem para a tumorigênese e malignidade do PDAC, visando a inibição indireta deste oncogene (WATERS; DER, 2018).

### 2.3 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucleico (RNA) fita simples, não-codificantes, que contêm entre 21 e 25 nucleotídeos e que possuem expressão anormal em diferentes cânceres humanos, incluindo PDAC (ADAMS; KASINSKI; SLACK, 2014; PENG; CROCE, 2016; ZOU *et al.*, 2019). Eles participam da regulação gênica pós-transcricional, atuando no silenciamento da expressão gênica ao se ligar aos RNAs mensageiros (mRNAs), formando um trecho de RNA dupla fita que pode então bloquear a tradução e/ou levar a degradação do mRNA alvo através da atuação do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (BUSHATI; COHEN, 2007) (**Fig. 3**).

A interação entre miRNAs e mRNAs ocorre através do pareamento de 7 nucleotídeos da região 5' dos miRNAs (*seed sequence*) com sítios complementares na região 3' UTR (região não traduzida – *untranslated region*) dos mRNAs alvos, sendo importante salientar que um mesmo miRNA pode atuar em mais de um mRNA, assim como um mRNA também pode interagir com mais de um miRNA.

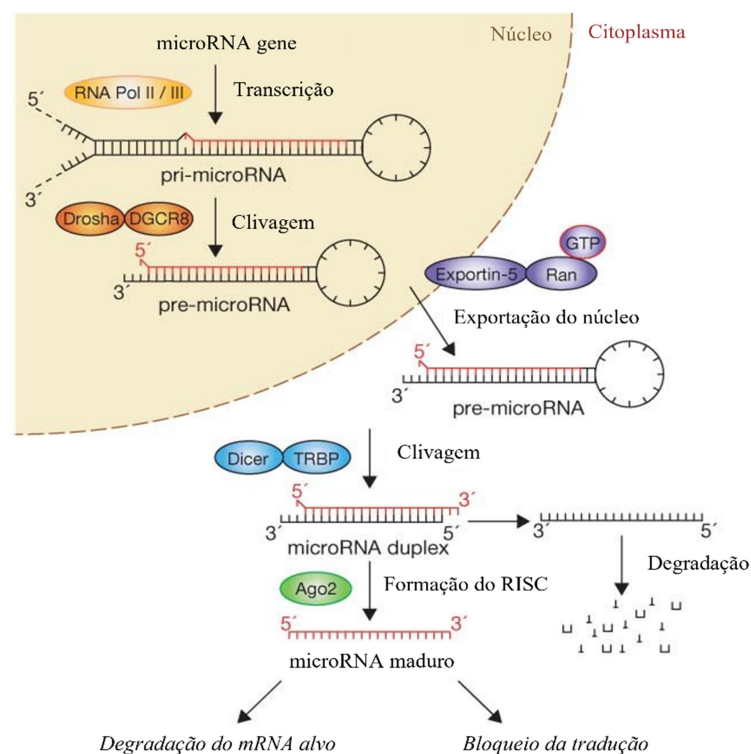


Figura 3. **Biogênese dos microRNAs.** A transcrição ocorre principalmente pela RNA polimerase II, originando o transcrito primário denominado pri-miRNA, que é processado pela Drosha resultando no pré-miRNA. Este é exportado para o citoplasma onde sofre o processamento pela Dicer, gerando um RNA dupla fita. Uma das fitas é degradada e a outra é complexada ao RISC, podendo assim bloquear a tradução do mRNA alvo ou degradá-lo. Adaptado de WINTER, J. *et al.*, 2009.

## 2.4 MicroRNAs e KRAS no PDAC

No câncer, os miRNAs podem atuar como supressores tumorais, inibindo a tradução de oncoproteínas; ou como miRNAs oncogênicos (oncomiRs), quando inibem a tradução de proteínas relacionadas à supressão tumoral, contribuindo para a transformação maligna e conseqüentemente para a progressão da doença (BARTEL, 2004; HE; HANNON, 2004; ZHOU; LIU; CAO, 2017). Utilizando análises de bioinformática do transcriptoma de 12 amostras de tecido pancreático (9 de PDAC e 3 não tumorais), VILA-CASADESÚS *et al.* (2018) foram capazes de estimar 17.401 interações miRNA-mRNA relevantes para o câncer pancreático, destacando a complexidade das interações miRNA-mRNA em PDAC e o desafio de identificar alvos mais relevantes para o desenvolvimento terapêutico.

A associação de miRNAs com KRAS no PDAC é extensivamente explorada em diversos trabalhos da literatura. A exemplo temos que a expressão dos miR-96, miR-126 e miR-217 encontram-se reduzidas em amostras de PDAC mutantes para KRAS tanto de pacientes quanto em linhagens celulares, sendo os níveis de KRAS diminuídos pela superexpressão individual de cada um desses três miRNAs, resultando na redução da proliferação celular, migração e invasão (JIAO *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010). KENT *et al.* (2010) mostraram em linhagens celulares pancreáticas tumorais e não tumorais, que a perda da expressão do cluster miR-143/145, observada no PDAC, é causada pela KRAS oncogênica de maneira dependente da sua proteína efetora RREB1 (*Ras Responsive Element Binding protein 1*), a qual se liga ao promotor desse cluster, reprimindo a sua expressão. Em contrapartida, a reexpressão desses miRNAs diminui os níveis de KRAS e RREB1, inibindo a tumorigênese em ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo xenográfico (KENT *et al.*, 2010).

Além disso, já está estabelecido que a família de miRNAs Let-7 regula negativamente a expressão de KRAS, sendo os primeiros miRNAs descobertos que possuem vários sítios distintos no 3'UTR de KRAS (JOHNSON *et al.*, 2005). Vários estudos mostraram diminuição significativa da expressão de let-7 em amostras de câncer pancreático em comparação com tecidos normais adjacentes ao tumor, sendo a perda de expressão de let-7 correlacionada a formas mais agressivas da doença, tornando esses pacientes inelegíveis a ressecção cirúrgica (TORRISANI *et*

*al.*, 2009). Eles também observaram que a superexpressão ectópica de let-7 no PDAC diminui significativamente a expressão de KRAS e inibe a via das MAPK com diminuição concomitante na proliferação celular. No entanto, a superexpressão de let-7 falha em inibir o crescimento e progressão do tumor (TORRISANI *et al.*, 2009).

Apesar da extensa literatura sobre miRNAs que se apresentam reduzidos no PDAC devido ação supressora tumoral por alvejarem KRAS e/ou suas proteínas de vias a jusante, a identificação de miRNAs como efetores de KRAS (oncomiRs) ainda permanece pouco explorada (RACHAGANI *et al.*, 2015; RONCARATI *et al.*, 2019; TESFAYE; AZMI; PHILIP, 2019).

### **3. OBJETIVOS**

Assim, nosso objetivo foi identificar miRNAs regulados pela KRAS oncogênica que possam contribuir para características tumorais em PDAC, ampliando assim nosso conhecimento ainda escasso sobre como a KRAS atua na via dos miRNAs para promover o fenótipo maligno e potencialmente fornecendo novos biomarcadores para auxiliar no diagnóstico/prognóstico.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Linhagens celulares e condições de cultura celular**

A linhagem celular primária de epitélio ductal pancreático humano imortalizada com proteínas HPV E6 e E7 (HPDE), e sua versão modificada para expressar a KRAS<sup>G12V</sup> (HPDE-KR) foram cultivadas em meio K-SFM (Invitrogen) suplementado com 2,5µg de EGF e 25mg de Extrato de Pituitária Bovina. As linhagens celulares humanas de PDAC: AsPC-1 (KRAS<sup>G12D</sup>; ATCC CRL-1682) e BxPC-3 (KRAS<sup>WT</sup>; ATCC CRL-1687) foram cultivadas em meio RPMI1640; PANC-1 (KRAS<sup>G12D</sup>; ATCC CRL-1469) e Mia-PaCa-2 (KRAS<sup>G12C</sup>; ATCC CRL-1420) foram cultivadas em meio DMEM, suplementando-se 10% de soro fetal bovino (SFB) em todas as linhagens de PDAC, sendo para a Mia-PaCa-2 ainda acrescentado 2,5% de soro de cavalo. Todas as células foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência máxima de 80%.

Para separação das células e seu replaqueamento para subcultura e experimentos, as células aderidas foram previamente lavadas com solução de PBSA e incubadas por 5 minutos com tripsina 0,1% em PBSA acrescido de 2mM de EDTA. Após a perda de adesão das células à placa, a inativação da tripsina foi feita pela adição de meio de cultura completo (com 10% SFB) ou meio RPMI1640 contendo 1mg/ml de inibidor de tripsina de soja (no caso da HPDE e HPDE-KR), sendo a suspensão de células centrifugada a 300g por 5 minutos e descartado o sobrenadante. O *pellet* de células foi ressuscitado no meio de cultura apropriado para cada linhagem, sendo o número de células vivas contabilizado na câmara de Neubauer com auxílio do azul de Tripán na proporção 1:1.

#### 4.2 Ensaio de microarranjo de miRNAs

Este ensaio foi realizado anteriormente pelo nosso grupo e consta da tese de doutorado do aluno Mateus Aoki (AOKI, 2014). Resumidamente, a integridade das amostras de RNA foi confirmada pelo *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent Technologies) Nano Chip, aplicando-se 80-120 ng de RNA e procedendo-se apenas com as amostras que apresentaram RIN>7. O ensaio de microarranjo foi realizado usando a lâmina AMADID 029297 Human miRNA Release 14.0 (Agilent Technologies), em quadruplicado para cada linha celular (HPDE ou HPDE-KR) e seguindo o protocolo do fabricante. As lâminas foram escaneadas com resolução de 5 µm usando DNA Microarray Scanner com tecnologia de alta resolução SureScan (Agilent Technologies) e intensidades de fluorescência extraídas usando software de extração de recursos.

#### 4.3 Predição de alvos e sítios dos miRNAs

Os alvos dos miRNAs estudados foram identificados usando o banco de dados QIAGEN *Ingenuity Pathways Analysis*. O número de sítios e localização de cada sítio para cada miRNA estudado na sequência 3'UTR de PTEN foram determinados através do banco de dados miRtarbase (<https://miRtarbase.cuhk.edu.cn/>), que reúne os sítios preditos pelo algoritmo *miRanda* (desenvolvido pelo *Computational Biology Center of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*) com base no *score* de pareamento da *seed sequence* de cada miRNA de interesse contra a região 3'UTR de diversos mRNA humanos. Para

a predição do heteroduplex (miRNA-mRNA) e sua energia mínima de ligação usamos o *Interactive Prediction of RNA22 v2* (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>) com as seguintes configurações: mínimo de 10 pares de bases; energia de máxima de -5 Kcal/mol e sensibilidade 63% vs especificidade 61% (*default*).

#### 4.4 Análise de proteínas por *Western Blotting*

As células foram lisadas em tampão RIPA (20mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40) contendo inibidor de protease (Roche) e inibidor de fosfatase (*Cocktail phosphatase inhibitor*, Sigma) e a concentração de proteínas totais quantificada pelo método Bradford. Alíquotas contendo 120 µg de proteína total foram misturadas o *Laemmli buffer* 1x (62,5mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e azul de bromofenol) e fervidas a 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras contendo 30 µg de proteína total foram submetidas a eletroforese em géis de SDS-poliacrilamida a 10-12% (120V) e transferidas para membranas de PVDF (15V por 15h). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com 5% de albumina sérica bovina (BSA) em TBS-Tween20 (TBS-T) e incubadas com os respectivos anticorpos primários (diluídos na solução de bloqueio acrescida de 0,01% de Azida sódica) *overnight* a 4°C, lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários conjugados a HRP. Para emissão de quimioluminescência utilizamos o substrato *ECL Supersignal West Pico Plus* (Thermo Fischer Scientific) com a visualização e captura do sinal pelo equipamento *ChemiDoc MP Image System* (Bio-Rad).

A quantificação das bandas de *western blotting* foi realizada no *software ImageJ* e primeiro foi feita a normalização de todas as amostras através da divisão do valor obtido para a banda corada com anticorpo de interesse pelo valor obtido para a banda corada com anticorpos para proteínas de expressão constitutiva (GAPDH ou α-Tubulina). Em seguida as amostras teste foram comparadas à amostra controle, cujo valor obtido após a normalização foi ajustado arbitrariamente para 1,0, sendo os números apresentados abaixo das bandas nas figuras. Os anticorpos utilizados e suas diluições encontram-se na tabela abaixo.

ALVO	Fabricante	Código	Diluição
<b>Anticorpos primários</b>			
<b>PTEN</b>	Cell Signaling	#9556	1:1000
<b>Pan-RAS</b>	Calbiochem	#OP40	1:2000
<b>GAPDH</b>	Cell Signaling	#5174	1:2000
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	Cell Signaling	#3873	1:2000
<b>Anticorpos secundários conjugados a HRP</b>			
<b>Anti-rabbit</b>	Promega	#W4011	1:3500
<b>Anti-mouse</b>	Promega	#W4021	1:3500

#### 4.5 Análise de co-expressão dos miRNAs em relação a PTEN e KRAS oncogênica

Para esta análise foram usados dados públicos de RNAseq e sequenciamento de exoma de câncer pancreático (*PAAD-US*, total de 177 amostras) disponíveis no TCGA (*The Cancer Genoma Atlas*), que foram recuperados através do *Genomic Data Commons Data Portal* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Os dados de expressão normalizados em fragmentos por kilobase por milhão (FPKM) para mRNAs e *reads* por milhão de leituras mapeadas (RPM) para miRNAs foram obtidos e analisados de forma cruzada. Esses dados foram usados para investigar associações entre a presença de mutações oncogênicas de KRAS detectadas através de análise do exoma e os níveis de expressão de miRNAs em PDAC. De maneira semelhante, o mesmo conjunto de dados foi usado para avaliar a co-expressão de PTEN e alguns miRNAs selecionados para gráfico de dispersão e correlação de Pearson usando um limite de significância de  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Extração de RNA total e transcrição reversa

O RNA total foi isolado usando o reagente TRIzol (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, seguido do tratamento com DNase I (Invitrogen) por 15 minutos para eliminação de contaminações com DNA genômico. A inativação da DNase I foi realizada através da adição de EDTA (2,5 mM) seguido de tratamento térmico a 65°C por 10 minutos. Para mRNAs, a transcrição reversa foi realizada com 1  $\mu$ g de RNA total utilizando a transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) e para os miRNAs, a transcrição reversa foi realizada com 2  $\mu$ g de RNA total utilizando o kit miScript RT II (Qiagen), também seguindo os protocolos dos respectivos fabricantes.

#### 4.7 Análise de expressão relativa por RT-qPCR

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher) utilizando 6  $\mu$ l SYBR® Green master mix (Thermo Fisher Scientific), 15 ng do respectivo cDNA e 200-400 nM dos primers *forward* e *reverse* para o gene de interesse em um volume final de 12  $\mu$ l por poço. As curvas de *melting* de cada produto amplificado foram analisadas para avaliar a especificidade das reações de amplificação e detectar a presença de eventuais contaminações ao comparar os  $T_m$  das reações completas com os controles sem cDNA (NTC) e controle sem transcriptase reversa (No RT). A quantificação relativa foi determinada pelo método  $\Delta\Delta C_t$  usando os genes humanos de expressão constitutiva, GAPDH ou U6A como controles endógenos. As sequências utilizadas para cada par de primers encontram-se listadas na Tabela abaixo.

Alvo	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Concentração por reação (nM)
KRAS	CCCAGGTGCGGGAGAGA	CAGCTCCAACCTACCACAAGTTT	200
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAAC	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT	200
miR-19b-3p	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA		400
miR-29a-3p	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA		400
miR-29b-3p	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT		400
miR-494-3p	TGAAACATACACGGGAAACCTC	Universal para os miRNAs com transcrição reversa com o kit miRScript (sequência não informada – Propriedade da QIAGEN)	400
miR-221-3p	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC		400
miR-205-5p	TCCTTCATCCACCGGAGTCTG		400
miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA		400
U6A	CTGCGCAAGGATGACACG		400

#### 4.8 Transfecções celulares

As diferentes linhagens celulares foram previamente semeadas em placas de 6 poços ( $1-2 \times 10^5$  células/poço) para aderirem. No dia seguinte, as células foram transfectadas transitoriamente com siRNAs (50nM), oligonucleotídeos dupla-fita miméticos de miRNA miRVana® *Mimics* (Invitrogen®) nas concentrações de 20nM (ensaio de luciferase) ou 5 nM (ensaio de colônia), oligonucleotídeos de RNA modificados com ação inibitória para miRNAs miRVana® *Inhibitors* (anti-miRs, Invitrogen®) na concentração de 50nM, 80ng do vetor pcDNA4 vazio (controle) ou



contendo KRAS G12V-HA (*tag*) usando o reagente de transfecção Lipofectamina 3000 (Invitrogen), seguindo em todos os casos o protocolo do fabricante. Para as transfecções com os siRNAs, Mimics e Anti-miRs, foram utilizadas moléculas controle, que não possuem similaridade com mRNAs humanos conhecidos (siRNA controle) ou que não possuem miRNAs alvos conhecidos (Mimics e anti-miRs controle). As extrações de RNA e proteínas foram realizadas 96 horas após a transfecção.

#### 4.9 Clonagem de inserto do 3'UTR de PTEN na *firefly* luciferase

Com base nos sítios preditos para os 7 miRNAs de interesse no 3'UTR de PTEN, selecionamos 4 regiões distintas da sequência 3'UTR de PTEN (insertos) para serem clonadas, de modo que obtivéssemos o enriquecimento máximo para os sítios previstos e limite de tamanho máximo de 1Kb. A clonagem de cada região foi feita por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com 200ng de cDNA de células AsPC-1, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 0,4 µL dNTPs (10 mM), 4 µL tampão com MgCl<sub>2</sub> e 200ng dos pares de primers abaixo, totalizando 25 µL. Para a amplificação no termociclador foram utilizados os seguintes ciclos: 94 °C por 3 min para desnaturação do DNA, 35 ciclos (94°C – 45 s, 62°C – 1 min, 72°C – 1 min), 72°C por 10 min e mantença a 10°C. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão descritos na tabela abaixo.

<b>PTEN 3'UTR</b>	<b><i>Primer foward (5'-3')</i></b>	<b><i>Primer reverse (5'-3')</i></b>
<b>INSERTO 1</b>	<u>ATGCTAGCTCCTGACCAATCTTGTTTACCC</u>	<u>ATAGTCGACGCCATTCTTTGTTGATAGCCT</u>
<b>INSERTO 2</b>	<u>ATGCTAGCCTGTGGATGCTTCATGTGCT</u>	<u>ATCCTGCAGGAATGCTGCTCTAGTAGGTCCT</u>
<b>INSERTO 3</b>	<u>ATGCTAGCATTTCGGGCACCGCATATTA</u>	<u>ATCCTGCAGGGGTAAACGAGGCACTTTGTG</u>
<b>INSERTO 4</b>	<u>ATGCTAGCATATGAAGTGATGTGTACA</u>	<u>ATCCTGCAGGAGGTGATAGGATTATGAGTG</u>

As bases sublinhadas foram inseridas para gerar sítios para as enzimas de restrição NheI e SbfI para clonagem no vetor de interesse.

Para ligação, utilizamos a razão molar de 1 do vetor pmirGLO linearizado (150 ng) para 8 insertos, ambos previamente digeridos com as enzimas de restrição NheI e SbfI a 37°C por 3h. As reações de ligação foram realizadas com 2U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 4°C *overnight*. Para transformação bacteriana, 5µL do produto da ligação foram adicionados a 50µL bactérias quimocompetentes DH5α,

seguido do choque térmico, recuperação e plaqueamento com seleção de 50µg/ml de ampicilina. Para confirmação de colônias bacterianas que continham os plasmídeos com os respectivos insertos, procedemos com PCR de colônia utilizando o mesmo protocolo e primers utilizados na geração dos insertos. Por fim, os plasmídeos foram purificados pelo kit PureLink midPrep (Invitrogen) e a sequência de cada inserto confirmada por sequenciamento de Sanger realizado pelo serviço de sequenciamento do Instituto de Biociências (IB-USP), não havendo alterações de bases dentro da sequência dos sítios preditos para o miRNAs. A sequência completa do 3'UTR de PTEN e de cada inserto encontra-se no **Anexo 1**.

#### **410 Ensaio de Luciferase**

Para o *knockdown* de KRAS,  $5 \times 10^4$  céls/poço foram plaqueadas em placas de 24 poços e transfectadas com 20nM de siRNA CTRL ou *smartpool* de KRAS. Alternativamente, o mesmo número de células foram transfectadas com 20nM dos anti-Mirs ou 20nM dos mimics. Após 48h em ambos os casos, as células foram transfectadas com 300ng do vetor pmirGlo original (sem inserto) ou contendo um dos 4 diferentes insertos por 24h, tempo no qual as células foram lavadas uma vez com PBSA e em seguida lisadas com 200µl do PLB (*Passive Lysis Buffer*) por poço por 20min temperatura ambiente. Para medição da atividade de luciferase, 20µL/poço dos lisados foram colocados em placas brancas de 96 poços (Greiner) e colocadas no leitor SpectraMaxL (Molecular Devices), seguindo o protocolo do equipamento para o kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), após a injeção automatizada e leitura dos substratos para luferases *Firefly* e *Renilla*, sendo o sinal da *Firefly* normalizado pelo sinal da *Renilla* (razão *Firefly/Renilla*).

#### **4.11 Ensaio de colônia**

As células AsPC-1 foram semeadas transfectadas com 5nM do mimic miR-19b ou miR-CTRL (controle) ou transfectadas com 50nM do inibidor de miRNA (anti-miR) para o miR-19b-3p ou anti-miR-CTRL (controle). Após 48h de transfecção, 2.500 células/placa foram semeadas em placas de 60 mm e as células foram cultivadas por 14 dias. As placas foram então lavadas com PBS, fixadas com metanol por 20 minutos, seguindo-se a coloração das colônias com cristal violeta 0,5% preparado em solução de água e metanol (proporção 80:20) por 20 minutos. Após isso, as placas foram lavadas três vezes com PBS e secas à temperatura

ambiente. Cada placa foi fotografada com câmera de celular de 12MP na mesma distância e zoom, prosseguindo com a contagem do número de colônias, realizada manualmente no *software ImageJ* utilizando as fotos e a ferramenta *Cell counter*.

#### **4.12 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo**

Para este ensaio, as células AsPC-1 foram transfectadas com os anti-miRs CTRL e 19b-3p como relatado no item 4.8. Após 24h da transfecção, as células foram replaqueadas em placa de 6 poços ( $5 \times 10^4$  células/poço) e tratadas com o quimioterápico gencitabina nas concentrações de 5 $\mu$ M ou 10 $\mu$ M pelo período de 72h. As células foram, então, tripsinizadas e centrifugadas a 300 x *g* por 5min. O pellet de células foi então ressuspendido em 100 $\mu$ l tampão contendo Anexina V-FITC (diluição 1:20) e o corante 7-AAD (1:20), incubado por 30 min ao abrigo da luz à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e o pellet ressuspendido em 300 $\mu$ l de PBS, seguido de leitura no citômetro *Accuri* (BD). Alternativamente, para os controles positivos de marcação para morte celular, as células sem transfecção e tratamento com gencitabina, foram incubadas a 60°C por 10min antes de proceder com a marcação para Anexina V-FITC ou 7-AAD.

#### **4.13 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados plotados no *software GraphPad Prism 9* para geração de imagens gráficas e onde foi realizada a análise estatística, sendo cada teste estatístico indicado nas legendas. Nos experimentos de análise de microarranjo, os dados gerados foram normalizados e analisados pelo método Lowess ou SVR com correção FDR (*false discovery rate*), sendo o microRNA detectado em pelo menos 3 dos 4 arranjos realizados.

## 5. RESULTADOS

Para avaliar quais microRNAs estariam associados à KRAS oncogênica, nosso grupo realizou anteriormente um ensaio de microarranjo para miRNAs usando a linhagem celular epitelial ductal pancreática humana não transformada (HPDE) e sua contraparte isogênica HPDE-KR, que expressa KRAS com mutação no códon 12 (G12V) (AOKI, 2014). Os resultados entre HPDE vs HPDE-KR, mostrados na **Tabela 1**, identificaram 17 miRNAs regulados positivamente por KRAS (*fold-change* >1,0) no HPDE-KR em comparação com HPDE (KRAS selvagem). Visando identificar os alvos principais regulados por estes miRNAs, o nosso grupo, usando o banco de dados *QIAGEN Ingenuity Pathways Analysis*, identificou a fosfatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) como o alvo regulado pelo maior número de miRNAs identificados (**Tabela 2**), sendo regulado por 7 dos 17 miRNAs aumentados por KRAS identificados na análise de microarranjo (AOKI, 2014).

De fato, olhando mais especificamente para a regulação do PTEN por KRAS, observamos claramente que KRAS regula negativamente os níveis da proteína PTEN (**Fig. 4**). No modelo de linhagens isogênicas HPDE/HPDE-KR (**Fig. 4-A**), a expressão de KRAS oncogênica na HPDE-KR leva à diminuição de cerca de 80% nos níveis de PTEN, mesmo sem aumento significativo nos níveis de RAS, corroborando os dados obtidos pela análise de microarranjo. Para validar esta regulação em linhagens pancreáticas tumorais oriundas de pacientes, nós utilizamos as linhagens AsPC-1, Mia PaCa-2 e PANC-1, todas portadoras de formas oncogênicas da KRAS, e observamos que, quando a expressão de KRAS é diminuída (*knockdown*) por siRNA (**Fig. 4-B**) ou shRNA induzível por doxíciclina (**Fig. 4-C**), os níveis de PTEN aumentam de 1,5-3,1 vezes dependendo da linhagem. Além disso, ocorre também uma diminuição de 25 e 40% de PTEN frente a superexpressão de KRAS mutante em nas linhagens AsPC-1 e PANC-1 respectivamente, confirmando que os níveis de PTEN são regulados negativamente por KRAS.

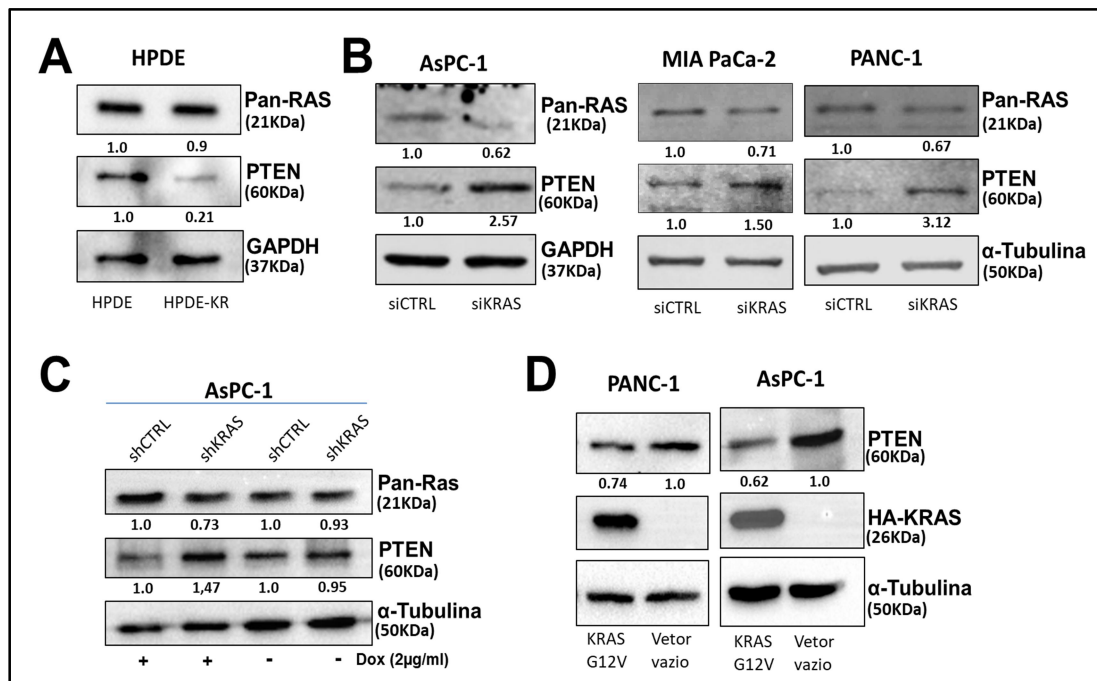
**Tabela 1. A análise de microarranjo revelou 17 miRNAs regulados positivamente em células pancreáticas que expressam KRAS oncogênico. (Modificado de AOKI, 2014).**

microRNA	Sinal médio HPDE	Sinal médio HPDE-KR	p value não corrigido	p value corrigido FDR	Fold change
miRNA -100-5p	*	9.844	0.0002	0.0128	**
miRNA -29a-3p	168.681	432.808	0.0003	0.0128	2.566
miRNA -29b-3p	43.400	274.918	0.0003	0.0128	6.335
miRNA -363-3p	*	10.164	0.0003	0.0128	**
miRNA -720	3456.750	4833.638	0.0002	0.0128	1.398
miRNA -22-3p	38.516	161.134	0.0005	0.0167	4.184
miRNA -183-5p	0.879	7.692	0.0007	0.0195	8.750
miRNA -21-5p	236.236	482.507	0.0007	0.0195	2.042
miRNA -494	271.234	656.405	0.0008	0.0195	2.420
let-7b-5p	402.007	574.311	0.0010	0.0215	1.429
miRNA -132-3p	*	12,714	0.0012	0.0234	**
miRNA -130a-3p	12.312	42.799	0.0022	0.0344	3.476
miRNA -139-3p	103.460	18.922	0.0024	0.0344	0.183
miRNA -205-5p	474.366	1295.935	0.0021	0.0344	2.732
miRNA -29c-3p	22.585	76.553	0.0024	0.0344	3.390
miRNA -19b-3p	*	10.268	0.0028	0.0377	**
miRNA -130b-3p	1.532	11.325	0.0031	0.0393	7.392

\* Expressão nula

**Tabela 2. Análise global de alvos de miRNA regulados positivamente por KRAS.** Modificado de: (GOMES FILHO, 2019)

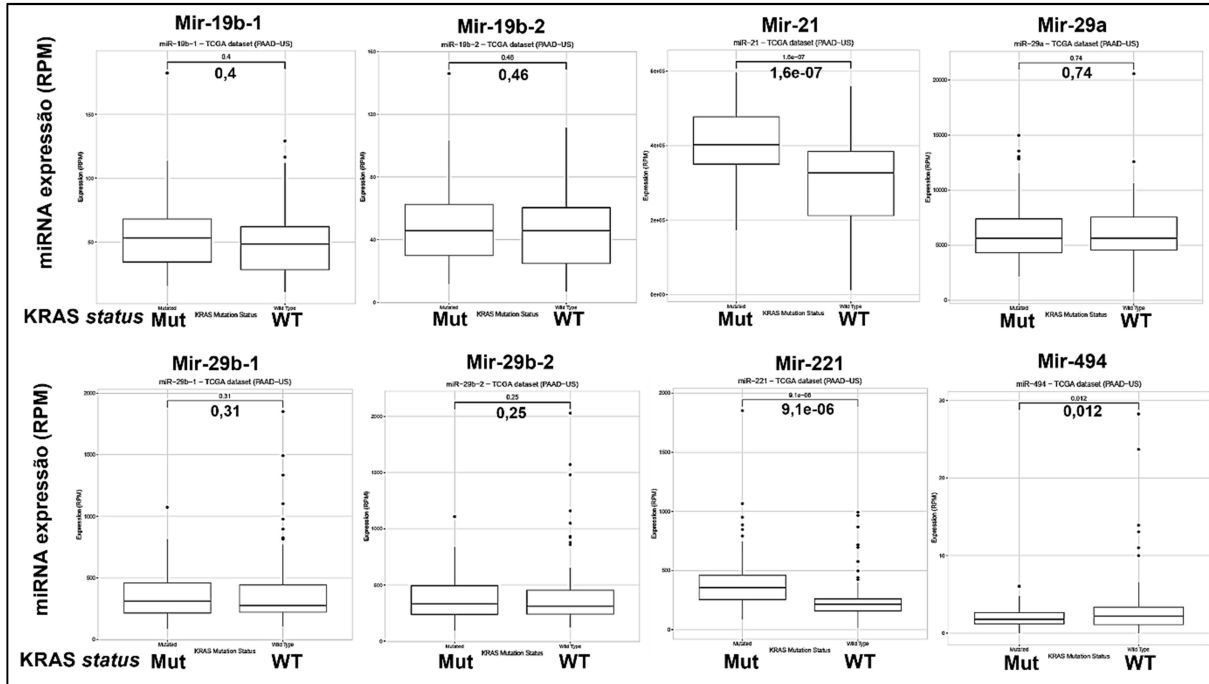
Alvo	nº de miRNAs	miRNAs
PTEN	7	miR-29a-3p, miR-494-3p, miR-29b-3p, miR-221-3p, miR-21-5p, miR-205-5p, miR-19b-3p
HIPK3	3	miR-29a-3p, miR-21-5p, miR-19b-3p
BMPR2	3	miR-29a-3p, miR-21-5p, miR-19b-3p
PIK3R1	3	miR-29b-3p, miR-221-3p, miR-21-5p
ESR1	3	miR-221-3p, miR-22-3p, miR-19b-3p
CDK6	3	miR-29b-3p, miR-21-5p, let-7a-5p
BCL2L11	3	miR-29a-3p, miR-221-3p, miR-19b-3p



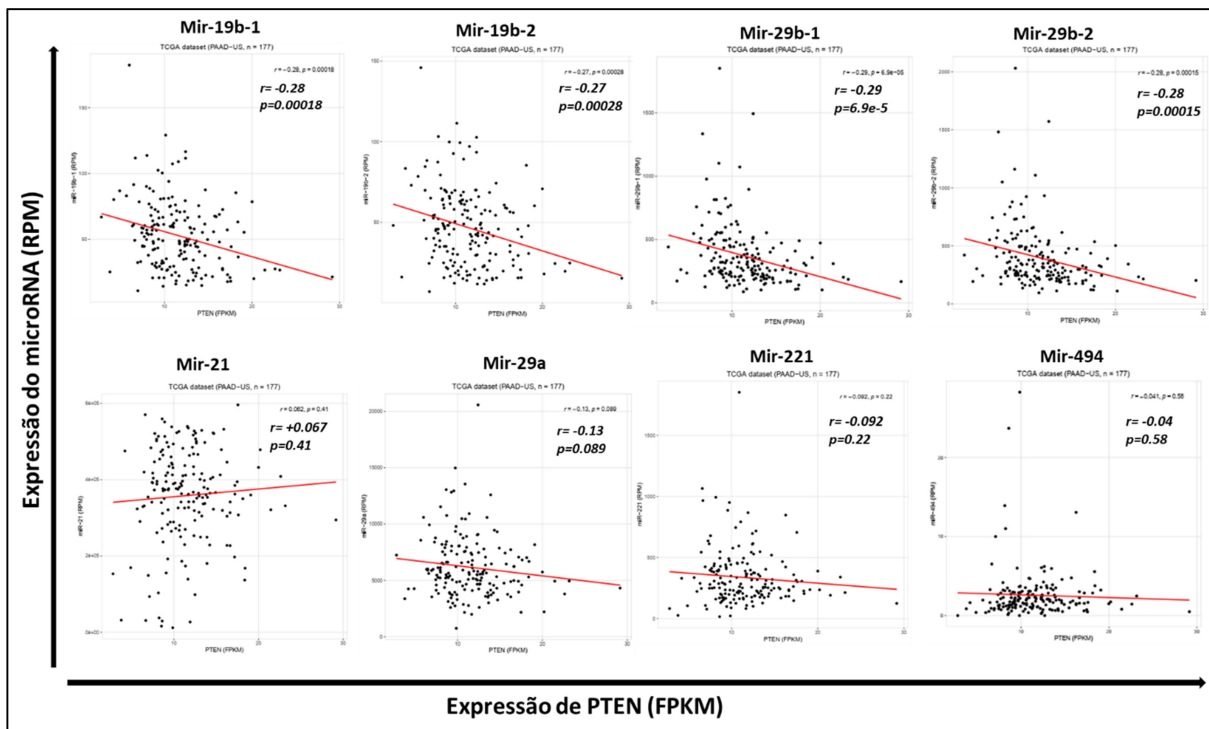
**Figura 4. Regulação negativa do PTEN por KRAS em diferentes modelos de linhagens de células pancreáticas.** (A) Análise por *Western blotting* com os anticorpos indicados de extratos proteicos da linhagem celular epitelial ductal não tumoral (HPDE) e sua forma celular isogênica expressando KRAS<sup>G12V</sup> oncogênica (HPDE-KR); (B) As células PANC-1, MIA PaCa-2 e AsPC-1 foram transfectadas com siRNA sem alvos conhecidos (siCtrl) ou siRNA *SMARTpools* para KRAS (siKRAS). Os extratos proteicos foram coletados 72 horas após a transfecção e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados; (C) As células AsPC-1 expressando induzivelmente um shRNA controle sem alvos conhecidos (shCtrl) ou um shRNA para KRAS (shKRAS) foram tratadas com 2 µg/mL de doxiciclina (Dox) por 48h e os extratos proteicos foram coletados e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados; (D) As células PANC-1 e AsPC-1 foram transfectadas com o vetor pGL4 que leva a expressão constitutiva de KRAS<sup>G12V</sup> fusionada a HA (HA-KRAS). Os extratos proteicos foram coletados 72 horas após a transfecção e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas foram normalizadas pelo controle endógeno (GAPDH ou α-Tubulina) e a quantificação relativa das bandas proteicas foi feita em relação à amostra referência em cada caso (HPDE, siCtrl, shCtrl ou vetor vazio) usando o *software* ImageJ. As imagens mostradas são representativas de 3 experimentos independentes.

Em sequência decidimos investigar no banco de dados de amostras de PDAC do TCGA (*The Cancer Genome Atlas - NCBI*) PAAD-US (n=119) como se dá a expressão destes 7 miRNAs em relação a KRAS mutante vs selvagem (**Fig. 5**), bem como se existe correlação entre a expressão destes miRNAs e a expressão de PTEN (**Fig. 6**). Apenas o miR-21 e o miR-221 apresentaram aumento significativo de expressão em pacientes portadores de mutação em *KRAS* em relação a pacientes portadores da versão selvagem. Entretanto, os miRNAs 19b e 29b também apresentaram pequeno aumento de expressão nas amostras com mutação em *KRAS*, que não foi significativo, talvez pelo número reduzido (n=26) de pacientes portadores da versão selvagem da *KRAS*.

Com relação a correlação de expressão com PTEN, apenas o miR-19b e o miR-29b demonstraram correlação negativa significativa de expressão em torno de 30% com PTEN. Cabe ressaltar aqui, que os dados do TCGA não distinguem os miRNAs maduros (3p e 5p) dos seus precursores (miRNAs dupla fita e pré-miRNAs), o que dificulta uma comparação direta com os dados gerados no microarranjo em que detectamos especificamente as fitas simples, que são as funcionais de fato. Além disso, ressaltamos que os números 1 e 2, que aparecem a frente do miR-19b e miR-29b, servem para designar 2 miRNAs com genes distintos, com alto grau de similaridade de sequência, com diferenças na fita 5p, mas codificando fitas 3p idênticas.



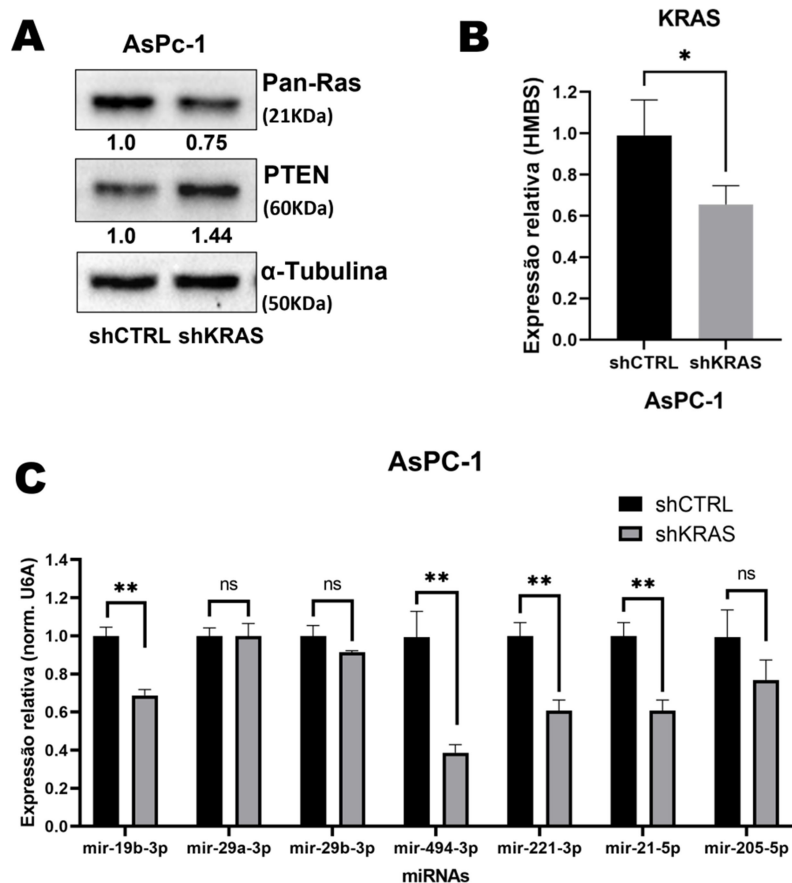
**Figura 5.** O miR-21 e o miR-221 apresentam expressão aumentada em amostras de pacientes portadores de PDAC com KRAS mutante no banco de dados do TCGA. Box plots com a expressão de cada miRNA dada pela contagem de *reads* normalizadas por milhão (RPM) extraída do *miRNAseq* do conjunto de dados de amostras de pacientes com PDAC do TCGA, subdivididos entre KRAS mutante (Mut, n = 93) e selvagem (WT, n = 26). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de Mann-Whitney. O miR-205 não demonstrou expressão nas nossas análises.



**Figura 6.** MiR-19b e MiR-29b apresentam correlação negativa de expressão com PTEN em amostras de pacientes portadores de PDAC disponíveis no TCGA. Gráficos de dispersão da expressão normalizada de PTEN em unidades FPKM (eixo x) e a expressão de cada miRNA em unidades RPM (eixo y) detectados no conjunto de dados do TCGA (n=119). Os scores de correlação de Pearson (r) e valor p (p) foram calculados separadamente para cada conjunto de dados e medem a correlação dos pontos com a linha de tendência e significância desta correlação, respectivamente.



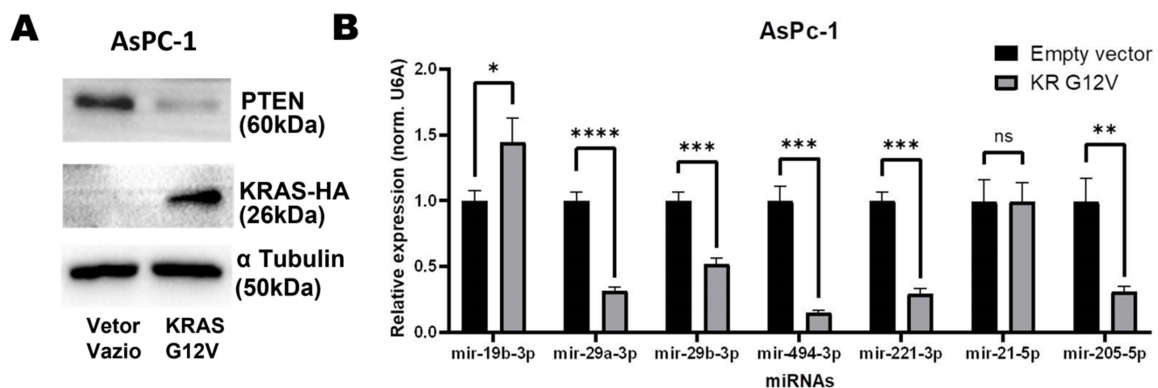
Como os estudos correlativos acima não demonstram causalidade, para confirmar se KRAS regula positivamente os 7 miRNAs que tem PTEN como alvo predito em um contexto de PDAC, nós inibimos a expressão de KRAS por interferência de RNA na linhagem celular de adenocarcinoma pancreático AsPC-1 portadora de KRAS<sup>G12D</sup> e avaliamos se esta inibição afetava a expressão dos miRNAs de interesse (**Fig. 7**). Primeiramente, usando esta abordagem nós observamos uma redução de 25% na expressão proteica com o anticorpo anti-panRas, que detecta as 3 isoformas de RAS (HRAS, KRAS e NRAS) (**Fig. 7-A**). Para determinar com mais acurácia o nível de redução de expressão de KRAS, nós realizamos qPCR com primers específicos para KRAS e observamos uma redução de aproximadamente 35% na expressão de KRAS nas células AsPC-1 expressando o shRNA para KRAS em relação ao controle (**Fig. 7-B**). Esta redução na expressão de KRAS foi acompanhada por uma redução significativa (entre 32-62%) da expressão de 4 dos 7 miRNAs avaliados (**Fig. 7-C**).



**Figura 7. A inibição de KRAS reduz a expressão de miRNAs que tem PTEN como alvo.** A linhagem celular AsPC-1 transduzida com vetores lentivirais para expressão induzível por doxiciclina de *short-hairpin RNA* controle sem alvo existente (shCTRL) ou direcionado a KRAS (shKRAS) foi tratada com doxiciclina (2 $\mu$ g/ml) por 96h, seguida da extração de RNA e proteína. (A) Os extratos proteicos foram analisados através de *Western Blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas foram quantificadas e normalizadas pelas amostras de referência (shCTRL). (B e C) A expressão de KRAS (B) e dos miRNAs de interesse (C) foi analisada por RT-qPCR como indicado na figura. A expressão relativa

de KRAS foi normalizada por HMBS e as dos miRNAs normalizadas por U6A. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* (NS, não significativo,  $^{**}p<0.01$ ) comparando o grupo shCTRL com o grupo shKRAS.

Além destes experimentos de perda de função de KRAS, também realizamos um experimento de ganho de função de KRAS, aonde transfectamos a linhagem AsPC-1 com um vetor que leva à superexpressão da KRAS<sup>G12V</sup> fusionada a um epítipo HA e avaliamos a expressão dos miRNAs de interesse (**Fig. 8-B**). A superexpressão da KRAS recombinante foi confirmada por Western Blotting (**Fig. 8-A**). No entanto, contrário ao esperado, 5 dos 7 miRNAs apresentaram expressão drasticamente reduzida nas células com superexpressão de KRAS, sendo que apenas o miR-19b-3p se comportou conforme o esperado apresentando um aumento significativo de expressão de cerca 45% (**Fig. 8-B**). Este comportamento inesperado na expressão da maioria dos miRNAs pode estar relacionado a expressão de KRAS mutante em níveis supra fisiológicos em uma linhagem já portadora de mutação em KRAS.

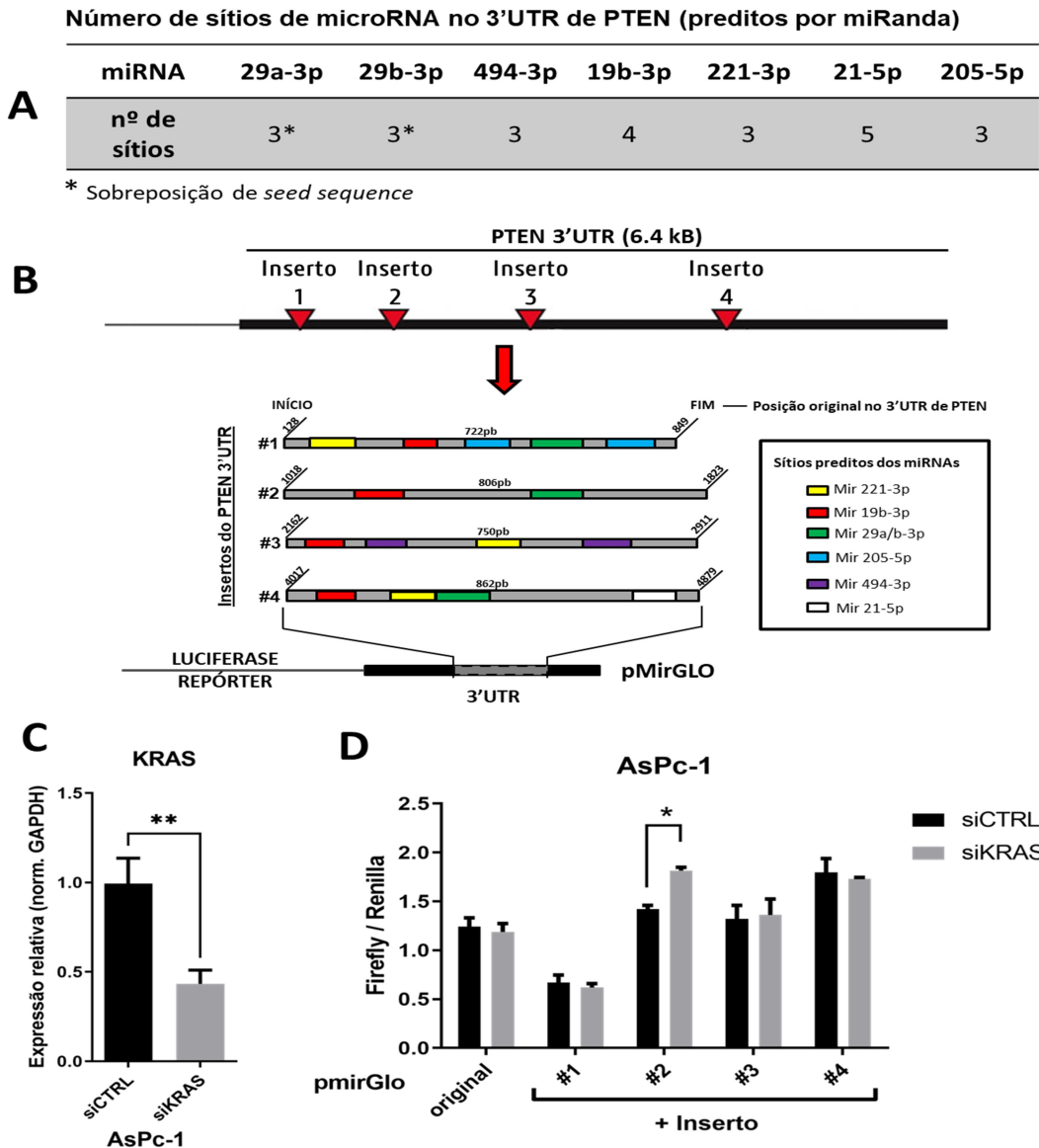


**Figura 8.** A superexpressão de KRAS<sup>G12V</sup> nas células AsPC-1 reduz a expressão da maioria dos miRNAs que tem PTEN como alvo. As células AsPC-1 foram transfectadas com 1 $\mu$ g do vetor pGL4 vazio (controle) ou contendo inserto para expressão de KRAS<sup>G12V</sup> fusionada ao epítipo HA (KR-G12V). (A) Os extratos proteicos foram coletados 72h após a transfecção e analisados através de *Western blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas foram quantificadas e normalizadas pelas amostras de referência (Vetor vazio). (B) A expressão dos miRNAs de interesse foi analisada 72h após a transfecção por RT-qPCR como indicado na figura, sendo normalizada pelo controle endógeno U6A. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* (NS, não significativo,  $^{*}p<0,05$ ;  $^{**}p<0,01$  e  $^{***}p<0,001$ ) comparando o grupo Vetor vazio com o grupo KRAS G12V.

Desta forma, consideramos que os experimentos de perda de função são mais confiáveis por reduzir os níveis fisiológicos de KRAS presente nas células. Assim, tendo em vista que a inibição de KRAS leva simultaneamente a um aumento da expressão de PTEN (**Fig. 7A**) e à diminuição da expressão de miRNAs que tem PTEN como alvo (**Fig. 7C**), estes resultados sugerem que KRAS possa regular os níveis de

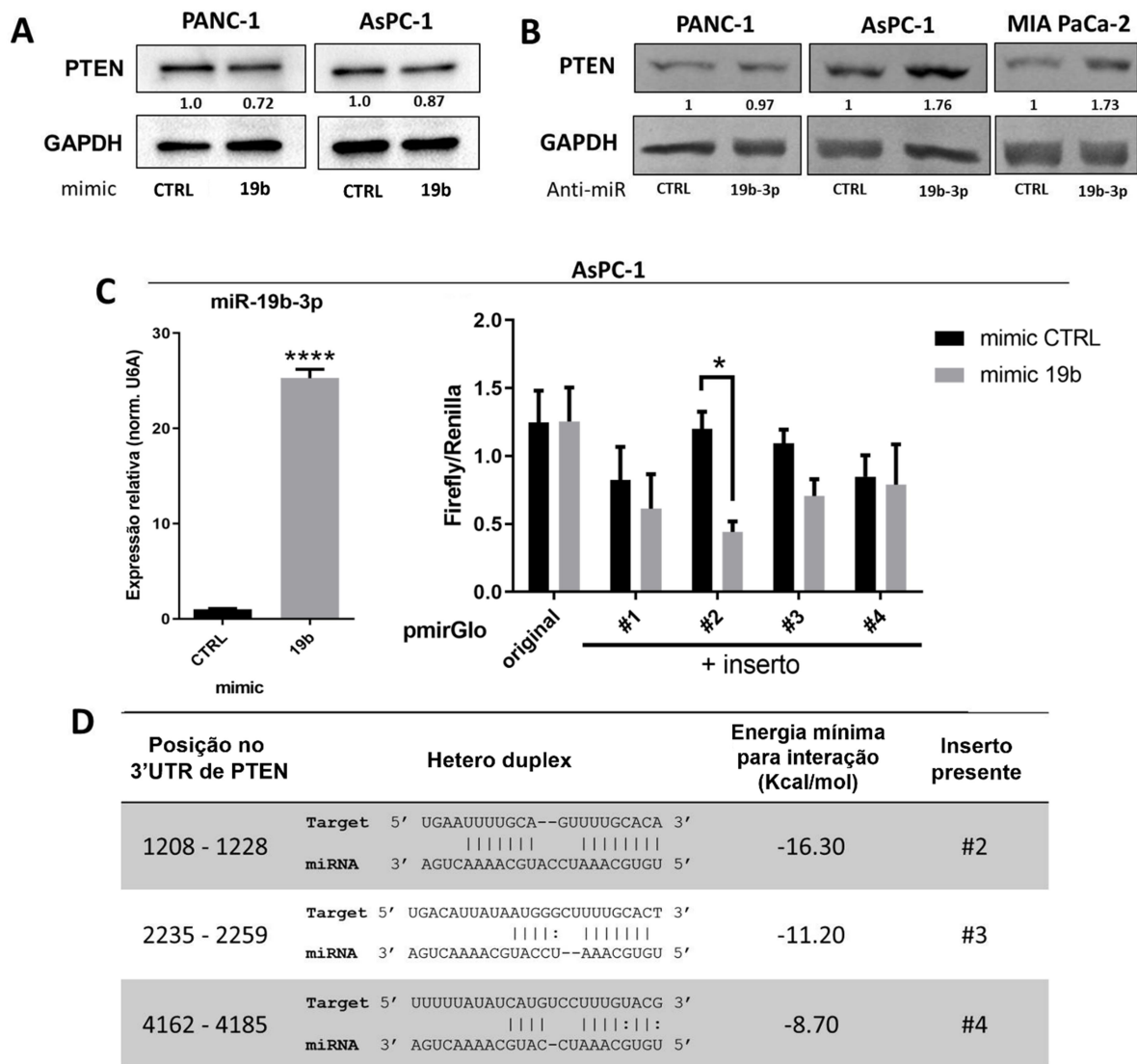
PTEN através da modulação destes miRNAs. Para confirmar esta hipótese é importante avaliar se KRAS consegue modular a expressão de PTEN através da região 3'UTR do mRNA de PTEN, que é a região principal que sofre modulação pelos miRNAs. Para tanto, nós resolvemos investigar como a inibição da expressão de KRAS nas células AsPC-1 afeta a expressão do gene repórter da luciferase contendo a região 3'UTR de PTEN. Como a região 3'UTR de PTEN é muito longa, tendo mais de 6 Kb, o que dificulta sua clonagem integral, nós inicialmente identificamos todos os sítios para miRNAs presentes no 3'UTR de PTEN através do *software miRanda*, usando o banco de dados miRTarBase (**Apêndice 1, Fig. 9A**). Com base nestes dados, a nossa estratégia foi amplificar independentemente 4 regiões diferentes do 3'UTR de PTEN de cerca de 1 Kb cada e inserir no sítio de clonagem do plasmídeo pmiRGlo, que se localiza no início da região 3'UTR do gene repórter *firefly* luciferase (**Fig. 9-B**). A escolha das regiões a serem clonadas foi com base no enriquecimento máximo de sítios previstos para interação com os miRNAs de interesse no limite de tamanho máximo de 1Kb.

Após a clonagem e verificação por sequenciamento de cada um dos 4 insertos no 3'UTR do gene repórter da *firefly* luciferase (**Fig. 9-B**), nós transfectamos cada construção na linhagem AsPC-1, realizamos a inibição da expressão de KRAS por interferência de RNA e medimos a atividade de luciferase (**Fig. 9-C**), sendo que o resultado esperado seria um aumento da atividade de luciferase frente à inibição de KRAS. Como resultado, pudemos distinguir que ocorreu um aumento da atividade da luciferase frente à inibição de KRAS apenas na presença do inserto #2, sugerindo que esta região contém sítios importantes para miRNAs regulados por KRAS. Dos 7 miRNAs estudados, o inserto #2 contém sítios previstos apenas para os miRNAs 29a/b-3p e 19b-3p (**Fig. 9-B**). Uma vez que os miRNAs 29a-3p e 29b-3p não parecem ser regulados por KRAS (**Fig. 7**) e o miR-19b-3p demonstrou ser regulado por KRAS tanto no experimento de perda de função (**Fig. 7**), quanto no experimento de ganho de função (**Fig. 8**), resolvemos focar os estudos subsequentes na caracterização funcional do miR-19b-3p.



**Figura 9. KRAS é capaz de regular a atividade do gene repórter da luciferase na presença da região 3'-UTR de PTEN.** (A) O número de sítios para cada miRNA de interesse na região 3'-UTR de PTEN preditos com base na complementaridade das "seed sequences" pelo algoritmo MiRanda, sendo consultado no banco de dados miRTarBase. (B) Esquema e posição das 4 regiões selecionadas para clonagem do 3'-UTR de PTEN e esquema da região onde estas regiões foram clonadas no plasmídeo pmiRGlo contendo o gene repórter da luciferase de vaga-lume. (C) Células AsPC-1 foram transfectadas com siRNA controle (siCTRL) ou *smartpool* de 5 siRNAs para inibição de KRAS (siKRAS) e, após 72h, foram transfectadas com o vetor pmiRGlo original (sem inserto) ou com o vetor pmiRGlo contendo cada um dos diferentes 4 insertsos. O RNA foi extraído 24h após a última transfecção e a expressão de KRAS foi avaliada por qPCR, sendo normalizada pelo controle endógeno U6A. (D) Células AsPC-1 foram transfectadas como descrito em (C) e lisados celulares preparados 24h após a última transfecção para avaliação da atividade enzimática da luciferase. A atividade da luciferase de vaga-lume foi normalizada pela atividade de luciferase Renilla (expressa constitutivamente através do vetor pmiRGlo que é um vetor dual) para controle dos níveis de transfecção. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* simples para expressão de KRAS e *Student-t* múltiplo para o ensaio de luciferase (NS, não significativo, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) comparando o grupo siCTRL com o grupo siKRAS.

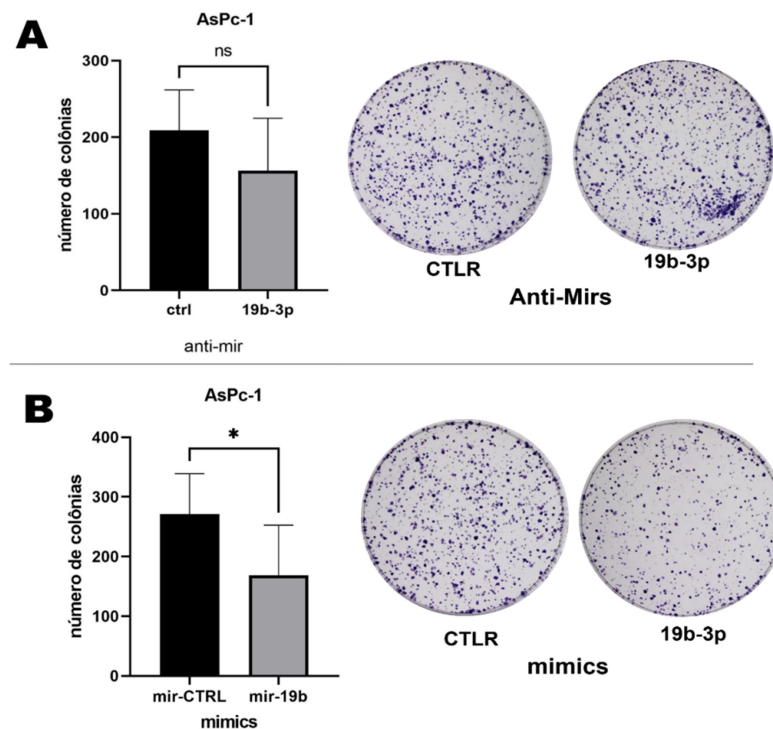
Inicialmente, avaliamos se o miRNA 19b é capaz de regular os níveis de PTEN. Para tanto, transfectamos linhagens pancreáticas com oligonucleotídeos inibidores de miRNA (anti-miRs) ou oligonucleotídeos dupla-fita miméticos de miRNA (mimics) para miR-19b-3p e miR-19b, respectivamente, e avaliamos como a perda ou ganho de função deste miRNA afeta os níveis de PTEN. Nós observamos uma diminuição dos níveis da proteína PTEN na presença de mimic miR-19b (**Fig. 10-A**) e um aumento de PTEN com inibição do miR-19b-3p endógeno (**Fig. 10-B**), confirmando que, em células oriundas de PDAC, PTEN é regulado negativamente por este miRNA. Além disso, para confirmar que o miRNA-19b regula diretamente a região 3'-UTR de PTEN, nós realizamos ensaio de luciferase com as 4 regiões do 3'-UTR de PTEN. Assim como observado para a inibição de KRAS, apenas o inserto #2 apresentou regulação significativa pelo miRNA-19b, sendo que a transfecção com mimic miR-19b levou a um aumento de cerca de 27x na sua abundância, enquanto simultaneamente reduziu a atividade da luciferase em cerca de 52% (**Fig. 10-C**). Estes resultados que mostram que o inserto #2 do 3'-UTR do PTEN é regulado pelo miRNA-19b, o que é corroborado pela análise da energia livre para formação de pareamento entre o miRNA-19b-3p e os sítios preditos presentes nos insertos estudados, que indicam que o sítio presente no inserto #2 apresenta maior afinidade pelo miR-19b-3p, apresentando a menor energia mínima para interação entre todos os 4 sítios previstos (**Fig. 10-D**). O sítio predito para o miR-19b-3p no inserto #1 não teve a energia mínima calculada pois está foi superior ao teto de -5 Kcal/mol do preditor microRNA RNA22 v2.



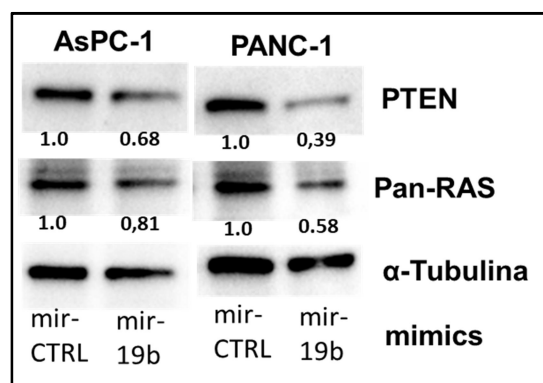
**Figura 10. O miR-19b-3p regula os níveis de PTEN.** (A) Para superexpressão do miRNA-19b, células AsPC-1 e PANC-1 foram transfectadas com 20 $\eta$ M de oligonucleotídeos dupla-fita miméticos (mimic) do miR-19b ou controle (miR-NC). Extratos proteicos foram preparados 24h após a transfecção e submetidos a Western Blotting com os anticorpos indicados. As bandas proteicas foram quantificadas e normalizadas pelas amostras de referência (mimic CTRL). (B) Para inibição do miR-19b-3p, células AsPC-1, PANC-1 e MiaPaCa-2 foram transfectadas com 50 $\eta$ M de oligonucleotídeos inibidores de miR (anti-miRs) para miR-19b-3p ou oligonucleotídeos controle (anti-miR-CTRL). Extratos proteicos foram preparados 24h após a transfecção e submetidos a Western Blotting com os anticorpos indicados. As bandas proteicas foram quantificadas e normalizadas pelas amostras de referência (anti-miR-CTRL). (C) Células AsPC-1 foram transfectadas com 20 $\eta$ M de oligonucleotídeos dupla-fita miméticos do miR-19b (mimic 19b) ou controle (mimic CTRL) e, após 72h, foram transfectadas com o vetor pmirGlo original (sem inserto) ou com o vetor pmirGlo contendo cada um dos diferentes 4 insertos. O RNA foi extraído após 24h e a expressão do miR-19b-3p foi avaliada por qPCR, sendo normalizada pelo controle endógeno U6A (painel esquerdo). Lisados celulares foram preparados 24h após a última transfecção para avaliação da atividade enzimática da luciferase (painel direito). A atividade da luciferase de vagalume foi normalizada pela atividade de luciferase Renilla (expressa constitutivamente através do vetor pmirGlo que é um vetor dual) para controle dos níveis de transfecção. (D) Sítios preditos para o miR-19b-3p no 3'UTR de PTEN, mostrando os pareamentos preditos com suas respectivas energias de interação miRNA-mRNA. O sítio predito no inserto 1 não aparece na análise por apresentar energia de interação superior ao limite de detecção (>-5 Kcal/mol) do preditor microRNA RNA22 v2. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* simples para expressão do miRNA-19b-3p e *Student-t* múltiplo para o ensaio de luciferase (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,0001) comparando o grupo mimic CTRL com o grupo mimic 19b.

Como nós mostramos que KRAS regula o miR-19b-3p, que por sua vez regula os níveis de PTEN, que é um conhecido supressor tumoral (SONG, M. S.; SALMENA; PANDOLFI, 2012; YING *et al.*, 2011), nós resolvemos investigar se o miR-19b poderia exercer papel oncogênico em PDAC. Inicialmente, nós avaliamos se a inibição ou superexpressão do miR-19b em células AsPC-1 afeta a viabilidade celular através de ensaios clonogênicos (**Fig. 11**). Estes ensaios resultaram em resultados contraditórios. A inibição do miR-19b-3p provocou uma redução no número de colônias conforme esperado, mas esta redução foi sutil e não atingiu significância estatística ( $p=0,09$ ) (**Fig. 11-A**). Uma possibilidade para explicar este resultado é que o aumento pequeno de PTEN (de 10-30%) observado com inibição deste microRNA (**Fig. 10-A**) não seja suficiente para causar um efeito robusto na viabilidade celular, sendo necessária a ação conjunta com os outros miRNAs para modular os níveis de PTEN em uma magnitude que vá causar um efeito biológico robusto.

Por outro lado, ao contrário do esperado, a expressão aumentada do miR-19b causou uma redução significativa no número de colônias (**Fig. 11-B**). Para explicar este resultado, temos duas hipóteses complementares: (1) o oligonucleotídeo mimético utilizado é a versão dupla-fita do miR-19b, que, ao ser processado na célula, pode gerar também a fita 5p madura, a qual possui alvos distintos da fita 3p. Estes alvos, ao serem modulados, podem compensar a inibição de PTEN pela fita 3p; e (2) a transfecção com oligonucleotídeos dupla-fita miméticos resulta em um aumento de mais de 20X nos níveis do miRNA-19b (**Fig. 10-C**). Estes níveis supra fisiológicos podem resultar na regulação de outros alvos, além de PTEN, que não seriam regulados em condições fisiológicas e que poderiam compensar a inibição de PTEN. Um alvo possível que poderia ter este efeito é o mRNA do próprio oncogene KRAS, que é regulado negativamente nestas condições como pudemos confirmar posteriormente (**Fig. 12**).



**Figura 11. O miR-19b tem efeitos contraditórios sobre a clonogenicidade celular em PDAC. (A)** Para inibição do miR-19b-3p, células AsPC-1 foram transfectadas com 50nM de oligonucleotídeos inibidores de miR (anti-miRs) para miR-19b-3p ou oligonucleotídeos controle (CTRL). **(B)** Para superexpressão do miRNA-19b, células AsPC-1 foram transfectadas com 5nM de oligonucleotídeos dupla-fita miméticos (mimic) do miR-19b ou controle (miR-Ctrl). Em ambos os casos, as células foram semeadas para os ensaios clonogênicos 48h após a transfecção. Esquerda) Quantificação das colônias formadas. Direita) Imagens representativas. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* não pareado com correção de *Welch* (\* $p < 0,05$ ), comparando o grupo controle (mir CTRL ou anti miR-Ctrl) com o grupo teste (miR-19b ou anti miR-19b-3p).



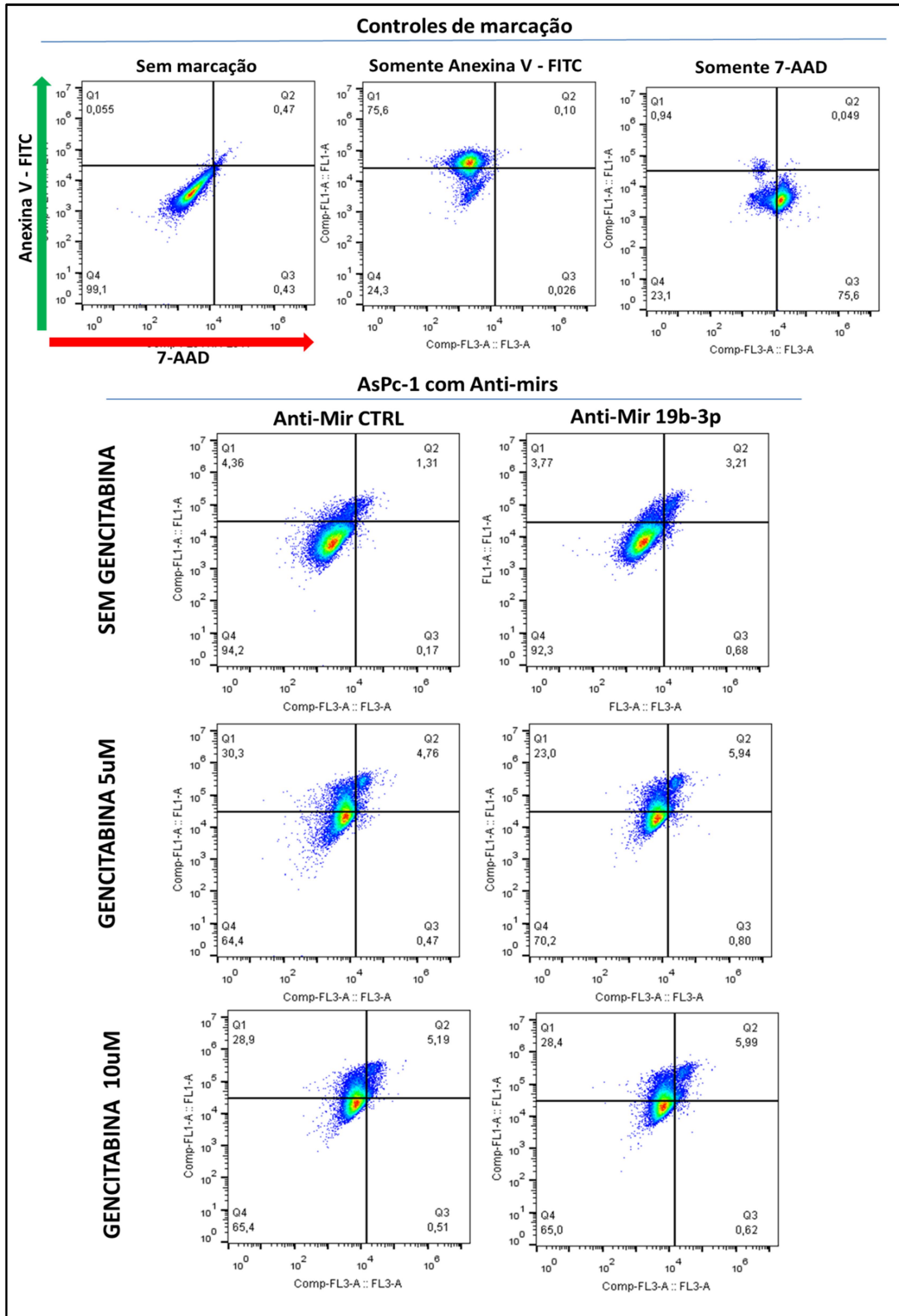
**Figura 12. Expressão supra fisiológica do MiR-19b regula negativamente a expressão de KRAS, além de PTEN.** As células AsPC-1 e PANC-1 foram transfectadas com 5nM de oligonucleotídeos dupla-fita miméticos do miR-19b (miR-19b mimic) ou controle (mir-CTRL mimic). Após 72h extratos proteicos foram preparados e submetidos a Western Blotting com os anticorpos indicados. As bandas proteicas foram quantificadas e normalizadas pelas amostras de referência (mir-CTRL mimic).

Em seguida, como o PTEN regula negativamente a via da PI3K, uma via anti-apoptótica (NG *et al.*, 2001; WANG, Y. *et al.*, 2016), nós avaliamos se o miR-19b poderia promover sobrevivência celular, tornando as células de PDAC mais resistentes à ação citotóxica da gencitabina, um quimioterápico amplamente usado na terapia de



PDAC (**Fig. 13**). Dado o resultado contraditório obtido com a expressão supra fisiológica do miR-19b no ensaio de colônia, resolvemos proceder com os ensaios de morte celular e quimiorresistência apenas com o oligonucleotídeo inibitório do miR-19b-3p, que reduz os níveis fisiológicos do miR-19b e que é específico apenas para a nossa fita de interesse (3p), que tem PTEN como alvo. Para tanto, avaliamos se a inibição do miR-19b-3p em células de PDAC pode desencadear morte celular na ausência de estímulos citotóxicos ou se pode aumentar a morte celular induzida pelo tratamento com a gencitabina.

Primeiro, observamos que a gencitabina causou um aumento significativo apenas na porcentagem de células positivas para Anexina V (Q1+Q2) e muito pouco para o 7-AAD (Q2). Este efeito pode ser decorrente do tempo de tratamento de 72h, que nos permite avaliar as etapas mais iniciais do processo de morte celular por apoptose (Anexina V), mas insuficiente para as etapas mais tardias do processo (7-AAD). Entretanto, quando consideramos todas as células apoptóticas positivas para anexina V (Q1 +Q2), a inibição do miR-19b-3p, na ausência de estímulos citotóxicos, promoveu um aumento pequeno de 5,67% para 6,98% (**Fig. 13**). Na presença de gencitabina por outro lado, a inibição do miR-19b-3p resultou em uma redução pequena de 35,06% para 28,94% na concentração de 5uM e não alterou a proporção de células apoptóticas na concentração de 10  $\mu$ M (mudança de 34,09% para 34.39%). De maneira análoga a observada para os ensaios de colônia, é possível que a inibição deste microRNA isolado não seja suficiente para causar um efeito robusto na morte celular, sendo necessária a ação conjunta com os outros miRNAs obter um efeito biológico robusto.



**Figura 13. A inibição do miR-19b-3p promove a morte celular de células AsPC-1 tratadas ou não com gencitabina.** Ensaio de citometria de fluxo baseado na externalização de fosfatidilserina (Anexina V) e incorporação de 7-AAD. As células AsPC-1 foram transfectadas com 50nM de oligonucleotídeos inibidores de miR (anti-miRs) para miR-19b-3p ou oligonucleotídeos controle (CTRL). Após 24h de transfecção, iniciou-se o tratamento com a gencitabina nas concentrações de 5 ou 10µM pelo período de 72h. Para os controles de marcação, células AsPC-1 sem transfecção e tratamento foram submetidas a 60°C por 5 minutos e posteriormente marcadas. A distribuição das populações celulares positivas para Anexina V e/ou 7-AAD estão indicadas.

## 6. DISCUSSÃO

Embora avanços significativos tenham sido alcançados no desenvolvimento de terapias-alvo para pacientes com diversos tipos de neoplasia, resultando em uma melhora de sobrevida, o mesmo não foi observado para PDAC, cujas baixas taxas de sobrevida não sofreram impacto significativo (QUARESMA; COLEMAN; RACHET, 2015; SUNG *et al.*, 2021). Uma possível razão é que o mecanismo oncogênico “*driver*” mais comum em PDAC, que ocorre em mais de 90% dos pacientes é a ativação constitutiva da GTPase KRAS por mutações oncogênicas (COX *et al.*, 2014; STEPHEN *et al.*, 2014), que carecem de terapias-alvo para a maioria dos pacientes portadores de PDAC.

KRAS é uma oncoproteína amplamente estudada em diversas neoplasias e constitui um alvo terapêutico bem estabelecido, contudo sua inibição terapêutica ainda é um desafio. Apesar do sucesso recente na aprovação de uma terapia direcionada especificamente para KRAS G12C, através do inibidor Sotorasibe que se liga covalentemente à cisteína do códon 12 mutado, este não tem impacto significativo na terapia de PDAC, uma vez que a mutação G12C apresenta uma frequência de menos de 2% neste tipo de câncer (SKOULIDIS *et al.*, 2021). Portanto, um melhor entendimento das vias oncogênicas desencadeadas pela KRAS em PDAC é necessária.

Uma classe de alvos potenciais da KRAS que permanece pouco explorada é a classe composta pelos miRNAs. Apesar de vários miRNAs que regulam a expressão de KRAS serem conhecidos (KIM, M.; SLACK, 2014), os miRNAs regulados pela ativação da KRAS por mutações oncogênicas ainda são pouco explorados. Existem estudos em câncer de pulmão e cólon que mostram uma associação entre a expressão de alguns miRNAs e a presença de mutações em KRAS (CHOI *et al.*, 2016; GASPARINI *et al.*, 2015; KIM, H. *et al.*, 2017; LUNDBERG *et al.*, 2018; MOSAKHANI *et al.*, 2012; RAGUSA *et al.*, 2010). Entretanto, apesar desta associação, não se sabe se estes miRNAs são de fato regulados pela oncoproteína KRAS, nem sua importância para o fenótipo maligno. Poucos estudos demonstram a regulação de miRNAs por KRAS. Dois estudos do mesmo grupo, usando células de câncer colorretal crescidas em 3D, mostram que a KRAS oncogênica promove a expressão dos miRNAs miR-181, miR-200c, miR-210 e miR-221/222, mas o papel destes miRNAs para a biologia tumoral não foi explorado (OTA *et al.*, 2012; TSUNODA *et al.*, 2011). Em contraste com

estes estudos, ZHONG *et al.*, (2016) mostraram, em fibroblastos e células mamárias, que a KRAS oncogênica suprime a expressão de miRNAs da família miR200 e que o miR200 age como um supressor tumoral inibindo a transformação celular *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo*. Além disso, estudos recentes em câncer de pulmão mostraram que a expressão de KRAS<sup>G12V</sup> em células epiteliais broquelares BEAS-2B leva a um aumento do miRNA miR-29b e este aumento promove resistência à apoptose (LANGSCH *et al.*, 2016). A expressão da forma oncogênica de KRAS em células tumorais pulmonares leva a um aumento dos miRNAs miR-30c e miR-21, que por sua vez induzem quimiorresistência e promovem a migração celular (SHI *et al.*, 2018). Apesar destes estudos, os miRNAs regulados pela ativação da KRAS por mutações oncogênicas em PDAC são desconhecidos.

Neste trabalho nós caracterizamos miRNAs diferencialmente expressos identificados anteriormente pelo nosso grupo em células ductais pancreáticas isogênicas, diferindo apenas pela expressão ou não de KRAS oncogênica. Ao avaliar os alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, identificamos a fosfatase PTEN como o alvo regulado pelo maior número destes miRNAs.

Interessantemente, a PTEN é um importante supressor tumoral que atua inibindo a via da PI3K, uma via oncogênica chave nos tumores induzidos por KRAS. A importância desta via para a oncogênese pancreática é enfatizada por estudos em modelos animais de ESER *et al.* (2013) mostrando que a inativação de *Pdk1*, uma quinase que atua a jusante da PI3K e é responsável pela ativação da AKT, é capaz de bloquear completamente a formação de PanIN e PDAC no modelo animal de PDAC induzido por KRAS G12D e perda de p53, denominado KPC (*Ptf1a*<sup>Cre/+</sup>; *LSL-Kras*<sup>G12D/+</sup>; *LSL-Trp53*<sup>R172H/f</sup>). Ainda neste mesmo estudo, a substituição da expressão da *KRAS*<sup>G12D</sup> pelo oncogene *PIK3CA*<sup>H1047R</sup>, que codifica a subunidade p110 $\alpha$ <sup>H1047R</sup> da PI3K, foi capaz de fenocopiar todas as características histopatológicas dos diferentes estágios de tumorigênese do PDAC no modelo KPC, incluindo até o desenvolvimento metástases e a mesma diminuição na sobrevivência dos animais. Corroborando a importância desta via, aumentos na atividade de AKT são identificados em cerca de 60% das amostras de PDAC, sendo a amplificação do oncogene *AKT2* detectada em apenas 10-20% destes casos (ALTOMARE *et al.*, 2002; RUGGERI *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que pacientes portadores de PDAC com alta atividade da via da

PI3K apresentam uma sobrevida significativamente pior do que aqueles com baixa ativação dessa via (KENNEDY *et al.*, 2011; THIBAUT *et al.*, 2021).

Interessantemente, PTEN é a única fosfatase que atua antagonizando a atividade PI3K, desfosforilando o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), inativando a via de sinalização PI3K/AKT e, desta forma, causando a inibição da proliferação celular e promovendo a apoptose (SONG, M. S.; SALMENA; PANDOLFI, 2012). Em PDAC, PTEN é apontado como um importante supressor tumoral, principalmente devido aos modelos de camundongos com expressão oncogênica de KRAS combinada com depleção parcial (*Pdx1-Cre<sup>+</sup>; LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; Pten<sup>lox/+</sup>*) ou completa de PTEN (*Pdx1-Cre<sup>+</sup>; LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>*). Nestes modelos, a perda de um dos alelos de *PTEN* acelera o aparecimento de metaplasias e PanIN e a perda total de *PTEN* permite o desenvolvimento completo do PDAC com fenótipo altamente metastático, diminuindo severamente a sobrevida dos camundongos, mostrando-se muito similar ao observado com a perda de P53 no modelo KPC (HILL *et al.*, 2010; YING *et al.*, 2011). No entanto, mutações somáticas no gene *PTEN* são raras em linhagens de PDAC e em amostras de pacientes portadores de PDAC, mesmo que estas amostras apresentem níveis mais baixos ou ausentes de PTEN em comparação aos tecidos e células pancreáticas não tumorais, indicando que a regulação negativa de PTEN deve ser mediada por outros mecanismos (OKAMI *et al.*, 1997; OKAMI *et al.*, 1998).

Nos nossos experimentos com os diferentes modelos celulares pancreáticos (PDAC e não-PDAC, **Fig. 4**), identificamos 7 miRNAs regulados positivamente por KRAS, que tem como alvo o PTEN: miR-29a-3p, miR-494-3p, miR-29b-3p, miR-221-3p, miR-21-5p, miR-205-5p, miR-19b-3p. O estudo conduzido por DU RIEU *et al.* (2010) corroboram os nossos achados, tendo identificado níveis elevados de miR-21, miR-221/222, miR-29c, miR-200 e miR-205 em amostras de PDAC de pacientes, com exceção do miR-200 e miR-29c, que não aparecem em nossos resultados. Usando o modelo de camundongo com apenas KRAS mutante (*Pdx1-Cre:LSL-KRAS<sup>G12D</sup>*), o mesmo grupo identificou expressão aumentada do miR-205, miR-200 e miR-21 em lesões PanIN, conhecida lesão precursora de PDAC, sendo o miR-21 o mais induzido pela KRAS oncogênica. Estes resultados corroboram a nossa análise de dados de PDAC do TCGA, que mostra um aumento significativo de miR-21 em pacientes com mutação oncogênica em KRAS (**Fig. 5**). De fato, o miR-21 permanece como o único oncomiR induzido por KRAS estabelecido em diferentes tipos de tumores, alvejando

uma variedade de supressores de tumor, como PDCD4, PTEN e outros (CHU *et al.*, 2020; HATLEY *et al.*, 2010). Apesar da importância do miR-21 como oncomiR na literatura, não conseguimos observar sua ação como regulador negativo de PTEN em nossos experimentos, não observando correlação negativa de expressão entre este e o PTEN nos dados do TCGA (**Fig. 6**) e nem alteração na atividade de luciferase do inserto 4 da região 3'-UTR de PTEN (**Fig. 9**), que contém sítio para este miRNA.

Dos 7 miRNAs que avaliamos em nossos experimentos, o miR-19b-3p (forma madura do miR-19b) foi o mais consistentemente correlacionado com a regulação de PTEN pela KRAS oncogênica, sendo o único a ter sua expressão regulada positivamente com a superexpressão de KRAS (**Fig. 8**). Aliado a isso, os seus precursores miR-19b-1 e miR-19b -2, que geram a mesma fita 3p, foram alguns dos poucos miRNAs que mostraram correlação negativa de expressão com PTEN nos dados do TCGA (**Fig. 6**) e o miR-19b foi capaz de reduzir a expressão e regular a negativamente região 3'-UTR de PTEN (**Fig. 10**). A contribuição do miR-19b para a regulação negativa do PTEN e as consequências para o comportamento maligno do PDAC foram descritos mais recentemente na literatura. ZHANG *et al.* (2020) relataram um aumento de 3 vezes da expressão de miR-19 em PDAC em comparação com o tecido normal adjacente em um conjunto de amostras de 61 pacientes, também correlacionando a alta expressão de miR-19 com uma diminuição na sobrevivência geral dos mesmos. Outros grupos também relataram que o miR-19 aumenta a proliferação celular, a migração, a capacidade de invasão e o crescimento tumoral xenográfico usando diferentes linhagens celulares de PDAC (QUATTROCHI *et al.*, 2017; SONG, M. *et al.*, 2019; ZHANG, G. F. *et al.*, 2020). Embora os achados da literatura demonstrem que o miR-19b é um importante oncomiR no PDAC capaz de regular PTEN, nenhum deles demonstra a regulação desse miRNA por KRAS.

Como é comum para vários miRNAs, o miR-19b pode ter ação oncogênica ou supressora tumoral dependendo do contexto. Por exemplo, o miR-19a/b pode ter a própria KRAS como alvo em outros tipos de câncer, como colorretal e carcinoma de nasofaringe, atuando desta forma como um miRNA supressor tumoral (CHEN, M.; LIN; WANG, 2018; ZHANG, YUAN *et al.*, 2018). Interessantemente nós observamos que níveis supra-fisiológicos do miR-19b podem causar tanto redução nos níveis de PTEN quanto nos níveis de RAS (**Fig. 12**), sendo essa uma possível explicação para redução no número de colônias observada após a expressão do miR-19b no nosso ensaio

clonogênico (**Fig.11**). Assim, os nossos achados somados aos relatos da literatura, nos levam a crer que o miR-19b faça parte de uma alça de retroalimentação negativa da via KRAS/miR-19b/PTEN, aonde os níveis do miR19b são mantidos em um nível de expressão, onde ele atue preferencialmente sobre os alvos supressores tumorais como PTEN.

Outros alvos do miR-19b também são descritos na literatura que poderiam classificar esse miRNA como um oncomiR ou supressor de tumor, sendo a sua atuação muito dependente do contexto celular. Visto que um miRNA tem múltiplos alvos e os alvos regulados parecem depender, não só da concentração do miRNA e do mRNA alvo, bem como dos níveis dos demais mRNAs alvos que vão competir pelo miRNA de acordo com a sua afinidade e abundância, a função biológica de um miRNA se torna extremamente difícil de prever. Um fator que agrava ainda mais esta dificuldade é que miRNAs podem ter 2 fitas funcionais (3p ou 5p), sendo que a proporção de cada uma também pode ser regulada e variar de acordo com o contexto celular, adicionando um nível de complexidade adicional sobre os efeitos regulatórios exercidos por um determinado miRNA.

Neste trabalho, apesar de confirmarmos os efeitos regulatórios de KRAS sobre o miR-19b, sobre a região 3'-UTR de PTEN e de confirmarmos a regulação do miR-19b sobre PTEN, não foi possível demonstrar que este miRNA atua como um oncomiR regulado por KRAS em ensaios funcionais. Dada a magnitude pequena do aumento de PTEN pela inibição dos níveis fisiológicos deste miRNA, acreditamos que ele faça parte de uma rede de miRNAs, que atuam conjuntamente para manter os níveis de PTEN em cheque nas células tumorais, sendo que a perda de um miRNA individual terá um efeito biológico negligenciável nestas células. Isto apoiaria a ideia de que KRAS utiliza mecanismos redundantes para inibição de PTEN.

Apoiando a ideia da existência de mecanismos alternativos para inibição de PTEN, dois trabalhos demonstraram que a via Ras/Raf/MEK/ERK é capaz suprimir a transcrição do PTEN de forma dependente de c-Jun, o qual se liga a um sítio AP-1 a montante da região promotora de *PTEN*, bloqueando a sua expressão (HETTINGER *et al.*, 2006). Ademais, CHOW *et al.* (2007) mostraram, em linhagens celulares de PDAC sem a expressão de SMAD4, que a via KRAS/MEK/ERK participa da regulação negativa da expressão de *PTEN* induzida por TGF- $\beta$ , sendo essa expressão de PTEN

restaurada ao utilizarem um inibidor para MEK, bloqueando a via. Apesar destes trabalhos reforçarem a importância da via das KRAS/MAPKs na regulação negativa de PTEN por mecanismos independentes de miRNAs, experimentos anteriores do nosso laboratório com inibidores de MEK nas mesmas linhagens celulares de PDAC aqui estudadas não geraram aumento nos níveis de PTEN (GOMES FILHO, 2019). Este fato, somado a nossa observação de que a inibição do miR-19b-3p nestas células aumenta os níveis de PTEN, apoia a hipótese de que KRAS é capaz de regular os níveis de PTEN também pela via dos miRNAs.

Finalmente, somados aos relatos da literatura, nossos resultados apoiam a noção de que a ativação da via PI3K por KRAS é um dos mecanismos oncogênicos mais fundamentais desta oncoproteína, uma vez que a mesma dispõe de diferentes mecanismos moleculares para garantir a atividade desta via nas células tumorais. A existência destes mecanismos alternativos abre um leque de opções para intervenções terapêuticas, principalmente combinatórias e contexto-específicas, que tem o potencial de contornarem mecanismos de retroalimentação que podem levar à ativação paradoxal de vias, como a das MAPK, e de serem mais eficazes e mais específicas.

## 7. CONCLUSÕES

Desta forma, obtivemos as seguintes conclusões:

- Identificamos uma assinatura de 7 miRNAs induzidos por KRAS em PDAC, que tem PTEN como alvo;
- KRAS é capaz de regular 4 desses 7 miRNAs em ensaios de inibição de expressão de KRAS;
- KRAS é capaz de regular negativamente PTEN através da região do inserto #2 do 3'UTR de PTEN;
- O miR-19b-3p foi validado como o mais consistentemente regulado por KRAS, sendo este um dos efetores na regulação dos níveis do supressor de tumor PTEN, atuando também através de interação com o sítio presente no inserto #2 do 3'UTR de PTEN, contribuindo assim para o fenótipo maligno de PDAC



**CAPÍTULO 2: Investigação da IKK $\beta$  como  
potencial alvo terapêutico para células  
iniciadoras de tumor pancreáticas**

## 8. INTRODUÇÃO

### 8.1 Células iniciadoras de tumor (CITs)

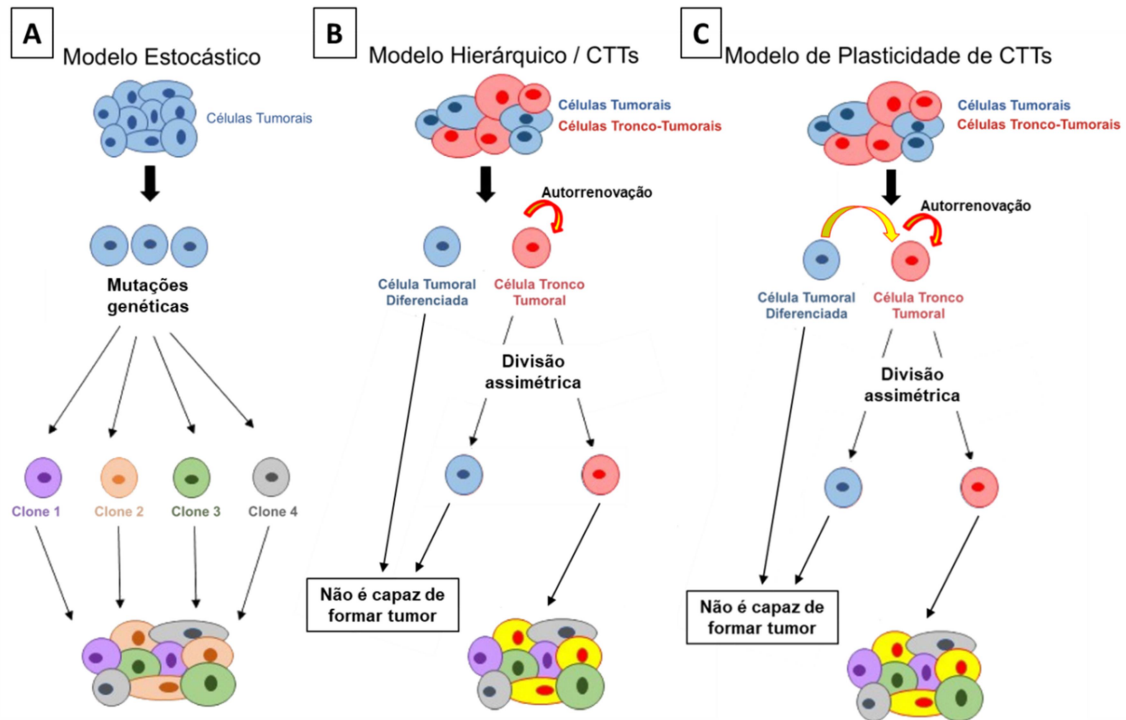
Embora a heterogeneidade inter- e intratumoral possa ser considerada uma característica do câncer, a biologia por trás e decorrente deste fenômeno ainda é pouco elucidada, o que complica muito o diagnóstico e o tratamento do câncer. O conceito de heterogeneidade intratumoral deve-se sobretudo à observação experimental de que nem todas as células tumorais são capazes de recapitular um tumor em um novo “hospedeiro”, geralmente um animal imunocomprometido, e que nem todas respondem igualmente aos quimioterápicos e/ou possuem propriedades invasivas.

Existem dois modelos principais para explicar a organização heterogênea dos tumores: o modelo estocástico e o modelo hierárquico (**Fig. 14**). O modelo estocástico baseia-se na evolução clonal, em que as células malignas são biologicamente equivalentes inicialmente e conforme acumulam mutações aleatórias ao longo do tempo divergem, dando origem a clones genéticos distintos, responsáveis pela heterogeneidade em características malignas, como agressividade, capacidade de invasão, resistência ao tratamento, entre outras (**Fig. 14-A**) (GERDES *et al.*, 2014; MICHOR; POLYAK, 2010; RICH, 2016).

Já o modelo hierárquico sugere que a heterogeneidade tumoral pode ser explicada por alterações fenotípicas em células geneticamente idênticas por mecanismos epigenéticos que recapitulam a hierarquia existente no tecido normal. Os tumores são, desta forma, formados por subpopulações de células geneticamente idênticas, mas fenotipicamente distintas em uma organização celular hierárquica. No topo da hierarquia estão as células tronco tumorais (CTTs ou CITs), também chamadas de células iniciadoras de tumor (CITs) devido a capacidade excepcional que estas células têm de iniciar a formação de tumores. As CITs são capazes de se autorrenovar e de se diferenciar em células tumorais altamente proliferativas responsáveis pela massa tumoral, mas que não são capazes de se diferenciar e iniciar tumores (células não-CITs). Desta forma, de acordo com esse modelo, apenas uma subpopulação minoritária de células com propriedades tronco (CITs) é capaz de iniciar a formação de tumores e sustentar o crescimento tumoral (**Fig. 14-B**) (REYA *et al.*, 2001; RICH, 2016).

Estes dois modelos não são mutuamente exclusivos e uma visão unificada para explicar a heterogeneidade tumoral postula que a diversidade genética que gera diferentes populações clonais no tumor pode ser acompanhada de diversidade funcional dentro de cada clone conferida por diferenças epigenéticas que podem gerar uma organização hierárquica em cada clone, sendo que a profundidade desta hierarquia pode também variar, já que a proporção de CITs pode ser diferente dependendo da presença de mutações que favorecem ou não a aquisição do fenótipo tronco (KRESO; DICK, 2014).

Mais recentemente, vários estudos mostraram que a hierarquia do tumor não é estritamente unidirecional, como indicado no modelo hierárquico, mas sim dinâmica e fluida. A este respeito, uma terceira teoria mais moderna e atualmente mais amplamente aceita foi proposta, sendo denominada “modelo de plasticidade de CTTs” (**Fig. 14-C**). De acordo com esta teoria, as células tumorais podem apresentar plasticidade, tendo a capacidade dinâmica de alternar entre os estados tronco e não-tronco, dependendo de estímulos intrínsecos e extrínsecos, ampliando, desta forma, a complexidade da compreensão da heterogeneidade do tumor. Assim, o fenótipo tronco tumoral pode ser interpretado como um estado celular que pode ser adquirido ou perdido reversivelmente. Em outras palavras, embora as taxas de interconversão possam ser variáveis dependendo do clone tumoral e dos estímulos do microambiente, a plasticidade celular permite a interconversão entre CTTs e não-CTTs (CABRERA; HOLLINGSWORTH; HURT, 2015; MARJANOVIC; WEINBERG; CHAFFER, 2013; PISCO; HUANG, 2015). Entretanto, mesmo em casos em que a taxa de interconversão é alta, está claro que células que possuem o fenótipo tronco são responsáveis pela manutenção a longo prazo do tumor e tem maior probabilidade de apresentar quimiorresistência, enfatizando a importância do fenótipo tronco para a biologia tumoral (KRESO; DICK, 2014).



**Figura 14. Esquema dos diferentes modelos propostos para geração da heterogeneidade intratumoral.** (A) Modelo estocástico, no qual as células acumulam mutações genéticas distintas, gerando diferentes clones tumorais capazes de formar tumores. (B) Modelo hierárquico, segundo o qual apenas células tronco tumorais (CTT) podem iniciar a tumorigênese, por meio da sua diferenciação em divisão assimétrica e autorrenovação. (C) Modelo de plasticidade de CTTs, que assume que a hierarquia do tumor pode ser dinâmica e que células tumorais não-tronco podem assumir fenótipo tronco, dependendo de estímulos intrínsecos e extrínsecos, sendo que esta interconversão pode ter taxas variáveis dependendo do clone tumoral. Adaptado de (CORRENTI *et al.*, 2022)

Corroborando esta ideia, um crescente corpo de evidências sugere que as CITs estão diretamente relacionadas à manutenção dos tumores, bem como à resistência à quimioterapia (VINOGRADOV; WEI, 2012; ABDULLAH; CHOW, 2013) e à radioterapia (VLASHI; PAJONK, 2015). Isto pode explicar a dificuldade na erradicação completa do câncer, sendo a recidiva uma ameaça sempre constante. A resistência das CITs às terapias convencionais pode ser atribuída a múltiplos fatores, como a maior expressão de proteínas relacionadas ao efluxo de drogas (e.g., família de transportadores ABC) (ABDULLAH; CHOW, 2013; ZINZI *et al.*, 2014), enzimas intracelulares relacionadas à detoxificação e metabolização de fármacos (e.g., ALDH) (RODRIGUEZ-TORRES; ALLAN, 2016), maior eficiência da maquinaria de reparo de DNA (WANG, Q.E., 2015), controle mais refinado do ciclo celular e processos antiapoptóticos (VINOGRADOV; WEI, 2012; ABDULLAH; CHOW, 2013), bem como a influência do microambiente em que essas células estão inseridas (KISE; KINUGASA-KATAYAMA; TAKAKURA, 2016).

As CTTs possuem, não só uma capacidade excepcional de iniciar a formação de tumores e de promover quimiorresistência, mas também são responsáveis também pela disseminação metastática (SHIBUE; WEINBERG, 2017; VISVADER; LINDEMAN, 2012), sendo que frequentemente a aquisição de propriedades tronco é acompanhada pela aquisição de propriedades mesenquimais, em um processo denominado de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês “*Epithelial Mesenchymal Transition*”) (SHIBUE; WEINBERG, 2017). A ativação da EMT confere às células tumorais propriedades críticas para a invasão e disseminação metastática como o aumento da motilidade e da capacidade de degradar componentes da matriz extracelular. Consistentemente, estudos mostraram que as CTTs participam do processo de colonização metastática, reeducando células estromais no órgão alvo e desta forma contribuindo para a formação do nicho metastático (MALANCHI *et al.*, 2011). CTTs também estão envolvidas no fenômeno denominado de dormência metastática, que é responsável pelo surgimento de metástases vários anos após a remissão clínica (GAY; MALANCHI, 2017; KLEFFEL; SCHATTON, 2013). Consistentemente, HERMANN *et al.* identificaram que uma população de CTTs pancreáticas caracterizada pela expressão de CD133 e CXCR4 era capaz de iniciar metástases em modelo animal (HERMANN *et al.*, 2007).

A identificação padrão das CITs é realizada principalmente pela combinação de antígenos de superfície e algumas proteínas celulares, aliados a ensaio celulares que comprovem diferentes características destas células. Majoritariamente, são empregados procedimentos de imunofenotipagem com anticorpos conjugados a moléculas fluorescentes, seguidos da análise por citometria de fluxo aliada à separação das células baseada na detecção das diferentes fluorescências dos marcadores por FACS (do inglês “*Fluorescence-Activated Cell Sorting*”), o que permite o isolamento da população de células desejada. Complementarmente, a avaliação das propriedades tronco-tumorais é realizada por meio de ensaios que visam medir a capacidade de formação de tumoresferas em ambiente de baixa adesão *in vitro*; e da regeneração de tumores xenográficos em animais imunocomprometidos *in vivo*, origem da denominação de células iniciadoras de tumor. Por esses métodos, as CITs foram primariamente detectadas em tumores hematopoiéticos (LAPIDOT *et al.*, 1994) e posteriormente em tumores sólidos, como tumor cerebral (SINGH *et al.*, 2003), câncer de mama (AL-HAJJ *et al.*, 2003), cabeça e pescoço (AILLES; PRINCE, 2009), cólon

(TODARO *et al.*, 2007), pulmão (HARDAVELLA; GEORGE; SETHI, 2016), próstata (GU *et al.*, 2007), ovário (ZHANG, S. *et al.*, 2008) e pâncreas (HERMANN *et al.*, 2007; LI, C.; LEE; SIMEONE, 2007).

## 8.2 CITs e o câncer pancreático

A descoberta de CITs em tumores pancreáticos foi feita simultaneamente por dois grupos distintos de pesquisadores, os quais usaram dois conjuntos diferentes de marcadores de superfície celular para detecção e isolamento destas células (HERMANN *et al.*, 2007; LI, C.; LEE; SIMEONE, 2007).

Uma dessas combinações foi a de CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/ESA<sup>+</sup> utilizada por Li *et al.* (2007), que contabilizaram que cerca de 0,2-0,8% das células derivadas de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos expressavam os referidos marcadores. Foram avaliadas então nessas células as propriedades de autorrenovação, a capacidade de produzir descendência diferenciada e o aumento da expressão de fatores de pluripotência, como *Sonic Hedgehog*. Ao serem injetadas em animais imunocomprometidos, células tumorais CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/ESA<sup>+</sup> mostraram um potencial tumorigênico 100 vezes maior quando comparadas a células tumorais CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>/ESA<sup>-</sup>. Os tumores originados a partir da inoculação das células tumorais CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/ESA<sup>+</sup> eram histologicamente indistinguíveis dos tumores humanos originais.

Já o grupo de pesquisa de Hermann *et al.* (2007) identificou potenciais CITs pela detecção do antígeno de superfície CD133, em cerca de 2 a 4% das células, sendo que apenas as células positivas para esse marcador (CD133<sup>+</sup>) foram capazes de formar tumores em animais imunocomprometidos. Ademais, quando comparadas às células tumorais CD133<sup>-</sup>, células CD133<sup>+</sup> exibiram resistência ao tratamento com gencitabina, principal quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de pâncreas. A exposição prolongada à gencitabina leva a um enriquecimento de células CD133<sup>+</sup>, mostrando assim que a quimioterapia seleciona populações de células quimiorresistentes com propriedades tronco-tumorais. Esse mesmo estudo observou ainda que a marcação de CD133 engloba duas subpopulações distintas quanto à capacidade de formação de metástases. A subpopulação metastática, além de CD133, expressa o receptor de quimiocina CXCR4 (do inglês "*chemokine receptor type 4*"), que já foi extensivamente correlacionado ao processo de metástase (GUO *et al.*, 2016).

Os resultados independentes destes dois grupos demonstraram a existência de uma pequena subpopulação de CITs pancreáticas (<1%), com marcadores de superfície distintos também encontrados em CITs de outras neoplasias (GLUMAC; LEBEAU, 2018; JAGGUPILLI; ELKORD, 2012). A detecção de células positivas para um ou para os dois tipos de marcação (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/ESA<sup>+</sup> e/ou CD133), está correlacionada à diminuição na sobrevida de pacientes com câncer pancreático, ou seja, a presença destes marcadores, e por conseguinte de CITs, tornou-se indicadora de pior prognóstico (LI, X. *et al.*, 2015; OHARA *et al.*, 2013).

Após estas descobertas, várias outras moléculas vêm sendo funcionalmente atribuídas às características de CITs pancreáticas, entre elas podemos citar ALDH-1, CXCR4, ABCG2, OCT4, DCLK1, entre outros. No entanto, até o momento não existe um marcador universal de CITs para PDAC (GZIL *et al.*, 2019; HERREROS-VILLANUEVA, MARTA *et al.*, 2014), talvez devido à existência de heterogeneidade nas CITs pancreáticas. De fato, os tumores podem conter populações molecular-biologicamente distintas de CITs, que podem inclusive coexistir dentro de um mesmo tumor (EUN; HAM; KIM, 2017; HERMANN *et al.*, 2007; KRESO; DICK, 2014; TANG, D. G., 2012).

Na tentativa de elucidar o perfil molecular de CITs pancreáticas, alguns estudos recentes geraram dados de transcrito em larga escala com base em diferentes abordagens. Sancho *et al.* (2015) fizeram enriquecimento de CITs oriundas de modelos de xenoenxertos derivados de pacientes (PDX, do inglês "*Patient-Derived Xenograft*") portadores de PDAC através de cultura de tumoresferas e compararam o perfil transcricional global destas células em relação às mesmas células cultivadas de forma aderente, identificando as vias metabólicas glicolíticas e OXPHOS (fosforilação oxidativa) como importantes para o fenótipo tronco-tumoral. Além disso, um estudo usando um modelo animal de PDAC expressando o gene repórter GFP em função do fator de transcrição Musashi, que havia sido identificado previamente como modulador do fenótipo tronco (FOX *et al.*, 2016), integrou dados transcriptômicos, epigenéticos e funcionais para criar um mapa multidimensional do estado tronco em PDAC e identificou a via do receptor nuclear ROR gamma como importante para manutenção do fenótipo tronco (LYTLE *et al.*, 2019). Finalmente, um estudo de sequenciamento de células únicas de 24 amostras humanas de PDAC e tecido normal identificou um cluster de células ductais em ambos os tecidos e a comparação da expressão revelou

uma assinatura de expressão de genes de pluripotência afetados especificamente no *cluster* tumoral (REN *et al.*, 2021).

Embora estes estudos tenham gerado dados e informações importantes sobre alvos específicos que são ativados na reprogramação que desencadeia o fenótipo tronco-tumoral em PDAC, estes estudos, ou foram baseados em modelos murinos que não refletem a heterogeneidade observada nos tumores humanos, ou foram focados em vias e alvos específicos, ou identificaram subpopulações de células tumorais que foram arbitrariamente definidas como tronco com base no perfil de expressão, mas sem validação funcional. Desta forma, podemos afirmar que estes poucos estudos não descrevem de maneira compreensiva todas as vias importantes para desencadear o fenótipo tronco em PDAC.

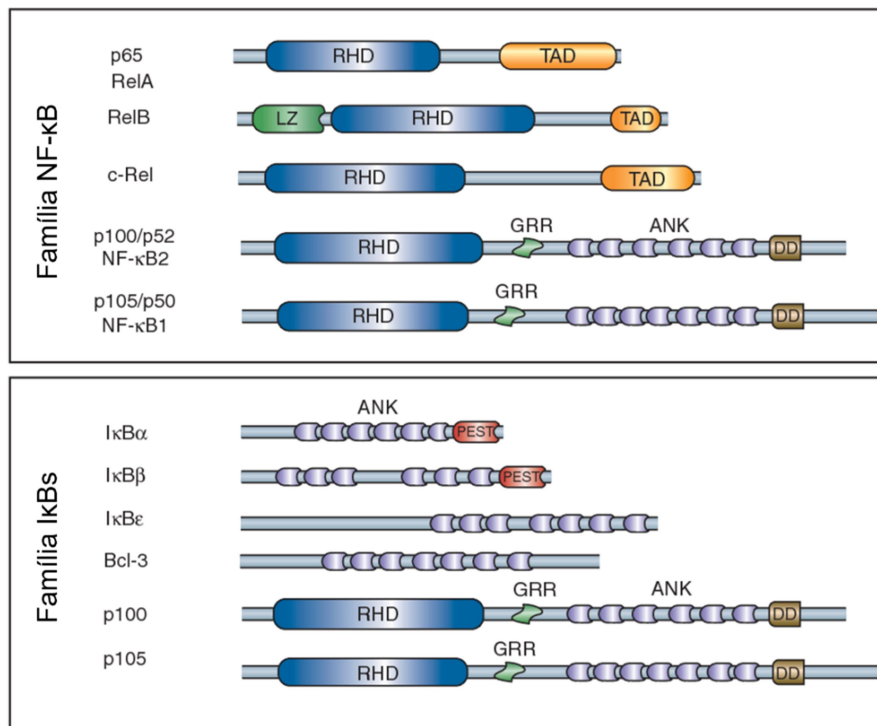
A fim de avançar na compreensão e tratamento das CITs em câncer de pâncreas, faz-se, portanto, necessária uma melhor caracterização de marcadores de CITs em tumores pancreáticos humanos, assim como uma maior investigação de vias cruciais para a manutenção do fenótipo tronco e de propriedades neoplásicas, como invasão e metástase.

### 8.3 A via de NF- $\kappa$ B

A família de fatores de transcrição do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, do inglês “*Nuclear Factor kappa B*”) desempenha um papel chave em processos inflamatórios, proliferação celular, resposta imune e, como descoberto mais recentemente, câncer (HOESEL; SCHMID, 2013). Essa família é constituída de cinco membros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52/p100). Todos compartilham o domínio de homologia Rel (RHD, do inglês “*Rel Homology Domain*”), que permite a localização nuclear, a dimerização, bem como a ligação a motivos específicos no DNA (**Fig. 15**) (BALDWIN, 1996). Para que o NF- $\kappa$ B seja funcional é necessária a formação heterodímeros ou homodímeros dentre as proteínas desta família, sendo NF- $\kappa$ B1(p50)/RelA(p65) o dímero mais abundantemente encontrado em quase todos os tipos celulares. As proteínas p65/RelA, RelB e c-Rel contêm ainda na região carboxi-terminal domínios de ativação de transcrição (TAD, do inglês “*Transactivation Domain*”), ausentes em NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). Assim, para promover a transcrição de genes alvo, é necessário que ao menos uma das unidades do dímero do NF- $\kappa$ B seja p65/RelA, RelB e c-Rel.



A atividade desse fator de transcrição é regulada pela interação com a família de proteínas inibitórias de  $\kappa\text{B}$  ( $\text{I}\kappa\text{Bs}$ ), constituída pelas proteínas  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ , Bcl-3, p100 e p105 (Fig. 15). Todas essas possuem como característica principal a presença de repetições de anquirinas, essenciais para a interação e inativação do NF- $\kappa\text{B}$ . Essa inativação dá-se basicamente pela retenção citoplasmática do NF- $\kappa\text{B}$ , impedindo a sua translocação para o núcleo e conseqüentemente a sua ligação ao DNA e transcrição de seus genes-alvo. A presença dos precursores p100 e p105, em ambas as famílias se deve à necessidade de estes sofrerem clivagem proteolítica da sua região carboxi-terminal, a qual contém essas repetições de anquirinas, perdendo a sua capacidade inibitória e formando as subunidades funcionais p50 e p52, respectivamente (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

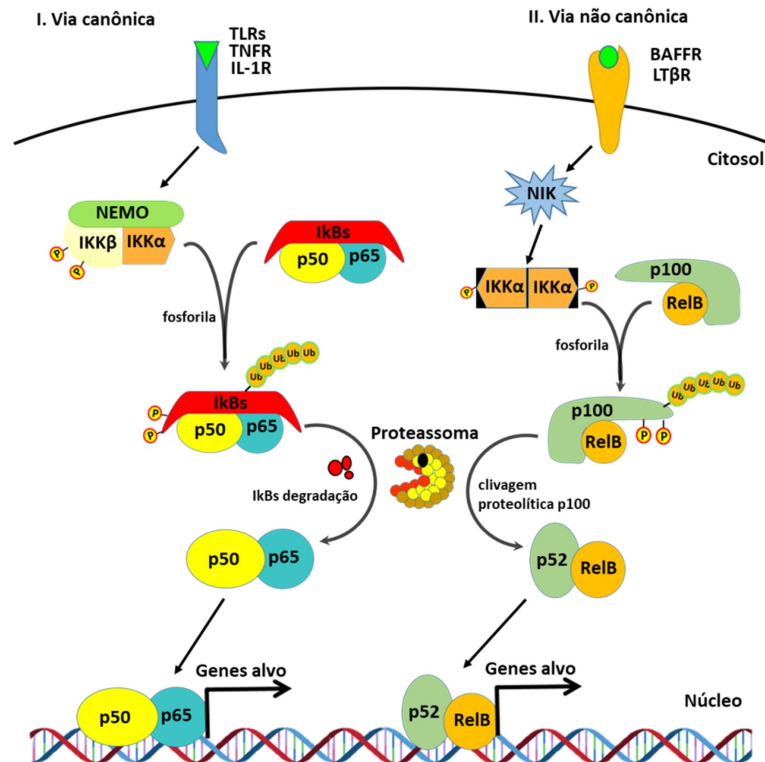


**Figura 15. Membros das famílias de proteínas NF- $\kappa\text{B}$  e  $\text{I}\kappa\text{B}$ .** O domínio de homologia Rel (RHD) é característico das proteínas NF- $\kappa\text{B}$ , enquanto as proteínas  $\text{I}\kappa\text{B}$  contêm repetições de anquirina (ANK) típicas dessa família de proteínas. As proteínas precursoras p100 e p105 podem, portanto, ser atribuídas e cumprir as funções das famílias de proteínas NF- $\kappa\text{B}$  e  $\text{I}\kappa\text{B}$ . Os domínios presentes em cada proteína estão indicados. DD, do inglês “*death domain*”; GRR, região rica em glicina onde acontece a clivagem; LZ, zíper de leucina; NBD, domínio de ligação a NEMO; PEST, região rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina; TAD, domínio de transativação. Adaptado de (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

#### 8.4 Ativação da via do NF- $\kappa$ B

Mais de 15 vias já foram relatadas para a ativação de NF- $\kappa$ B, mas as duas vias mais comuns são a via canônica (clássica) e a via não-canônica (alternativa) (LIU, T. *et al.*, 2017). A via de ativação canônica do NF- $\kappa$ B (p50/p65) inicia-se com sinais extracelulares, como produtos bacterianos, citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e sinais de estresse celular (HOESEL; SCHMID, 2013; TANIGUCHI; KARIN, 2018), que atuam via receptores de membrana culminando na ativação de um complexo de quinases denominado complexo IKK (do inglês, “*Inhibitor of I $\kappa$ B kinase*”), constituído por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  (esta última também conhecida como NEMO), que fosforila as I $\kappa$ Bs, sobretudo I $\kappa$ B $\alpha$  nos resíduos Ser32 e Ser36. Essa fosforilação leva à ubiquitinação e degradação proteassomal dos I $\kappa$ Bs, aliviando sua inibição sobre NF- $\kappa$ B, que pode então se transloucar para o núcleo e regular a transcrição de genes (**Fig. 16**) (BALDWIN, 1996; RINKENBAUGH; BALDWIN, 2016; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Por outro lado, a via não canônica ou via alternativa do NF- $\kappa$ B é ativada por diferentes estímulos, como a linfotoxina- $\beta$  (LT $\beta$ ) e o fator ativador de células B (BAFF), que ativam a quinase NIK (do inglês “*NF- $\kappa$ B inducing kinase*”), que vai fosforilar e ativar um complexo IKK alternativo, composto apenas por IKK $\alpha$ . Este complexo fosforila p100 levando à clivagem proteolítica da região inibitória dessa proteína, transformando o dímero inativo p100/RelB no heterodímero ativo de NF- $\kappa$ B p52/RelB, que é capaz de transloucar para o núcleo e atuar na transcrição de diferentes genes-alvo (**Fig. 16**) (SUN, 2011).

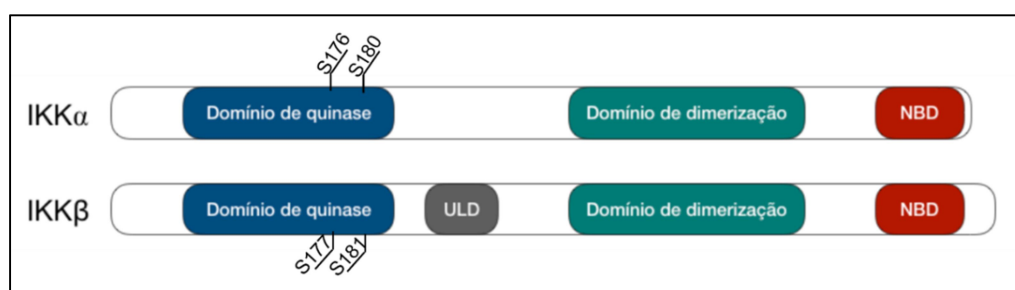


**Figura 16. Vias de ativação do NF- $\kappa$ B. (Esquerda) Via de ativação canônica:** sinais extracelulares com seus respectivos receptores levam à ativação do complexo IKK, composto por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e NEMO, que fosforila a proteína inibitória I $\kappa$ B, levando a sua ubiquitinação e degradação, culminando na translocação nuclear de NF- $\kappa$ B e transcrição de genes alvo. **(Direita) Via não canônica:** sinais alternativos com seus respectivos receptores recrutam a quinase NIK, que ativa um complexo IKK alternativo, composto apenas por IKK $\alpha$ , que, por sua vez, fosforila p100 levando à clivagem proteolítica da região inibitória desta proteína, liberando p52/RelB (um dos dímeros NF- $\kappa$ B) que é então capaz de se translocar para o núcleo e promover a transcrição de um conjunto diferente de genes alvo. TLR) do inglês “*Toll-like receptor*”; TNFR) do inglês “*Tumor Necrosis Factor Receptor*”; IL-1R) do inglês “*Interleukin 1 receptor*”; BAFFR) do inglês “*B cell activator factor receptor*”; LT $\beta$ R) do inglês “*Lymphotoxin  $\beta$  receptor*”. Demais abreviações descritas no texto.

## 8.5 A quinase IKK $\beta$

Como citado anteriormente, a IKK $\beta$  (do inglês “*inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\beta$* ” ou IKK2) participa de um complexo de quinases (complexo IKK), que inclui também a IKK $\alpha$  (do inglês “*inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\alpha$* ” ou IKK1) e a IKK $\gamma$  (do inglês “*inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\gamma$* ” ou NEMO, do inglês “*NF- $\kappa$ B essential modulator*”), cuja principal função é ativar o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. A quinase IKK $\gamma$  regula a associação do complexo IKK, enquanto as quinases IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  têm atividade catalítica, sendo IKK $\beta$  o principal componente responsável pela ativação do NF- $\kappa$ B pela via clássica de ativação, que é denominada como via dependente de IKK $\beta$  (BASSÈRES, D S; BALDWIN, 2006; LI, Z. W. *et al.*, 1999; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  são serina/treonina quinases expressas de forma ubíqua, com 52% de identidade de sequência e com pesos moleculares de 85kDa e 87kDa, respectivamente. IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  possuem um domínio de quinase na região N-terminal, um domínio de dimerização e na região C-terminal um domínio de ligação a IKK $\gamma$ , denominado NBD (do inglês “*NEMO binding domain*”). Adicionalmente, IKK $\beta$  possui um domínio análogo a ubiquitina (ULD, do inglês “*ubiquitin-like domain*”), essencial para sua ativação catalítica. Para tornarem-se cataliticamente ativas, ambas requerem a fosforilação de resíduos de serina presentes na alça de ativação de seus domínios de quinase: Ser176 e Ser180 para IKK $\alpha$  e Ser177 e Ser181 para IKK $\beta$  (ISRAËL, 2010; LING, L.; CAO; GOEDDEL, 1998).



**Figura 17. Esquema dos principais domínios proteicos das duas subunidades catalíticas do complexo IKK: IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ .** As quinases IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  compartilham cerca de 50% de identidade de sequência, possuindo um domínio de quinase na porção N-terminal, um domínio de dimerização e um domínio de ligação a IKK $\gamma$  (NBD) na porção C-terminal. Ambas as quinases necessitam ser fosforiladas em dois resíduos de serina mostrados na imagem, para que se tornem ativas. Ademais, a quinase IKK $\beta$ , possui um domínio análogo a ubiquitina (ULD) essencial para sua atividade.

Embora essas quinases tenham sido objeto de intenso estudo desde a sua descoberta em 1997, o mecanismo completo pelo qual o complexo IKK se torna fosforilado/ativo permanece ainda uma questão sem resposta (DIDONATO *et al.*, 1997; LIU, F. *et al.*, 2012). Uma primeira hipótese é a de que subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) possam se trans-autofosforilar durante a oligomerização para o complexo IKK, ativando uma a outra. Contudo, esta hipótese até o momento não foi comprovada experimentalmente. A segunda hipótese é a existência de quinases específicas para IKK e, embora alguns candidatos tenham surgido, nenhum foi definitivamente comprovado. O mais proeminente deles é a quinase TAK1 (do inglês “*transforming growth factor  $\beta$  activated kinase-1*”), que seria responsável por fosforilar a IKK $\beta$  no resíduo Ser177, o que permitiria então a auto fosforilação no resíduo Ser181 (ZHANG, J. *et al.*, 2014). Apesar de ser um candidato promissor, o estudo de WANG, C. *et al.*, (2001) utilizando TAK1 constitutivamente ativa mostra que essa é incapaz de fosforilar

IKK $\beta$ , bem como a sua superexpressão é insuficiente para ativar NF- $\kappa$ B. Além disso, estudos em animais demonstraram que TAK1 é dispensável para ativação do complexo IKK, indicando que existem outros mediadores envolvidos na ativação deste complexo (LIU, F. *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2005).

### 8.6 A importância de IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B no câncer

A ativação constitutiva do NF- $\kappa$ B é observada em diversos tipos de câncer, sendo suas funções oncogênicas relacionadas à promoção da proliferação celular, controle da apoptose, estimulação da angiogênese, bem como invasão e metástase (CARNEIRO-LOBO *et al.*, 2019; XIA, L. *et al.*, 2018). Em câncer de pâncreas, WANG *et al.* (1999) mostraram que o NF- $\kappa$ B está constitutivamente ativo em cerca de 70% dos tumores pancreáticos. Essa ativação constitutiva de NF- $\kappa$ B parece envolver a via canônica, já que um estudo recente observou por imuno-histoquímica níveis mais elevados de IKK $\beta$  fosforilada em amostras de tumores pancreáticos primários e metástases hepáticas em comparação ao próprio estroma tumoral e a células acinares e ductais de regiões não comprometidas (NAPOLEON *et al.* 2022).

Além disso, corroborando a importância da via canônica do NF- $\kappa$ B em câncer, diferentes estudos demonstraram que a quinase IKK $\beta$  desempenha um papel importante na oncogênese em diferentes modelos. GRETEN *et al.* (2004) demonstraram que a inibição da expressão da IKK $\beta$  impede a tumorigênese em um modelo animal de câncer de cólon. A inibição farmacológica da IKK $\beta$  induz apoptose em células leucêmicas (FRELIN *et al.*, 2005) e inibe o crescimento de células de mieloma *in vitro* e *in vivo* (HIDESHIMA *et al.*, 2006). Notavelmente, em modelos pulmonares, a IKK $\beta$  é ativada pela forma oncogênica da GTPase KRAS (BASSÈRES *et al.*, 2010, 2014; DURAN *et al.*, 2008), que se encontra presente em mais de 90% dos pacientes portadores de PDAC (GUERRA *et al.*, 2007; MORRIS; WANG; HEBROK, 2010). Consistentemente, a inibição farmacológica ou genética de IKK $\beta$  em modelos de câncer de pulmão e pâncreas inibe o crescimento tumoral, sendo esta inibição associada a alterações do microambiente tumoral e a uma redução da proliferação celular (BASSÈRES *et al.*, 2015; LING, J. *et al.*, 2012; XIA, Y. *et al.*, 2012). Interessantemente, tanto a inibição do NF- $\kappa$ B, quanto a deleção de IKK $\beta$  são capazes de impedir a tumorigênese de PDAC (LING, J. *et al.*, 2012), indicando de que essa via desempenha um papel fundamental para transformação maligna no câncer de

pâncreas.

Ademais, já está amplamente estabelecido que o NF- $\kappa$ B promove características invasivas e contribui para a formação de metástases (BASSÈRES, D S; BALDWIN, 2006; MIN *et al.*, 2008), sendo a via IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B já descrita como promotora de fenótipo tronco-tumoral em diferentes modelos (RINKENBAUGH; BALDWIN, 2016). Por exemplo, o NF- $\kappa$ B não só promove a expressão de diversos genes envolvidos em promover metástase, como IL-8, metaloproteinases de matriz (MMPs) e moléculas de adesão (BASSÈRES, D S; BALDWIN, 2006), mas também promove a transição epitelial-mesenquimal, que é uma das vias cruciais para promover a capacidade invasiva celular e disseminação metastática (MIN *et al.*, 2008). A inibição do NF- $\kappa$ B em células tumorais mamárias reverteu a transição epitelial-mesenquimal e bloqueou o potencial metastático (HUBER *et al.*, 2004).

Além disso, não só o NF- $\kappa$ B encontra-se ativado em CITs de diferentes tumores (KALTSCHMIDT, B. ; *et al.*, 2022; RINKENBAUGH; BALDWIN, 2016), como a inibição genética da atividade do NF- $\kappa$ B limitou a expansão de CITs de mama *in vitro* e *in vivo* (LIU, M. *et al.*, 2010). Em câncer de pulmão, o NF- $\kappa$ B promove a transição epitelial-mesenquimal e induz CITs (KUMAR *et al.*, 2013; ZAKARIA *et al.*, 2018). Além disso, CITs de próstata expressam níveis mais elevados de p65 (subunidade do NF- $\kappa$ B) acetilada e total em relação aos tumores parentais (XIA, Y. *et al.*, 2009). Em glioblastoma, células formadoras de tumoresferas apresentam maior fosforilação de p65, consistente com sinalização de NF- $\kappa$ B elevada, essencial para manutenção das características tronco-tumorais, uma vez que, como constatado utilizando a abordagem de diluição limitante, a inibição de NF- $\kappa$ B reduz a autorrenovação celular e inibe o crescimento de xenotumores (SONG, L. *et al.*, 2012). Já a inibição genética ou farmacológica de IKK $\beta$  reduz a formação de mamosferas e a tumorigenicidade de células mamárias (KENDELLEN *et al.*, 2014), a formação de tumoresferas em linhagens de câncer de próstata e a expressão de marcadores de células tronco em tumores xenográficos de próstata (ZHANG, YANTING *et al.*, 2016).

Para além da I $\kappa$ B $\alpha$  na ativação da via canônica do NF- $\kappa$ B, a fosforilação direta de outros alvos pela quinase IKK $\beta$  vêm sendo atrelados a diferentes características (*hallmarks*) do câncer (PAGE *et al.*, 2017). Por exemplo, a IKK $\beta$  é capaz de fosforilar o fator de transcrição FOXO3a, que possui papel supressor tumoral, levando a sua

exclusão do núcleo e degradação (HU *et al.*, 2004), sendo FOXO3a negativamente correlacionado ao fenótipo tronco-tumoral em câncer de mama e carcinoma oral (LI, K. *et al.*, 2019; LIU, H. *et al.*, 2019). Outro substrato trata-se do MTDH (do inglês, *Metadherin*), no qual a fosforilação por IKK $\beta$  leva aumento da atividade deste oncogene (KRISHNAN *et al.*, 2015), sendo a este atribuído aumento na proliferação celular, metástase e fenótipo tronco-tumoral em câncer de mama (LIANG *et al.*, 2015; WAN *et al.*, 2014) e hepático (WANG, YIYING; SHEN; GAO, 2023).

Apesar destes estudos apontarem para um papel importante da IKK $\beta$  na biologia das CITs, a ação de fato da IKK $\beta$  na modulação da plasticidade tumoral e dinâmica de aquisição ou supressão do fenótipo tronco de CITs pancreáticas permanece desconhecido. Desta forma, embora a IKK $\beta$  tenha sido descrita como fundamental na transformação maligna e formação tumoral em PDAC (LING, J. *et al.*, 2012), o papel desta quinase para o fenótipo tronco de CITs pancreáticas permanece desconhecido, bem como o seu potencial como alvo terapêutico na doença metastática permanece pouco explorado.

## 9. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Com base nos estudos relatados acima, nós hipotetizamos que a quinase IKK $\beta$  contribui para a aquisição do fenótipo tronco-tumoral no câncer de pâncreas, contribuindo para a disseminação metastática. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi determinar como a IKK $\beta$  afeta o fenótipo tronco-tumoral e metastático de células pancreáticas visando o desenvolvimento desta quinase como alvo terapêutico.

Para alcançar o objetivo geral, nós propusemos e perseguimos os seguintes objetivos específicos:

- 1 Determinar um modelo de avaliação/identificação de células iniciadoras de tumor (CITs) pancreáticas;
- 2 Avaliar se a inibição da atividade ou expressão da quinase IKK $\beta$  afeta a expressão de marcadores de pluripotência em CITs pancreáticas;
- 3 Avaliar como a inibição da atividade ou expressão da quinase IKK $\beta$  afeta o fenótipo tronco-tumoral de CITs pancreáticas *in vitro*;
- 4 Avaliar se a inibição da atividade ou expressão da quinase IKK $\beta$  afeta a capacidade migratória e invasiva das células de PDAC.

## 10. MATERIAIS E MÉTODOS

### 10.1 Linhagens celulares e cultivo

Todas as linhagens celulares de PDAC utilizadas foram cultivadas assim como descrito no **item 4.1 do capítulo 1**, com o acréscimo das linhagens BxPC-3 e PDX-8, ambas cultivada com meio de cultura RPMI suplementado com 10% SFB. A linhagem PDX-8 foi cedida pelo grupo do colaborador Prof. Eduardo Reis (IQ-USP) e é derivada de um xenotumor de paciente propagado em camundongos Balb/c nude e subsequentemente propagadas *in vitro*, sendo utilizadas passagens inferiores a 20 repiques (MORAES, 2018).

### 10.2 Titulação dos anticorpos para marcadores de CITs

Para as marcações, suspensões contendo um total de  $2 \times 10^5$  células de cada linhagem de PDAC foram incubadas com os anticorpos mouse anti-human CD24-FITC clone ML5 (BD Pharmigen), mouse anti-human CD44-PE clone G44-26 (BD Pharmigen), mouse anti-human CD326/ESA-APC (EpCAM) (BioLegend) ou mouse anti-human CD133-PE-Cy7 (BioLegend) diluídos no volume total de 100 $\mu$ l de solução tampão HBSS acrescido de 2% de albumina sérica bovina (BSA) pelo período 30min no gelo. Após esse período foi acrescido mais 1ml do tampão HBSS, seguido de centrifugação para lavagem do excedente de anticorpos que não se ligaram. Ao final, o pellet de células foi ressuscitado em 300 $\mu$ l de HBSS+2%BSA e levado imediatamente para a leitura no citômetro de fluxo no FACS Canto II (BD) da Faculdade de Farmácia da USP (FCF-USP).

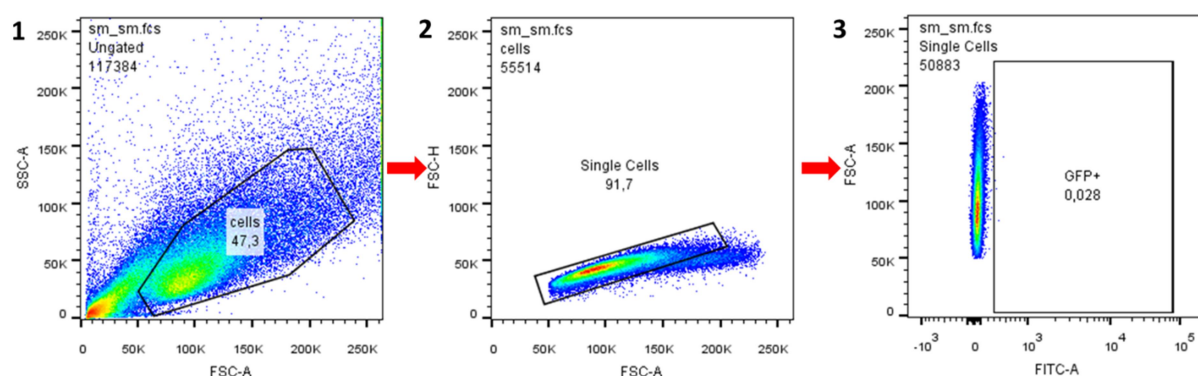
### 10.3 Citometria de Fluxo e separação celular

As células aderentes foram lavadas com PBSA, tripsinizadas e a tripsina foi inativada com adição de meio completo (com 10% SFB). As células foram então contadas em câmara de Neubauer na presença de azul de Tripam. Para os experimentos de avaliação do percentual de células positivas,  $3 \times 10^5$  células vivas foram coletadas em microtubos de 1,5mL e centrifugadas a 300g por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular ressuscitado em 300  $\mu$ l de solução tampão HBSS acrescido de 2% de SFB.

Todas as leituras para avaliação do percentual de células fluorescentes foram realizadas no FACS Accuri (BD), pertencente à Prof. Sandra Farsky (FCF-USP), com a



obtenção de no mínimo  $1 \times 10^5$  eventos totais e procedendo com a estratégia sequencial de *gates* mostradas abaixo, que consiste nas seguintes etapas (**Fig. 18**): (1) Seleção da população celular majoritária no espalhamento frontal (FSC) e lateral (SSC). (2) Seleção de células únicas (*singlets*) selecionando os eventos com variação linear entre altura e área do sinal para o espalhamento frontal (FSC-H por FSC-A). (3) Construção dos “*gates*” para células positivas para as diferentes fluorescências com base nas células sem marcação e/ou controles sem fluorescência.



**Figura 18. Esquema de gates para citometria de fluxo utilizados.** 1. Seleção de população celular de interesse (FSCxSSC). 2. Seleção de células únicas pela escolha do parâmetro FSC altura vs área (FSC-H x FSC-A). 3. Gate para fluorescência com base nas células sem utilização do marcador (Controles ou sem a utilização de nenhum dos anticorpos).

Já os experimentos de separação celular (do inglês “*cell sorting*”) foram realizados no equipamento FACSria Fusion (BD) em parceria com o Instituto Israelita Albert Einstein apenas para a linhagem AsPC-1 SORE6-GFP, seguindo a estratégia de “*gates*” detalhada na **Fig. 27**. Em cada experimento foram submetidas à separação um total de aproximadamente  $3,5 \times 10^7$  células, na concentração de  $1 \times 10^7$  céls/ml em tampão HBSS acrescido de 2% de SFB. Por fim, a eficiência da separação entre células positivas e negativas para o GFP foi avaliada com base no percentual de células dentro de seus respectivos “*gates*” desenhados na estratégia prévia de separação.

#### 10.4 Ensaio de formação de tumoresferas

Cada uma das linhagens de PDAC, foram plaqueadas em placas de 6 poços de baixa aderência (3.000 céls/poço) em 2ml de meio de cultura DMEM F12 suplementado com 40 $\mu$ L de B-27 (Gibco), 20ng/ml de EGF (fator de crescimento epidermal, PeproTech) e 20ng/ml de FGF (fator de crescimento de fibroblasto, PeproTech) por 14 dias em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A contagem do número de

tumoresferas foi feita manualmente por observação em campo claro e registro fotográfico em microscópio invertido (Nikon).

### 10.5 Inibição farmacológica de IKK $\beta$

Para inibir a atividade da quinase IKK $\beta$ , nós usamos o inibidor Composto A (CA), que tem como alvo específico a quinase IKK $\beta$  (ZIEGELBAUER *et al.*, 2005). As concentrações utilizadas variaram com os experimentos e estão indicadas nas legendas das figuras. Alternativamente, também utilizamos o inibidor de IKK $\beta$ , denominado TPCA-1 (Sigma-Aldrich) na concentração de 8 $\mu$ M. Para ambos os inibidores, utilizamos como controle as células tratadas com mesmo volume do veículo Dimetilsulfóxido (DMSO).

### 10.6 Análise de expressão relativa por RT-qPCR

A análise por RT-qPCR foi realizada conforme descrito no **item 4.7 do capítulo 1**, sendo mostradas abaixo as sequências dos “*primers*” utilizados neste capítulo.

Alvo	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Concentração por reação ( $\eta$ M)
ALDH (1A1)	GACAAAGTAGCCTTCACAGGATCA	TCCCGGCAGCTTCTTTGA	200
CXCR4	CCAGTAGCCACCGCATCT	GGTGGGCAGGAAGATTTATTG	200
IKK $\beta$	GCCCTTCCTCCCAACTG	CCGATCCACACGGGAGTACTTG	200
BMI-1	CCCACCTGATGTGTGTGCT	GGTCTCCAGGTAACGAACAATACA	200
ABCG2	ACTGGTTGGTCGTCAGGAA	ACTTTGGGCTAAAAATGATTCTACTG	200
SOX2	CCCGGCGGAAAACCAA	GCCGGGCAGCGTGTACT	400
OCT4	TCGAGCAATTTGCCAAGC	GCCTCAAAGCGGCAGATG	400
NANOG	CCTCAGCCTCCAGCAGAT	CAGTTGTTTTTCTGCCACCTCTT	400
E-Caderina	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAAG	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG	400
N-Caderina	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC	GTAGGATCTCCGCCACTGATTC	400
Snail	TGCCCTCAAGATGCACATCCGA	GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC	400
Slug	ATCTGCGGCAAGGCGTTTTCCA	GAGCCCTCAGATTTGACCTGTC	400
Vimentina	AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA	ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT	400
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC	600

### 10.7 Análise proteica por Western blotting

O western blotting foi realizado conforme descrito no **item 4.4 do capítulo 1**, com a utilização dos anticorpos primários descritos abaixo e os mesmos anticorpos secundários conjugados a HRP descritos anteriormente.

ALVO	Fabricante	Código	Diluição
<b>Phospho-P65 (Ser536)</b>	Cell Signaling	#3033	1:1000
<b>P65 total</b>	Cell Signaling	#3034	1:1000
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Cell Signaling	#2684	1:1000
<b>Phospho-IkB<math>\alpha</math> (Ser32)</b>	Cell Signaling	#2859	1:500
<b>IkB<math>\alpha</math> total</b>	Cell Signaling	#9242	1:1000
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	Cell Signaling	#3873	1:2000

### 10.8 Ensaio de migração e invasão

Os ensaios de migração e invasão foram realizados utilizando placas de 24 poços com insertos “*transwell*” com poros de 8 $\mu$ m (Corning) revestidos (ensaio de invasão) ou não (ensaio de migração) com matrigel. Para tanto, as células foram plaqueadas nos insertos ( $4 \times 10^4$  células/inserto) em meio RPMI sem soro. Foi utilizado o meio RPMI com 10% de soro fetal bovino nos poços (abaixo do inserto), como quimioatrativo. Após a adição das células, as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células que não migraram foram retiradas da parte superior da membrana do inserto com o auxílio de um cotonete e as células que migraram para a parte inferior da membrana foram lavadas 2 vezes com PBSA e fixadas pela imersão do inserto em paraformaldeído 4% por 2 min e em metanol por 20 min. Os insertos foram novamente lavados com PBSA e as células coradas com solução de cristal violeta 0,5% por 20 min, lavadas 3x com PBSA e deixadas para secar à temperatura ambiente. Imagens foram obtidas através do microscópio invertido IX51 (Olympus) e as células de cinco campos de visão randômicos foram fotografadas em três experimentos independentes. A quantificação da porcentagem de área total ocupada pelas células foi realizada utilizando o *software* ImageJ.

### 10.9 Geração de lentivírus

A geração dos diferentes lentivírus não replicantes foi feita em células HEK293T ( $1 \times 10^6$  céls/placa) aderidas em placas de 10cm de diâmetro e transfectadas com os os vetores de empacotamento lentiviral: 2,6 $\mu$ g do pCMV-dR8.2 dvpr e 0,235 $\mu$ g do pCMV-VSVG; conjuntamente a 2,6 $\mu$ g das seguintes construções lentivirais de interesse: pTRIPz com os shRNAs controle e de interesse (Dharmacon), pSORE6-GFP ou pCTRL-GFP (sem o SORE6 na região promotora do GFP), gentilmente cedidos pela Dra. Lalage Wakefield do “*National Cancer Institute*” (EUA), seguindo o protocolo do reagente de transfecção Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher). Após 16h da

transfecção, o meio de cultura destas células foi descartado e adicionado 10 ml de meio DMEM com 10% SFB fresco. O sobrenadante com os lentivírus foram coletados com 24h e 48h após a troca anterior do meio, sendo adicionado novamente 10ml de meio na coleta de 24h. Essas 2 coletas foram misturadas e filtradas em filtros de 0,45µm e alíquotas de 1ml de lentivírus foram feitas e armazenadas a -80°C até sua utilização.

#### **10.10 Transdução celular**

Suspensões das diferentes linhagens celulares de PDAC foram plaqueadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^5$  céls/poço), acrescidas de 500µl das alíquotas de lentivírus (MOI~1) e 8 µg/ml de polibreno (brometo de hexadimetrina), totalizando 2ml por poço. Após 48h de transdução, o meio de cultura foi descartado apropriadamente e repostado com 2ml do meio completo próprio para cada linhagem, acrescido de puromicina (1 µg/ml) para seleção durante 5 dias, sendo adicionado meio novo com puromicina a cada 2 dias. Como controle para a eficácia da puromicina em matar as células não transduzidas, fizemos, a cada transdução, um poço “*mock*”, com células que não receberam o lentivírus.

#### **10.11 Seleção de clones com “*knockdown*” por shRNA**

Após a seleção das células transduzidas com puromicina, uma parte delas foi distribuída em baixa densidade (2.000 células/placa) em placas de 10cm de diâmetro para crescimento de colônias clonais espaçadas. Posteriormente, cinco clones de cada transdução foram isoladamente tripsinizados, utilizando anéis de clonagem e graxa de silicone (vedante), para assegurar a individualidade, e então expandidas separadamente.

A avaliação funcional do “*knockdown*” de cada clone foi realizada por meio de *Western blotting* para detecção da inibição dos níveis da proteína IKKβ após cinco dias de indução do respectivo shRNA com 2µg/ml de doxiciclina no meio de cultura. Os dois clones que apresentaram a maior redução nos níveis de IKKβ foram os selecionados para prosseguir nos demais experimentos.

#### **10.12 Análise estatística**

Realizada conforme o descrito no **item 4.13 do capítulo 1** .

## 11. RESULTADOS

### 11.1 Identificação de CITs por marcadores de superfície nas linhagens de PDAC

Diante da falta de consenso na literatura sobre os marcadores de superfície ideais ou mais eficazes na identificação de CITs pancreáticas, decidimos realizar uma análise inicial da abundância dos marcadores previamente descritos (HERMANN *et al.*, 2007; JAISWAL *et al.*, 2012; LI, C. *et al.*, 2007) em nossas linhagens pancreáticas. Para isso, realizamos a titulação individual dos anticorpos para CD24, CD44, CD326/ESA e CD133 nas linhagens de PDAC disponíveis em nosso laboratório, e as porcentagens de células positivas para cada marcador em cada linhagem e diluição utilizada encontram-se apresentadas na **Tabela 3**.

Diferentemente do esperado, observamos uma grande variação na proporção de células positivas para cada marcador nas diferentes linhagens. Além disso, em algumas linhagens, certos marcadores não foram detectados, como o CD24, que estava ausente nas linhagens AsPC-1 e Mia PaCa-2, e o ESA, que não foi encontrado na linhagem Mia PaCa-2 (**Tabela 3 e Fig. 19**). Os resultados da titulação também indicaram a necessidade de altas concentrações dos anticorpos para marcar totalmente as populações positivas e separá-las das negativas, crucial para uma boa purificação de ambas as populações (positiva e negativa) na separação celular ativada por fluorescência (FACS, do inglês “*Fluorescence Activated Cell Sorting*”) (**Fig. 19**).

Outro problema que detectamos foi que, nas maiores concentrações testadas (1:25), a população positiva para CD133 apresentou uma fluorescência muito próxima à das células negativas (sem marcação), o que pode ser indicativo de baixas quantidades dessa proteína na superfície dessas células, dificultando assim sua utilização para uma boa separação das populações. Ainda sobre esse marcador, a linhagem PANC-1 estranhamente exibiu um alto percentual de células positivas para CD133, em torno de 20%, frequência esta bem superior às demais linhagens de PDAC, que ficaram entre 2-7%, e à frequência de 2-4% encontrada por Hermann *et al.* (2007).

Tabela 3. Titulação dos primeiros marcadores de superfície para CITs pancreáticas.

## AsPC-1- células positivas (%)

marcador	CTRL negativo*	Diluição do anticorpo				Presente
		1:200	1:100	1:50	1:25	
CD24	0,28	---	0,29	0,30	0,37	não
CD44	0,15	---	5,91	29,8	56,3	sim
CD326/ESA	0,21	11,1	30,2	76,1	---	sim
CD133	0,25	---	---	1,56	2,72	sim

## BXPC-3 – células positivas (%)

marcador	CTRL negativo*	Diluição do anticorpo				Presente
		1:200	1:100	1:50	1:25	
CD24	0,42	---	2,60	9,21	30,0	sim
CD44	0,51	---	4,60	19,7	52,2	sim
CD326/ESA	0,23	6,39	27,1	60,7	---	sim
CD133	0,16	---	---	1,41	2,50	sim

## PANC-1 – células positivas (%)

marcador	CTRL negativo*	Diluição do anticorpo				Presente
		1:200	1:100	1:50	1:25	
CD24	0,07	---	6,18	10,1	25,8	sim
CD44	0,33	---	9,72	28,8	63,6	sim
CD326/ESA	0,45	14,8	41,2	54,4	---	sim
CD133	0,11	---	---	---	22,4	sim

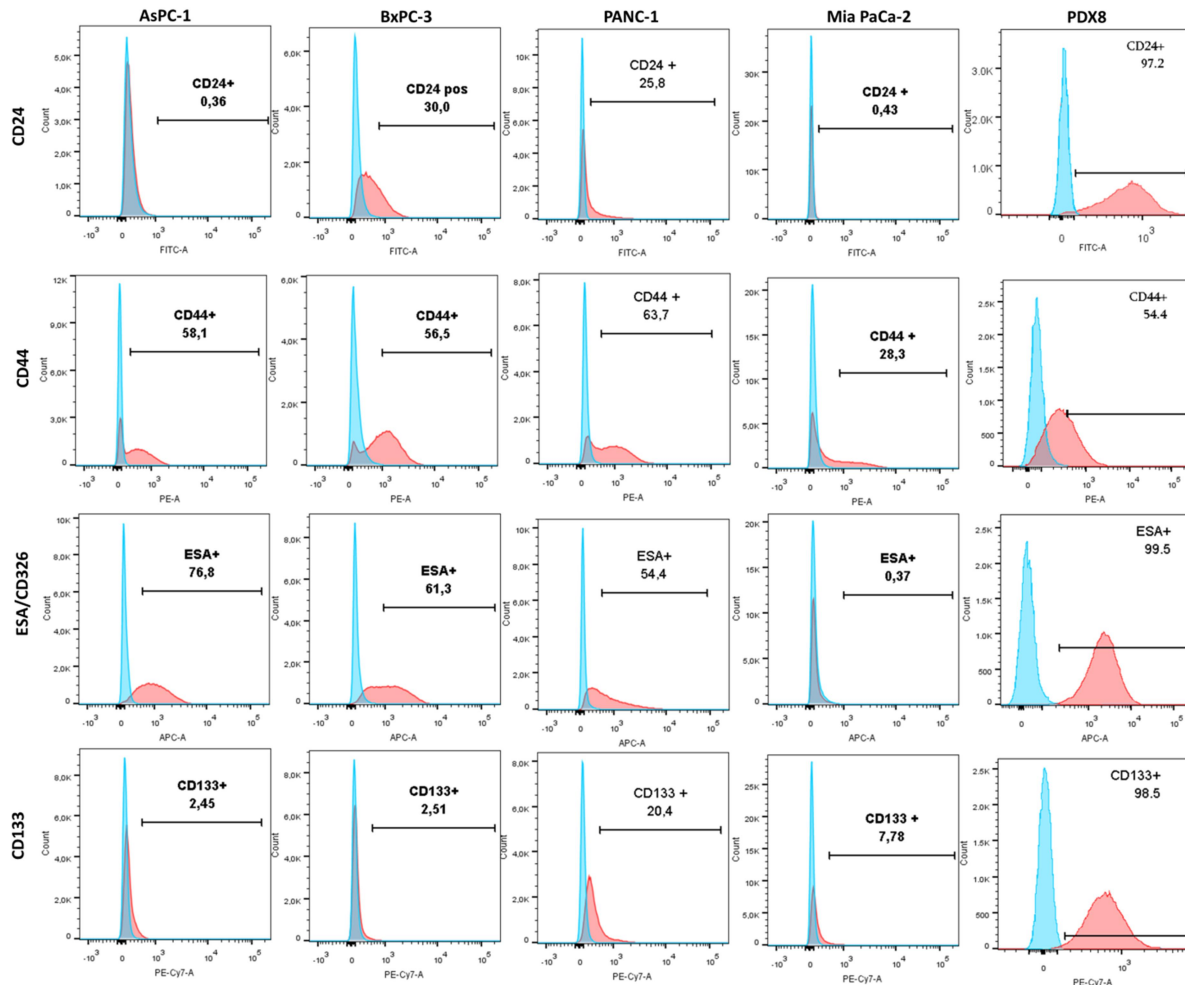
## Mia PaCa-2 – células positivas (%)

marcador	CTRL negativo*	Diluição do anticorpo				Presente
		1:200	1:100	1:50	1:25	
CD24	0,06	---	0,072	0,074	0,084	não
CD44	0,11	---	3,89	9,51	28,6	sim
CD326/ESA	0,32	0,35	---	0,36	---	não
CD133	0,06	---	---	---	7,64	sim

\*CTRL negativo: células sem marcação com anticorpo fluorescente

Visando nos aproximarmos dos experimentos realizados com os marcadores de CITs, que envolviam células tumorais extraídas diretamente do tumor em camundongos, modelo PDX e de metástases (HERMANN *et al.*, 2007; LI, C. *et al.*, 2007), incluímos uma linhagem derivada de xenotumor pancreático de paciente, denominada aqui como PDX8, que foi gerada e cedida pelo grupo do Prof. Eduardo Reis (MORAES, 2018). Nessa linhagem, decidimos testar apenas a maior

concentração dos anticorpos, uma vez que os resultados com as linhagens anteriores de PDAC indicavam a necessidade de altas concentrações.



**Figura 19. A proporção de células positivas para os marcadores de CITs CD24, CD44, ESA e CD133 é variável em diferentes linhagens pancreáticas.** As linhagens celulares indicadas foram ou não submetidas à marcação com os anticorpos CD24-FITC, CD44-PE e CD133-PE-Cy7 na diluição de 1:25 ou CD326-APC na diluição 1:50 e analisadas por citometria de fluxo. O espalhamento frontal e lateral foi utilizado para selecionar células viáveis e individuais (“*singlets*”) para análise. Os gráficos de histogramas representam o número de eventos registrados (“*count*”) em função do nível de fluorescência emitida nos canais indicados (FITC, PE, APC ou PE-Cy7) escolhidos de acordo com o anticorpo utilizado, usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células positivas foi definido arbitrariamente em cada caso (linhas horizontais separando células positivas de negativas) com base no histograma obtido para as células não marcadas nas mesmas condições e a porcentagem de células positivas está indicada. Os gráficos mostrados sobrepõem os histogramas obtidos com as células controle não marcadas (azul) e os obtidos para as células as marcadas com anticorpo (vermelho).

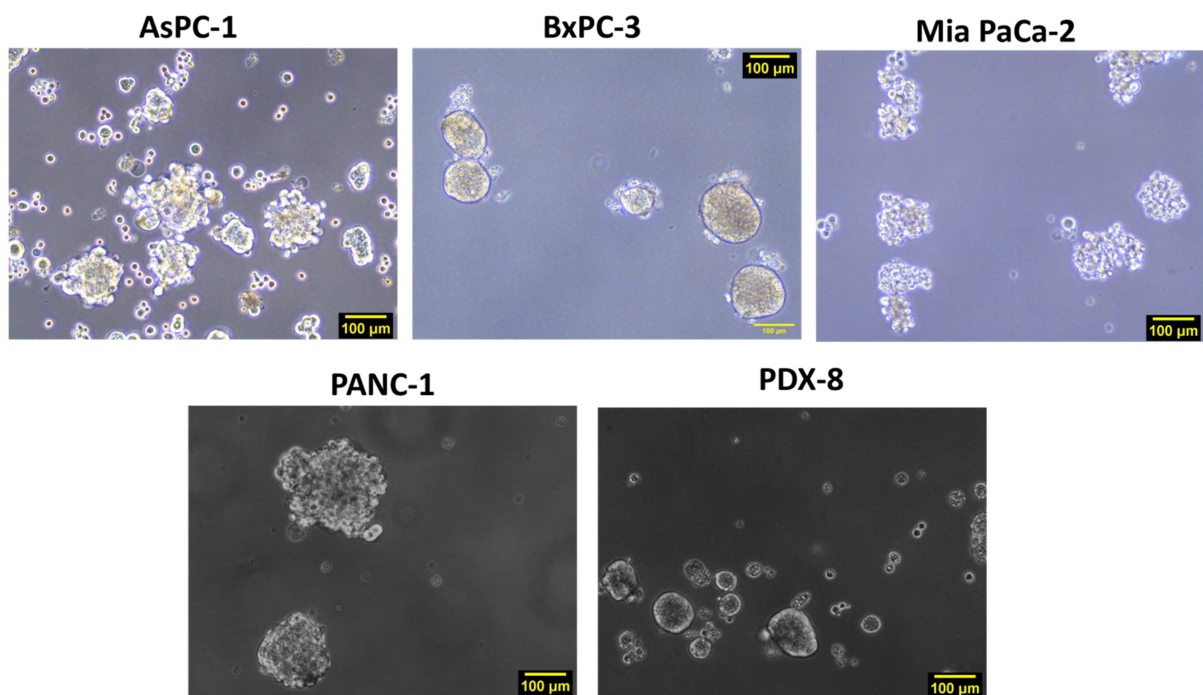
Diferentemente das outras linhagens, a PDX8 mostrou uma grande porcentagem de células positivas para todos os marcadores (**Fig.19**). Quase todas as células se mostraram positivas para CD133, CD24 e ESA (>97%), gerando agora uma dificuldade na obtenção de células negativas para estes marcadores nessa linhagem. Ademais, as frequências observadas divergiram bastante das frequências relatadas na literatura,

tanto de CITs de PDAC quanto de outros tipos tumorais, bem como não refletiram o postulado de que as CITs compreendem uma população minoritária das células tumorais.

Assim, mediante todas essas intercorrências observadas experimentalmente nos experimentos de citometria de fluxo com esses marcadores, optamos por buscar outras alternativas para investigarmos as CITs pancreáticas e prosseguirmos com a análise da importância da IKK $\beta$  para o fenótipo tronco-tumoral pancreático.

### 11.2 Enriquecimento de CITs pancreáticas por cultura de tumoresferas

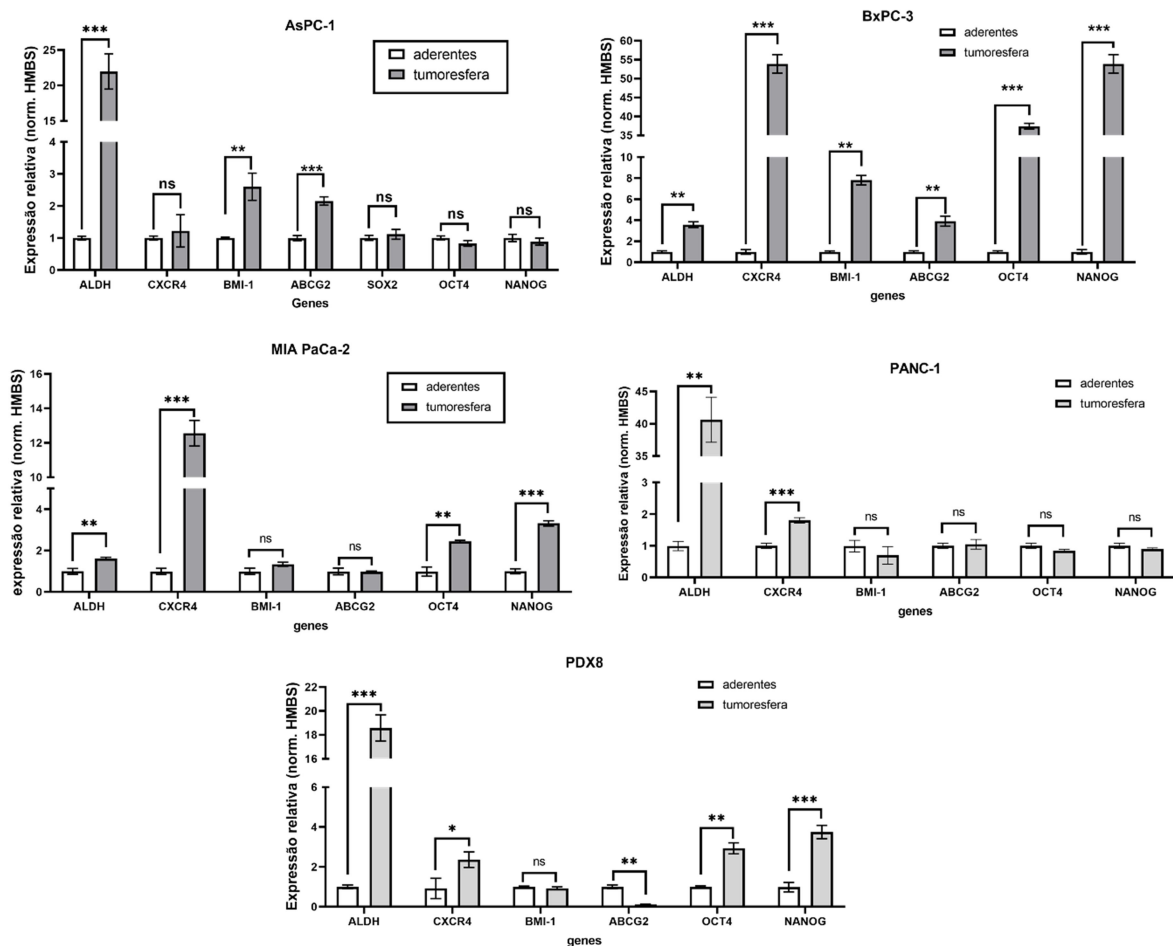
Dadas as dificuldades em encontrar um marcador de superfície que pudesse identificar consistentemente CITs nas nossas linhagens pancreáticas, procedemos com a cultura de tumoresferas, que sabidamente enriquece para CITs pancreáticas (GAVIRAGHI *et al.*, 2011; SASAKI *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2011) e que já tinha sido utilizada e testada em nosso laboratório para estudar CITs pulmonares (RODRIGUES *et al.*, 2020a; SCALABRINI, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2020b).



**Figura 20.** Tumoresferas geradas a partir das diferentes linhagens de PDAC. Imagens representativas de microscopia em campo claro (“*brightfield*”) em microscópio invertido das culturas de tumoresferas das linhagens indicadas 14 dias após o plaqueamento. A barra amarela corresponde a 100 $\mu$ M.



Para validar o enriquecimento de CITs em tumoresferas de PDAC, nós realizamos cultura de tumoresferas para cada uma das linhagens de PDAC (Fig. 20) e avaliamos se havia aumento de expressão de genes associados à biologia das CITs nas tumoresferas (Fig. 21). Nós observamos que, em comparação com células cultivadas de forma aderente tradicional, as tumoresferas de PDAC apresentam um aumento de na expressão de diversos genes com sabida expressão enriquecida em CITs, em especial o ALDH, que se encontra aumentado nas tumoresferas de todas as linhagens, bem como o CXCR4, que só não está aumentado nas tumoresferas da linhagem AsPC-1, seguido dos genes de pluripotência OCT4 e NANOG, que estão aumentados nas tumoresferas de 3 das 5 linhagens.

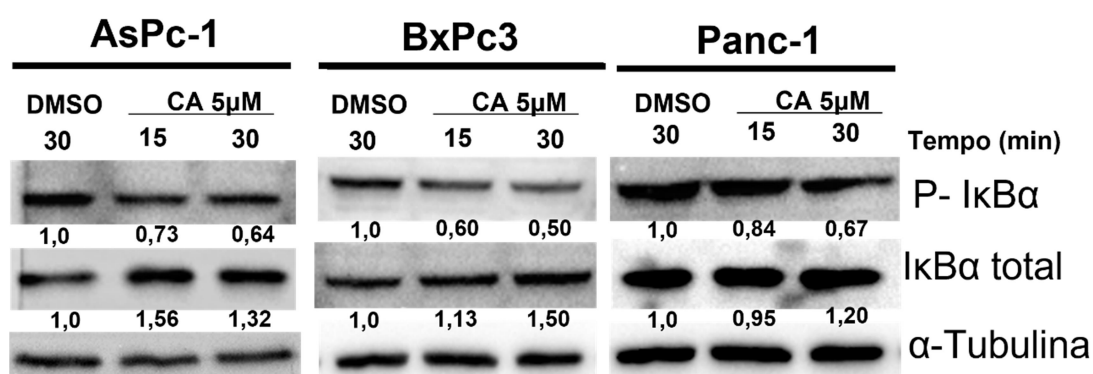


**Figura 21. Tumoresferas de linhagens de PDAC apresentam aumento de expressão de genes associados à biologia das CITs.** As linhagens indicadas na figura foram plaqueadas para cultura na forma aderente ou para cultura de tumoresferas e o RNA foi extraído após 14 dias. A expressão dos genes indicados na figura foi avaliada por RT-qPCR (método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) usando HBMS como controle endógeno para normalização. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* não pareado com correção pelo método Bonferroni-Dunn (NS, não significativo, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ) comparando o grupo “aderentes” com o grupo “tumoresfera”.

### 11.3 A inibição farmacológica de IKK $\beta$ reduz o fenótipo tronco-tumoral em PDAC

Tendo em vista os nossos resultados e os relatos da literatura mostrando que tumoresferas apresentam enriquecimento de CITs (GAVIRAGHI *et al.*, 2011; SASAKI *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2011), nós resolvemos avaliar se a inibição farmacológica da IKK $\beta$  com o inibidor Composto A é capaz impactar a formação de tumoresferas. O Composto A é um inibidor ATP-competitivo com alta seletividade para IKK $\beta$  e que também já havia sido utilizado no nosso laboratório em estudos com câncer de pulmão (BASSÈRES *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2018).

No primeiro momento, testamos a eficiência do Composto A na inibição da quinase IKK $\beta$  nas células pancreáticas ainda aderentes, utilizando a concentração de 5 $\mu$ M do Composto A, a qual já era utilizada no laboratório para linhagens pulmonares (BASSÈRES *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2018). Para avaliar a inibição de IKK $\beta$  medimos o percentual de fosforilação do seu substrato I $\kappa$ B $\alpha$  no resíduo Ser32 (Fig. 22).

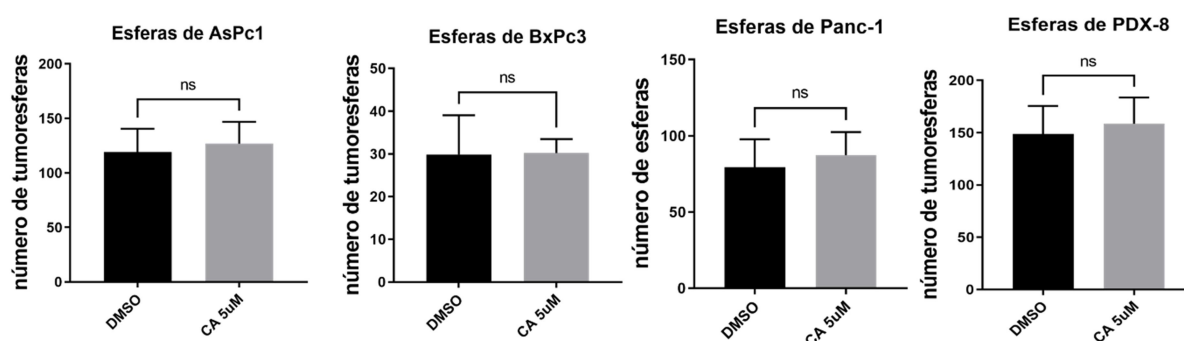


**Figura 22. O Composto A inibe a atividade de IKK $\beta$  em células de PDAC.** As células de cada linhagem indicada foram cultivadas na forma aderente e tratadas com 5 $\mu$ M do Composto A (CA) ou com volume idêntico do veículo (DMSO) pelos tempos indicados na imagem. Os extratos proteicos foram coletados e avaliados através de *Western Blotting* com os anticorpos específicos para as proteínas indicadas. As bandas proteicas relativas a P-I $\kappa$ B $\alpha$  (ser32) foram normalizadas pelo I $\kappa$ B $\alpha$  total, este já normalizado pelo controle endógeno ( $\alpha$ -tubulina) e a quantificação relativa das bandas foi feita em relação à amostra referência em cada caso (DMSO) usando o *software* ImageJ.

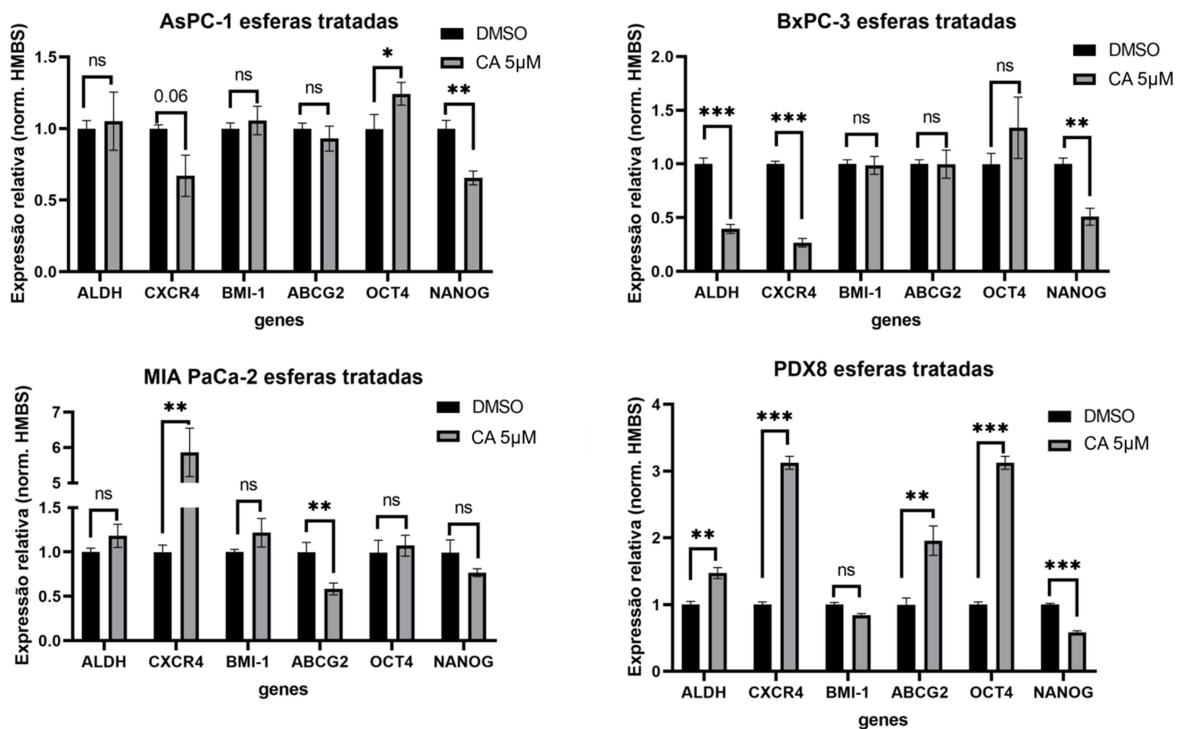
Conforme previsto, observamos uma redução de 15-50% (variando de acordo com a linhagem e o tempo de tratamento) na fração de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada (valores abaixo das bandas de P-I $\kappa$ B $\alpha$ ) nas células tratadas com o inibidor em comparação com o grupo controle tratado com DMSO (veículo). Além disso, notamos um aumento nos níveis totais de I $\kappa$ B $\alpha$  (valores abaixo das bandas de I $\kappa$ B $\alpha$ ), o que indica uma estabilização da proteína decorrente da inibição de sua degradação proteolítica devido

a sua não fosforilação (**Fig. 22**). Esses resultados indicam que o Composto A está agindo conforme esperado, reduzindo a ativação canônica do NF- $\kappa$ B.

Em seguida, avaliamos se o Composto A é capaz de inibir a formação de tumoresferas de PDAC. Para estes ensaios, o inibidor foi adicionado apenas no momento do plaqueamento das células em placas de baixa adesão. Ao contrário do esperado, não observamos diferença significativa para nenhuma das linhagens no número de tumoresferas formadas (**Fig. 23**). Em paralelo, avaliamos a expressão de genes associados à biologia das CITs nas tumoresferas formadas na presença ou ausência de Composto A. Os resultados foram bastante heterogêneos entre as linhagens (**Fig. 24**). BMI-1 e OCT-4 não apresentaram diferença significativa ou, ao contrário do esperado, apresentaram expressão aumentada em algumas linhagens. O ALDH, CXCR-4 e ABCG2 apresentaram, dependendo da linhagem, expressão inalterada, significativamente aumentada ou significativamente diminuída. O NANOG foi o único gene que apresentou expressão significativamente reduzida pelo Composto A em 3 das 4 linhagens analisadas.



**Figura 23. O composto A não afeta significativamente a capacidade de formação de tumoresferas de linhagens de PDAC.** As células indicadas foram plaqueadas em culturas para formação de tumoresferas, sendo tratadas uma única vez no momento do plaqueamento com 5µM Composto A (CA) ou volume idêntico do veículo (DMSO) e o número de tumoresferas formadas foi contado após 14 dias de cultura. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* (ns, não significativo).



**Figura 24. O Composto A tem efeito heterogêneo sobre a expressão de genes associados à biologia das CITs em PDAC.** As células indicadas foram plaqueadas em culturas para formação de tumoresferas, sendo tratadas uma única vez no momento do plaqueamento com 5µM Composto A (CA) ou volume idêntico do veículo (DMSO) e o RNA foi extraído após 14 dias de cultura. A expressão gênica foi analisada por qRT-PCR (método  $\Delta\Delta C_t$ ) usando HMBS como controle endógeno para normalização. Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* não pareado com correção pelo método de Bonferroni-Dunn (NS, não significativo, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) comparando o grupo CA com o grupo DMSO.

#### 11.4 Geração do modelo SORE6-GFP e validação nas linhagens de PDAC

Como a inibição farmacológica da IKK $\beta$  não afetou a formação de tumoresferas em linhagens de PDAC e, tendo em vista a conhecida heterogeneidade de CITs (CABRERA; HOLLINGSWORTH; HURT, 2015; MARJANOVIC; WEINBERG; CHAFFER, 2013; MOHAN *et al.*, 2021; PISCO; HUANG, 2015), nós levantamos a possibilidade de que a IKK $\beta$  pudesse afetar preferencialmente uma população de CITs que não é enriquecida pela cultura de tumoresferas, principalmente levando em consideração que a inibição de IKK $\beta$  resultou em uma inibição consistente na expressão de NANOG nas tumoresferas das linhagens investigadas (Fig. 24). Para investigar esta possibilidade, empregamos uma estratégia alternativa, que consistiu na geração de linhagens repórter para elementos do promotor de NANOG, denominadas linhagens SORE6 (do inglês “*Sox2-Oct4 responsive element 6x*”), modelo previamente utilizado na literatura para avaliar CITs em linhagens de outros tipos tumorais, como

câncer de mama, gástrico e linfoma (MOHAN *et al.*, 2021; PÁDUA *et al.*, 2020; TANG, B. *et al.*, 2015).

Mais especificamente, o modelo SORE6 foi desenvolvido pelo grupo de WAKEFIELD *et al.* e consiste em um vetor lentiviral contendo o gene repórter da proteína fluorescente verde (GFP) sob o controle do promotor mínimo do citomegalovírus (mCMV) acrescido do elemento regulatório SORE6 (Fig. 25). Este elemento contém 6 cópias concatenadas de um elemento composto de resposta aos fatores de transcrição SOX2 e OCT4 (do inglês “SOX2/OCT4 Response Element”, SORE) proveniente do promotor do gene NANOG (TANG, B. *et al.*, 2015).. Assim, nesse modelo, a expressão de GFP depende da presença e atividade dos fatores de transcrição de pluripotência, SOX2 e/ou OCT4. Promotores baseados em porções dos promotores de SOX2, OCT4 ou NANOG têm sido utilizados no monitoramento da reprogramação para pluripotência e estes têm atividade elevada em CITs (HOTTA *et al.*, 2009; LEVINGS *et al.*, 2009; SCHMIDT; PLATH, 2012). Além disso, essa construção leva a expressão de uma versão desestabilizada da proteína GFP com meia vida curta dentro das células devido a presença de uma sequência que a direciona para degradação proteossomal (sequência “degron” da ornitina descaboxilase), garantindo que a expressão de GFP não irá perdurar na célula após a inativação de SOX2 e/ou OCT4 e garantindo que apenas as células que possuem atividade destes fatores sejam identificadas.

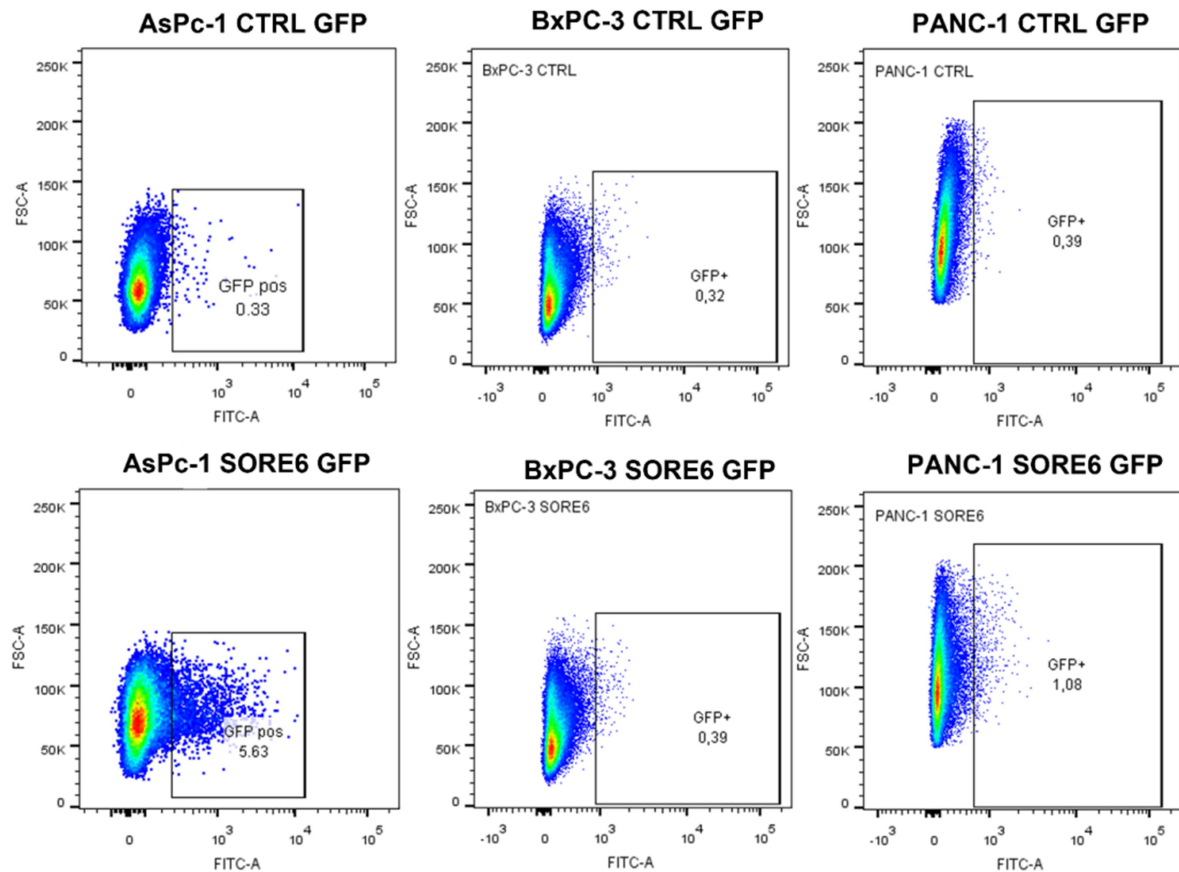


**Figura 25. Esquema do vetor lentiviral SORE6 com repórter GFP para CITs.** O esquema mostra a região inserida no genoma celular após a infecção lentiviral, contendo o gene para resistência a puomicina (Puro) sob expressão constitutiva a partir do promotor humano PGK (PGKp) e o gene repórter GFP desestabilizado sob o controle de expressão do promotor mínimo CMV (mCMVp) acrescido de 6 repetições do elemento responsivo aos fatores de transcrição OCT4 e SOX2, denominado SORE6 (do inglês “Sox2-Oct4 Responsive Element 6x”). A desestabilização do repórter GFP é causada pela inserção da sequência “degron” da ornitina descarboxilase, que encaminha essa proteína para degradação pelo proteossomo. Adaptado de (TANG, B. *et al.*, 2015).

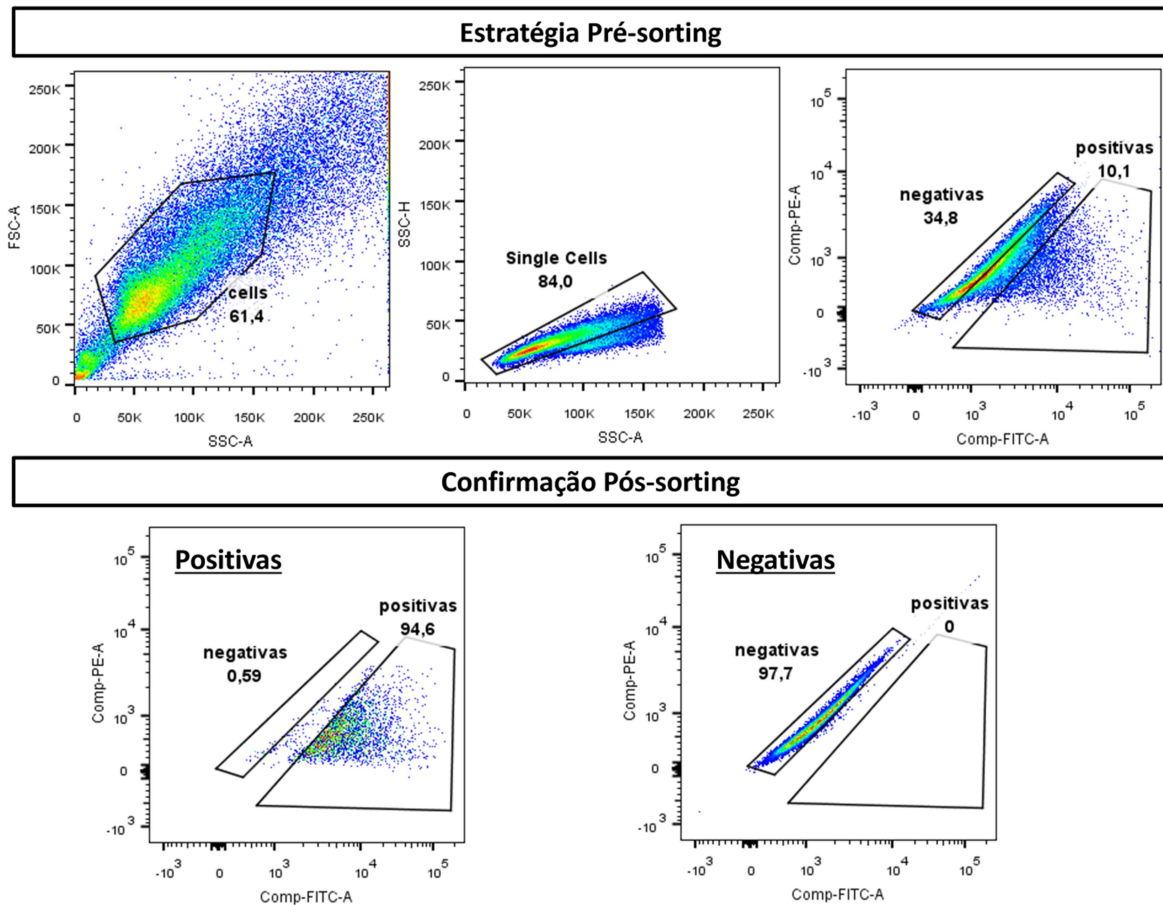
Para gerar linhagens pancreáticas com integração estável da construção SORE6-GFP, nós primeiramente realizamos a transdução lentiviral de 4 linhagens celulares de PDAC (AsPC-1, PANC-1, BXPC-3 e PDX8). Como controle, as mesmas linhagens foram transduzidas com a construção controle (CTRL-GFP), na qual o elemento SORE6 está ausente do promotor do gene repórter GFP. Em seguida, procedemos com a seleção com o antibiótico puromicina para eliminar as células não transduzidas. Infelizmente, a linhagem PDX8 não se mostrou infectável pelos lentivírus em repetidas tentativas, sendo que todas as células desta linhagem morreram na etapa de seleção com o antibiótico puromicina. Com relação às outras 3 linhagens, obtivemos células estáveis que resistiram à seleção com puromicina, mas que apresentaram frequências distintas de células GFP-positivas (**Fig. 26**).

A linhagem BxPC-3 não apresentou células GFP-positivas, já que não houve diferença em relação à mesma linhagem portadora do vetor CTRL-GFP. A linhagem PANC-1 apresentou frequência de células GFP-positivas muito baixa (menos de 1% na comparação com o controle), sendo a linhagem AsPC-1 a que apresentou a maior porcentagem de células GFP-positiva (cerca de 5%) (**Fig. 26**). Como a BxPC-3 não apresentou células GFP-positivas e a PANC-1 apresentou uma frequência muito baixa, o que torna inviável a análise de experimentos que afetem a frequência de CITs e que dificulta a purificação de células GFP-positivas para experimentos subsequentes, nós optamos por dar seguimento aos estudos apenas com a linhagem AsPC-1-SORE6.

Para validar que as células AsPC-1-SORE6 GFP-positivas são enriquecidas em CITs, nós realizamos purificação por citometria acoplada à separação celular ativada por fluorescência das células GFP-positivas e negativas para ensaios subsequentes (**Fig. 27**). Nós conseguimos uma boa eficiência na separação das células, visto que nas amostras purificadas (pós-“*sorting*”), mais de 94% das células estavam dentro das respectivas áreas de seleção (“*gates*”) de interesse.



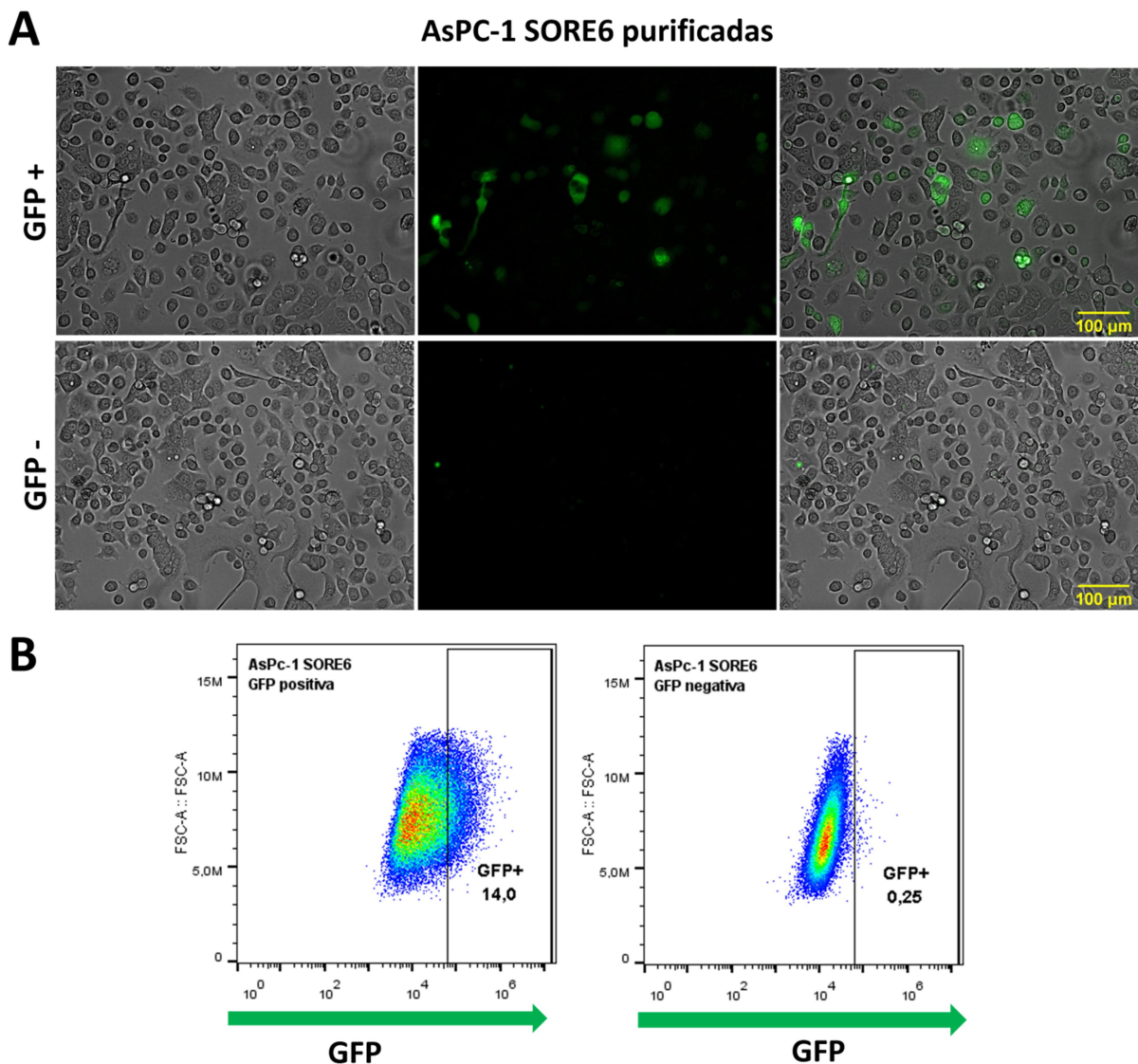
**Figura 26.** A proporção de células GFP positivas nas linhagens de PDAC portadoras da construção SORE6-GFP é variável. Cada linhagem foi transduzida com MOI de 1 de lentivírus contendo o vetor repórter SORE6-GFP ou CTRL-GFP (sem os elementos SORE6 no promotor) conforme indicado na figura, seguido da seleção com 1 $\mu$ g/ml de puromicina por 5 dias. As linhagens foram analisadas para presença de células fluorescentes (GFP-positivas) por citometria de fluxo. O espalhamento frontal e lateral foi utilizado para selecionar células viáveis para análise. Os gráficos de pontos representam o número de eventos registrados separados em relação ao espalhamento frontal (eixo y) usando uma escala linear e a intensidade de emissão de fluorescência no canal FITC (eixo x, canal de emissão do GFP) usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células GFP-positivas foi definido arbitrariamente em cada caso (representado por quadrantes) com base no padrão obtido para as células controle (CTRL-GFP) e a porcentagem de células positivas está indicada em cada caso.



**Figura 27. Estratégia empregada para purificação (“*sorting*”) das células AsPC-1-SORE6 GFP-positivas e negativas, com a validação pós “*sorting*”.** A citometria de fluxo acoplada à separação celular ativada por fluorescência foi utilizada para purificação das células GFP-positivas e negativas. As células selecionadas em cada passo estão indicadas pelas áreas de seleção (“*gates*”) em cada gráfico (A) O espalhamento frontal e lateral foi utilizado para selecionar células viáveis para análise. (B) As células viáveis foram analisadas por espalhamento frontal e altura frontal para excluir células agregadas e selecionar células únicas. (C) As células únicas foram analisadas para emissão de fluorescência nos canais PE e FITC para seleção de células GFP-positivas e negativas para purificação. Esta seleção foi feita com base no perfil das células CTRL-GFP (sem o SORE6 no promotor, não mostrado). (D) Citometria de fluxo das células GFP-negativas após a purificação. (E) Citometria de fluxo das células GFP-positivas após a purificação.

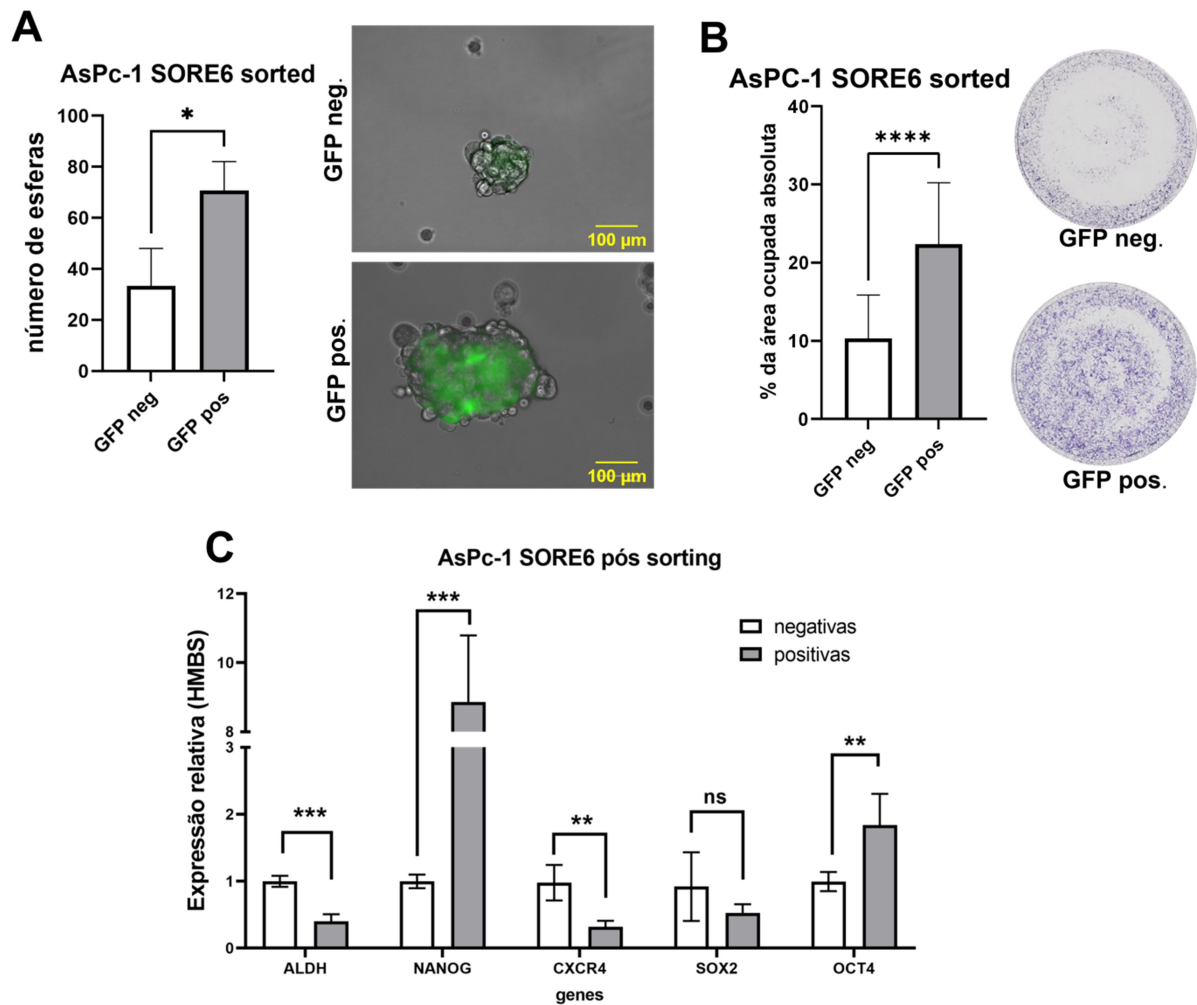
Em seguida nós avaliamos, inicialmente, a capacidade de diferenciação das células GFP-positivas. Uma das características de CITs é que elas são capazes de se diferenciar em células não-CITs, enquanto a interconversão de células não-CITs para CITs, embora possível, é mais rara. Consistentemente, nós observamos que as células GFP-positivas, ao serem colocadas novamente em cultura, foram capazes de dar origem a células GFP-negativas, bem como de se autorrenovarem mantendo uma fração GFP-positiva (de cerca de 14%) após mais de 21 dias de cultura (Fig. 28). Já as células GFP-negativas não foram capazes de originar células GFP-positivas sob as mesmas condições de cultivo, o que nesse modelo indicaria que não foram capazes adquirir um fenótipo tronco (Fig. 28).





**Figura 28. Células SORE6 com fenótipo tronco (GFP-positivas) dão origem a células sem fenótipo tronco (GFP-negativas).** As células AsPC-1 SORE6 GFP-positivas e GFP-negativas foram purificadas por citometria de fluxo acoplada à separação celular ativada por fluorescência (ver **Fig. 26**) e plaqueadas em cultura aderente por 21 dias. **(A)** Imagens de microscopia 21 dias após o plaqueamento das populações GFP-positiva e GFP-negativa purificadas. Esquerda) Imagem registrada usando campo claro (*"bright field"*); Centro) imagem registrada com filtro para detecção da fluorescência emitida por GFP; Direita) Sobreposição das imagens de campo claro e de fluorescência. **(B)** Após 21 dias em cultura, as células oriundas das populações GFP-positiva e GFP-negativa foram avaliadas por citometria de fluxo. O espalhamento frontal e lateral foi utilizado para selecionar células viáveis para análise. Os gráficos de pontos representam o número de eventos registrados separados em relação ao espalhamento frontal (eixo y) usando uma escala linear e a intensidade de emissão de fluorescência no canal FITC (eixo x, canal de emissão do GFP) usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células GFP-positivas foi definido arbitrariamente (representado por quadrantes) com base no padrão obtido para as células controle (CTRL-GFP, não mostrado) e a porcentagem de células positivas está indicada em cada caso.

Condizente com um enriquecimento de CITs, as células GFP-positivas foram capazes de formar 2,1 vezes mais tumoresferas do que as células GFP-negativas (**Fig. 29-A**). A observação das tumoresferas ao microscópio mostrou que as tumoresferas oriundas das células GFP-positivas, não só eram maiores que as formadas pelas células GFP-negativas, mas também apresentavam uma alta proporção de células GFP-positivas. Por outro lado, o fato de que as células GFP-negativas foram também capazes de formar tumoresferas indica que o enriquecimento para CITs com base no repórter GFP não é absoluto, ou que células não-CITs são capazes de adquirir o fenótipo tronco quando submetidas à cultura de tumoresferas. O fato das tumoresferas geradas por células GFP-negativas apresentarem algumas células GFP-positivas apóia esta segunda opção (**Fig. 29-A**). Além disso, consistente com o fenótipo mais agressivo das CITs, quando comparadas às células GFP-negativas, as células GFP-positivas demonstraram maior capacidade migratória (**Fig. 29-B**). Finalmente, as células GFP-positivas mostraram um aumento significativo de expressão de NANOG e OCT4 em relação às células GFP-negativas, o que, não só é condizente com a estratégia usada para seleção, mas também é condizente com um enriquecimento do fenótipo tronco nesta população (**Fig. 29-C**). É interessante que, enquanto as tumoresferas de AsPC-1 apresentam aumento de ALDH (**Fig. 24**), as células AsPC-1 SORE6 GFP-positivas apresentam diminuição deste marcador de CITs (**Fig. 29-C**), indicando a possibilidade de que esta linhagem possua diferentes populações celulares com características tronco-tumorais.



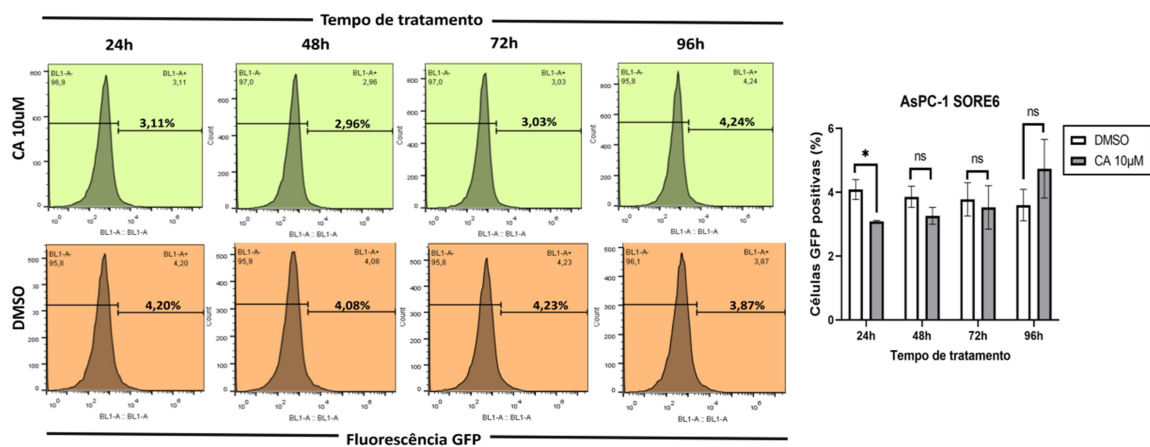
**Figura 29.** As Células AsPC-1-SORE6 GFP-positivas apresentam aumento de características associadas ao fenótipo tronco-tumoral. As populações GFP-positiva e GFP-negativa da linhagem AsPC-1-SORE6 foram purificadas por citometria de fluxo conforme descrito na Fig. 27. **(A)** As células GFP-positivas e negativas foram plaqueadas separadamente para cultura de tumoresferas e o número de tumoresferas formadas foi contado após 14 dias (esquerda). As tumoresferas formadas foram avaliadas por sobreposição de imagens de microscopia de campo claro (*“brightfield”*) e de fluorescência (direita). **(B)** As células GFP-positivas e GFP-negativas foram submetidas a ensaio de migração celular *“transwell”* e a área ocupada por células migratórias foi mensurada. Esquerda) Quantificação da área migrada. Direita) Imagens representativas. **(C)** A expressão dos genes indicados nas populações GFP-positiva e GFP-negativa foi analisada por RT-qPCR (método  $\Delta\Delta Ct$ ) usando HBMS como controle endógeno para normalização. Em todos os casos, os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* não pareado com correção pelo método de Bonferroni-Dunn (NS, não significativo, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) comparando o grupo GFP-positivo (GFP pos) com o grupo GFP-negativo (GFP neg).

### 11.5 A Inibição farmacológica da IKK $\beta$ no modelo celular SORE6-GFP reduz transitoriamente a proporção de células GFP-positivas

Para avaliar se a inibição farmacológica de IKK $\beta$  reduz o fenótipo tronco-tumoral em um modelo alternativo à cultura de tumoresferas para enriquecimento de CITs, nós, em um primeiro momento, avaliamos, nas células AsPC-1 SORE6-GFP originais não

purificadas, se a inibição de IKK $\beta$  com o Composto A alteraria o percentual de células GFP-positivas enriquecidas em CITs. O Composto A reduziu o percentual de células GFP-positivas, mas esta redução foi transitória, ocorrendo apenas no tempo de 24h, sendo que não foram observadas diferenças estatísticas na proporção de células GFP-positivas nos tempos subsequentes (**Fig. 30**).

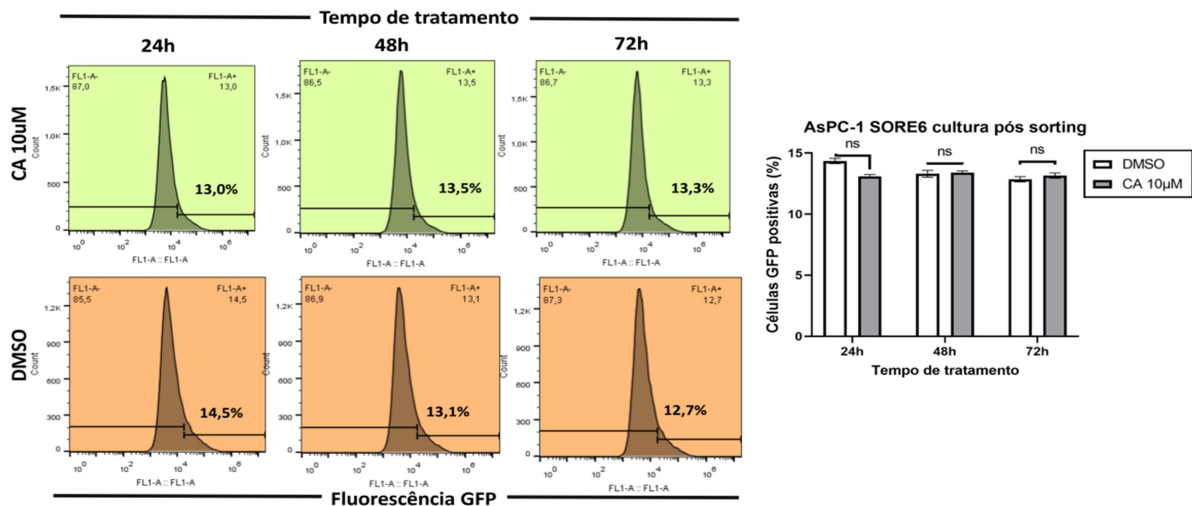
Uma possível explicação par este efeito transitório, é que a inibição de IKK $\beta$  pode afetar tanto CITs quanto não-CITs, mas com cinética diferente. Assim, as CITs seriam afetadas por esta inibição antes das células não-CITs, ocasionando a redução da população GFP-positiva observada em 24h. Posteriormente, as células não-CITs seriam afetadas, reduzindo a população GFP-negativa e causando um aumento na proporção de células GFP-positivas, que retorna à proporção observada na ausência de tratamento. Isto é corroborado pelo aparente aumento de células GFP-positivas no decorrer do tratamento, mesmo que este aumento não seja estatisticamente significativo.



**Figura 30. A inibição farmacológica de IKK $\beta$  em células AsPC-1 SORE6-GFP não purificadas reduz transitariamente a proporção de células GFP-positivas.** As células AsPC-1 SORE6-GFP não purificadas foram tratadas com o inibidor farmacológico da IKK $\beta$  (Composto A – CA) na concentração de 10 $\mu$ M ou volume idêntico do veículo dimetilsulfóxido (DMSO) pelos tempos indicados, sendo trocado o meio com adição de inibidor “fresco” a cada 24h. Esquerda) A proporção de células GFP-positivas foi analisada por citometria de fluxo. O espalhamento frontal e lateral foi utilizado para selecionar células viáveis para análise. Os gráficos de histogramas representam o número de eventos registrados (“count”, eixo y) usando uma escala linear em função da intensidade de emissão de fluorescência no canal FITC (eixo x, canal de emissão do GFP) usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células GFP-positivas foi definido arbitrariamente (linhas horizontais separando células positivas de negativas) com base no padrão obtido para as células controle (CTRL-GFP, não mostrado) e a porcentagem de células positivas está indicada em cada caso. Direita) O gráfico de barras representa a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* múltiplo (ns, não significativo, \* $p < 0,05$ ) comparando o grupo CA com o grupo DMSO.

Tendo em vista que a linhagem AsPC-1 SORE6-GFP original possuía um percentual baixo de células GFP-positivas de cerca de 4% (**Fig. 26**), enquanto células

oriundas do cultivo de células GFP-positivas purificadas possuíam um percentual maior de cerca de 14% (**Fig. 28**), nós achamos que esta população mais enriquecida para células GFP-positivas pudesse mostrar de forma mais confiável o impacto da inibição de IKK $\beta$  sobre as CITs. Portanto, nós repetimos o tratamento com o Composto A usando esta população com maior percentual de células GFP-positivas. Entretanto, embora o padrão observado anteriormente de redução da proporção de células GFP-positivas em 24h seguida de um retorno à proporção inicial em tempos subsequentes (**Fig. 30**) tenha se repetido, ele teve menor amplitude relativa e as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (**Fig. 31**).



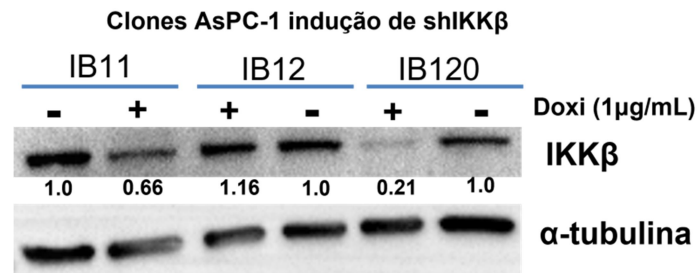
**Figura 31. A inibição farmacológica de IKK $\beta$  em células oriundas de cultura de células GFP-positivas purificadas da linhagem AsPC-1 SORE6-GFP não afeta significativamente a proporção de células GFP-positivas.** A população GFP-positiva da linhagem AsPC-1-SORE6-GFP foi purificada por citometria de fluxo conforme descrito na **Fig. 27** e cultivada por 21 dias para diferenciação. **(A)** Após 21 dias de cultivo, as células foram tratadas com o inibidor farmacológico da IKK $\beta$  (Composto A – CA) na concentração de 10 $\mu$ M ou volume idêntico do veículo dimetilsulfóxido (DMSO) pelos tempos indicados, sendo trocado o meio com adição de inibidor “fresco” a cada 24h. Esquerda) A proporção de células GFP-positivas foi analisada por citometria de fluxo. O espalhamento frontal e lateral foi utilizado para selecionar células viáveis para análise. Os gráficos de histogramas representam o número de eventos registrados (“count”, eixo y) usando uma escala linear em função da intensidade de emissão de fluorescência no canal FITC (eixo x, canal de emissão do GFP) usando uma escala logarítmica. O limiar para detecção de células GFP-positivas foi definido arbitrariamente (linhas horizontais separando células positivas de negativas) com base no padrão obtido para as células controle (CTRL-GFP, não mostrado) e a porcentagem de células positivas está indicada em cada caso. Direita) O gráfico de barras representa a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 2 experimentos independentes em triplicata técnica. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* múltiplo (ns, não significativo).

Em conjunto, estes resultados indicam que a inibição farmacológica de IKK $\beta$  não apresenta seletividade significativa para a população GFP-positiva enriquecida para CITs e corrobora os resultados obtidos com tumoresferas, indicando que a inibição farmacológica de IKK $\beta$  em modelos celulares de PDAC não parece afetar significativamente o fenótipo tronco.

### 11.6 Silenciamento gênico de IKK $\beta$

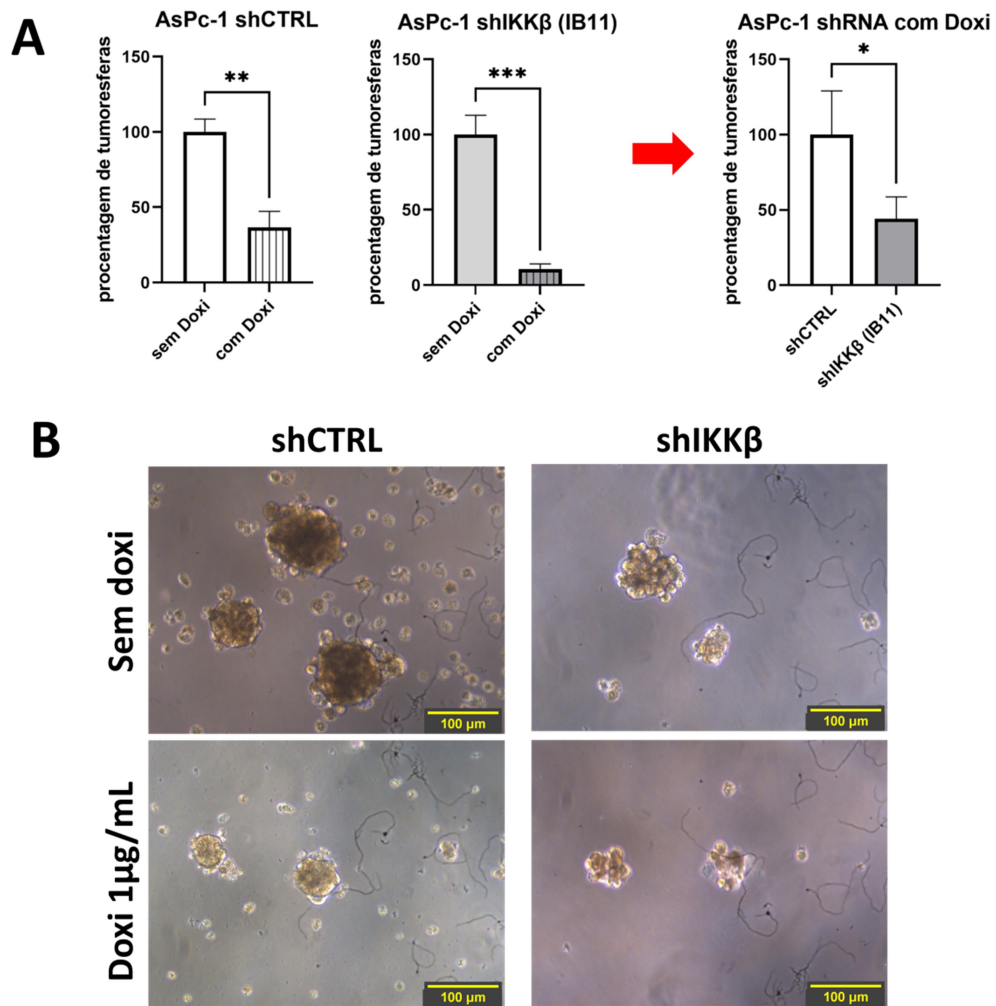
A inibição farmacológica da quinase IKK $\beta$  com o Composto A em células de PDAC, exceto por causar uma redução na expressão de NANOG, não afetou significativamente o fenótipo tronco-tumoral em dois modelos de enriquecimento de CITs. No entanto, isto não descarta o envolvimento da IKK $\beta$  neste fenótipo, tendo em vista que inibidores farmacológicos podem atuar sobre outros alvos (efeitos “*off-target*”), podendo, desta forma, afetar vias independentes que atuem para, por exemplo, contrabalançar os efeitos da inibição de IKK $\beta$  sobre o fenótipo tronco-tumoral. Ademais, a inibição farmacológica afeta a capacidade catalítica da IKK $\beta$ , mas não funções independentes da atividade de quinase, que podem ser importantes para mediar sua ação sobre CITs.

Portanto, para melhor caracterizar o papel da IKK $\beta$  sobre o fenótipo tronco-tumoral, nós resolvemos usar uma abordagem alternativa para inibição da IKK $\beta$ , mais especificamente, a inibição da sua expressão por abordagens envolvendo interferência de RNA. Uma abordagem utilizada foi gerar células com a expressão induzível de um shRNA (do inglês, “*short hairpin RNA*”) para IKK $\beta$  a partir do vetor pTRIPz (ver métodos), que já se encontrava disponível no laboratório. Para isso, procedemos com a infecção lentiviral das células AsPC-1, seguida da seleção de clones estáveis resistentes à puromicina. Em seguida, tratamos separadamente cada clone com doxiciclina para induzir a expressão do shRNA de interesse e avaliar o nível de inibição de expressão da IKK $\beta$  atingido em cada clone. Esta análise nos permitiu identificar dois clones, IB11 e IB120, que apresentaram redução de 34% e 79% respectivamente na expressão proteica de IKK $\beta$  (**Fig. 32**). Infelizmente, não pudemos usar o clone IB120 nos ensaios subsequentes de tumoresferas porque este apresentou persistente contaminação por leveduras, mesmo nos estoques, e o tratamento que com Anfotericina B comprometeu bastante as células deste clone.



**Figura 32. Clones da linhagem AsPC-1 com expressão induzível por doxíciclina de um shRNA para IKK $\beta$  apresentam redução na expressão proteica de IKK $\beta$ .** Após a seleção clonal das células AsPC-1 transduzidas com vetor lentiviral pTRIPz para expressão induzível de um shRNA para IKK $\beta$  (AsPC-1-shIKK $\beta$ ), os clones foram expandidos separadamente e tratados ou não com 1 $\mu$ g/ml de doxíciclina (Doxi) por 4 dias, seguido do preparo de extratos de proteína total. A expressão de IKK $\beta$  foi avaliada por *western blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas relativas à IKK $\beta$  foram normalizadas pelo controle endógeno ( $\alpha$ -tubulina) e a quantificação relativa das bandas foi feita em relação à amostra referência em cada caso (sem Doxi) usando o *software* ImageJ.

Após a seleção de clones com inibição induzível por doxíciclina da expressão de IKK $\beta$ , nós avaliaremos como esta inibição afeta a capacidade de formação de tumoresferas. Pela razão relatada acima, usamos o clone IB11 nestes experimentos. Inesperadamente pudemos observar que o indutor doxíciclina é capaz de impactar significativamente a capacidade destas células de formarem tumoresferas, uma vez que células AsPC-1 controle expressando um shRNA sem alvos conhecidos (shCTRL) apresentaram uma redução de mais de 60% no número de tumoresferas formadas na presença de doxíciclina. Entretanto, as células AsPC-1 expressando o shRNA para IKK $\beta$  apresentaram uma redução ainda mais expressiva de 87%. Quando comparamos as células shCTRL com as células shIKK $\beta$  na presença de doxíciclina, observamos que a inibição de IKK $\beta$  leva a uma redução de mais de 50% na quantidade de tumoresferas formadas (**Fig. 33-A**).

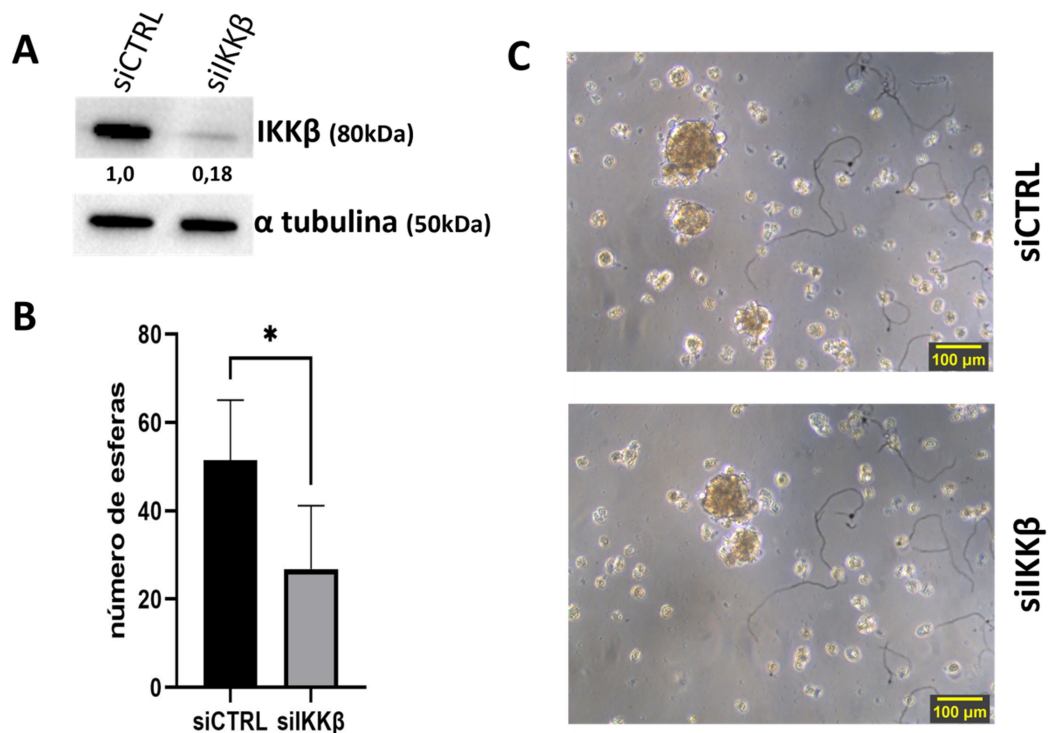


**Figura 33. A inibição induzível da expressão de IKK $\beta$  por interferência de RNA com shRNA em células AsPC-1 reduz a formação de tumoresferas.** As células oriundas do clone IB11 expressando induzivelmente um shRNA para IKK $\beta$  (shIKK $\beta$ ) ou células AsPC-1 expressando induzivelmente um shRNA controle (shCTRL) foram tratadas com 1 $\mu$ g/ml de doxiciclina (Doxi) por 48h e em seguida plaqueadas em placas anti aderentes para formação de tumoresferas. A doxiciclina foi adicionada no primeiro dia da cultura com reposição a cada 5 dias e o número de tumoresferas formadas foi contado após 14 dias. **(A)** Os dois gráficos da esquerda representam a porcentagem de tumoresferas formadas na presença de indução (com Doxi) relativamente ao controle (sem Doxi). O gráfico da direita representa a porcentagem de tumoresferas formadas nas células AsPC-1-shIKK $\beta$  relativamente às células AsPC-1-shCTRL, ambas na presença de doxiciclina (com Doxi). Em todos os casos, os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001). **(B)** Imagens de campo claro (*“brightfield”*) representativas das tumoresferas formadas em cada caso.

Para corroborar estes resultados com RNAs de interferência distintos para IKK $\beta$ , nós transfectamos as células AsPC-1 com uma mistura (*“smartpool”*) de 5 siRNAs (do inglês, *“small interfering RNAs”*) para IKK $\beta$ . Comparado às células AsPC-1 transfectadas com o siRNA controle, as células transfectadas com os siRNAs para IKK $\beta$  apresentaram uma redução de 82% nos níveis proteicos de IKK $\beta$  (Fig. 34-A). Esta redução foi acompanhada por uma redução de 47% no número de tumoresferas



formadas (**Fig. 34-B**), confirmando que a inibição da expressão de IKK $\beta$  interfere nas propriedades tronco-tumorais das células, reduzindo a proporção de CITs capazes de formar tumoresferas.



**Figura 34. A inibição da expressão de IKK $\beta$  por interferência de RNA com siRNAs em células AsPC-1 reduz a formação de tumoresferas.** As células AsPC-1 foram transfectadas com 50 $\eta$ M do *smartpool* siRNA para IKK $\beta$  (siIKK $\beta$ ) ou siRNA controle (siCTRL, sem alvos conhecidos) e, após 96h, foi obtido o extrato proteico de parte das células, sendo que a outra parte foi plaqueada para formação de tumoresferas. (A) A expressão de IKK $\beta$  foi avaliada por western blotting com os anticorpos indicados. As bandas proteicas relativas à IKK $\beta$  foram normalizadas pelo controle endógeno ( $\alpha$ -tubulina) e a quantificação relativa das bandas foi feita em relação à amostra referência (siCTRL) usando ImageJ. (B) O número de tumoresferas formadas foi determinado após 14 dias de cultura. O gráfico representa a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* (\* $p$ <0,05). (C) Imagens de campo claro (“*brightfield*”) representativas das tumoresferas formadas.

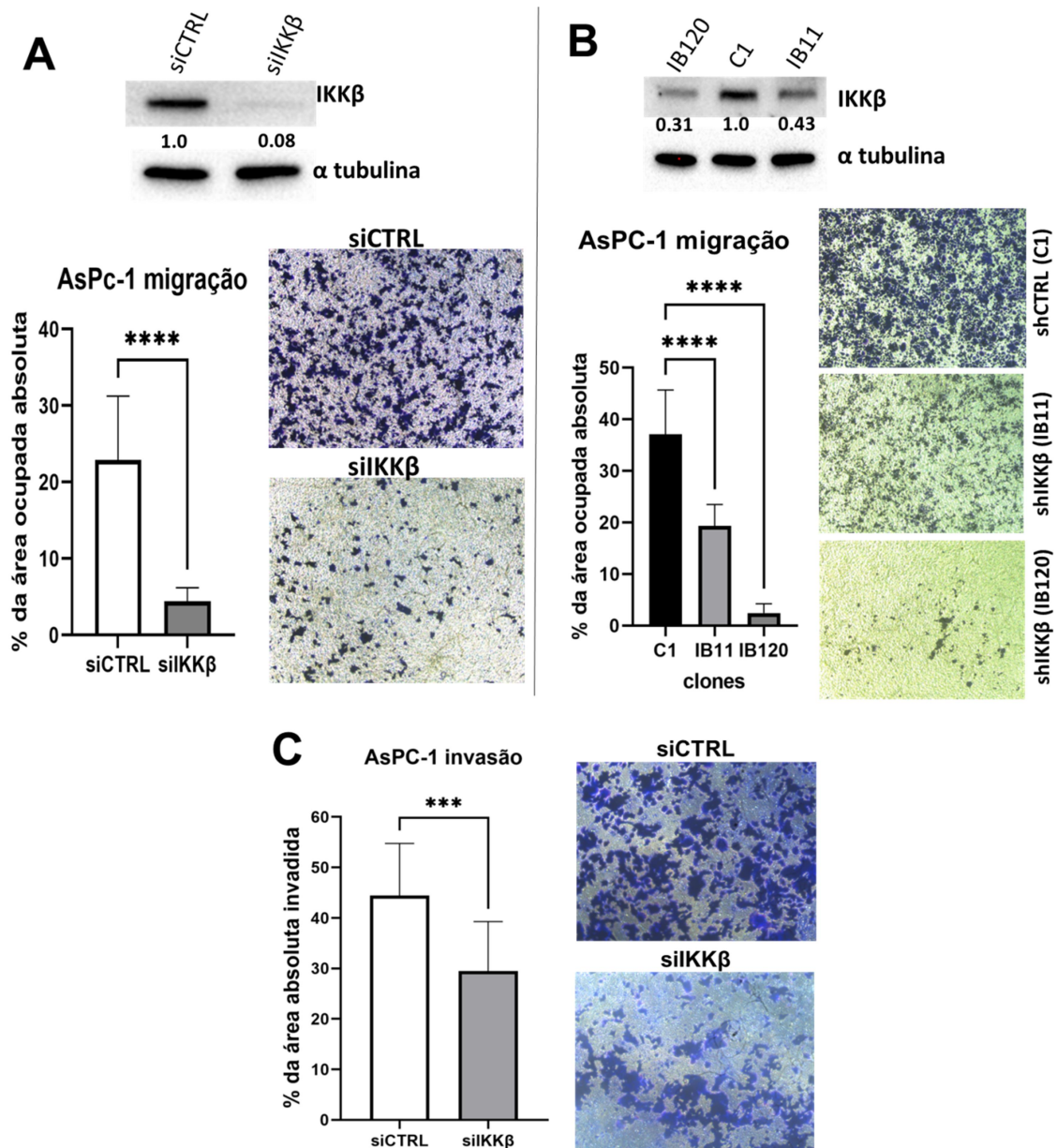
### 11.7 A inibição de IKK $\beta$ reduz a migração e invasão celular diminuindo a transição epitélio-mesênquimal

Como as CITs são consideradas responsáveis pela disseminação metastática (CELIÀ-TERRASSA; JOLLY, 2020; STEINBICHLER *et al.*, 2020), e como a IKK $\beta$  reduz o fenótipo tronco-tumoral em células tumorais pancreáticas, nós hipotetizamos que a inibição de IKK $\beta$  iria afetar paralelamente outras propriedades malignas relacionadas à capacidade metastática. Para testar esta hipótese, nós avaliamos os efeitos da inibição da IKK $\beta$  sobre a capacidade migratória e invasiva das células tumorais de PDAC, uma

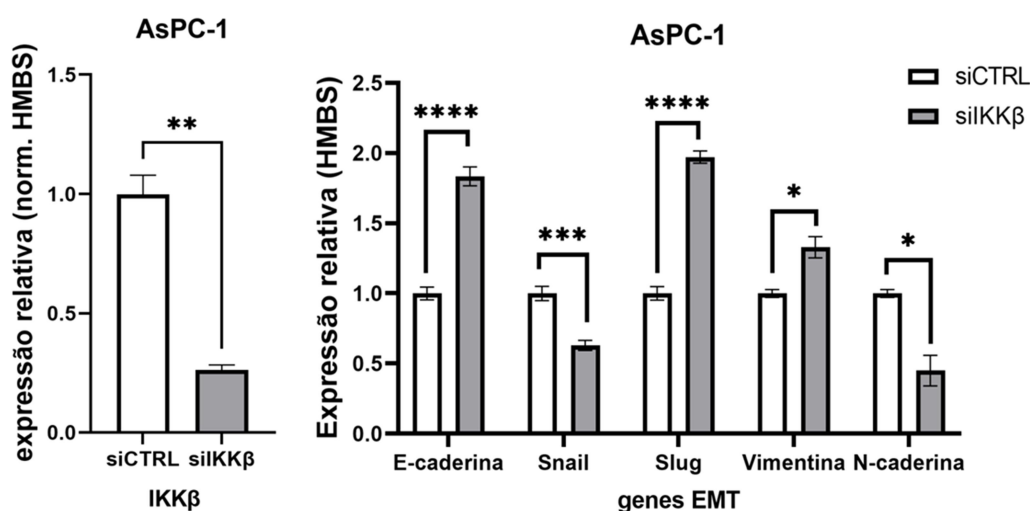
vez que a aquisição de capacidade migratória e invasiva é uma característica importante para a disseminação metastática.

Usando os dois modelos anteriores de inibição da expressão de IKK $\beta$  por interferência de RNA, pudemos observar que a inibição de de IKK $\beta$  nas células AsPC-1, tanto por transfecção com uma mistura de siRNAs para IKK $\beta$  (**Fig. 35-A e C**), quanto por indução da expressão de um shRNA para IKK $\beta$  por doxíciclina (**Fig. 35-B**), resultou em uma expressiva redução na migração celular, de 48-95% dependendo do modelo e clone analisado. Corroborando a importância de IKK $\beta$  para a metástase, as reduções observadas na migração celular parecem dependentes do nível de inibição de IKK $\beta$ , sendo maior (aproximadamente 80% em relação ao siCTRL) no modelo de transfecção com siRNAs, que também apresentou a maior redução na nos níveis proteicos de IKK $\beta$  (redução de 92%). Além disso, no ensaio de invasão com as células transfectadas com siRNA (**Fig. 35-C**), obtivemos uma redução de aproximadamente 1/3 na área invadida por células com knockdown de IKK $\beta$  em relação as células siCTRL.

Levando em consideração a diminuição na capacidade migratória e invasiva das células após a inibição da expressão de IKK $\beta$ , também investigamos a expressão de genes associados à transição epitélio-mesenquimal (**Fig. 36**). Esse processo envolve a perda das adesões célula-célula por parte das células epiteliais e a aquisição de características mesenquimais, que conferem maior motilidade e capacidade invasiva, importantes para a geração de metástases (HEERBOTH *et al.*, 2015; MITTAL, 2018). Como resultado principal, pudemos observar que a redução de IKK $\beta$  gerou um aumento na expressão relativa do marcador epitelial E-caderina concomitantemente à redução do marcador mesenquimal N-caderina, indicando assim que IKK $\beta$  tem papel importante na aquisição de um fenótipo mais mesenquimal pelas células de PDAC e corroborando o observado na **Figura 35**, em que a redução de IKK $\beta$  diminui a de migração e invasão das células AsPC-1.



**Figura 35. A inibição de IKK $\beta$  por interferência de RNA reduz a migração e invasão celular. (A e C)** As células AsPC-1 foram transfectadas com 50nM do *smartpool* siRNA para IKK $\beta$  (siIKK $\beta$ ) ou siRNA controle (siCTRL, sem alvos conhecidos) e, após 96h, foi obtido o extrato proteico de parte das células, sendo que a outra parte foi plaqueada para os ensaios de migração. **(B)** As células oriundas de 2 clones expressando induzivelmente um shRNA para IKK $\beta$  (IB11 e IB120) ou células AsPC-1 expressando induzivelmente um shRNA controle (C1) foram tratadas com 1 $\mu$ g/ml de doxiciclina (Doxi). Após por 96h, foi obtido o extrato proteico de parte das células, sendo que a outra parte foi plaqueada para os ensaios de migração. **(A e B, Painel superior)** A expressão de IKK $\beta$  foi avaliada por western blotting com os anticorpos indicados. As bandas proteicas relativas a IKK $\beta$  foram normalizadas pelo pelo controle endógeno ( $\alpha$ -tubulina) e a quantificação relativa das bandas foi feita em relação à amostra referência (siCTRL em A e C1 em B) usando o *software* ImageJ. **(A a C)** As células foram submetidas ao ensaio de migração ou invasão “transwell” e, após 24h e 48h respectivamente, as células que migraram ou invadiram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. **(Esquerda em A, B e C)** Quantificação da área ocupada por células migratórias/invasivas. 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 siIKK $\beta$  (A e C) ou One-way ANOVA comparando os grupos C1, IB11 e IB120 (B), onde \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . **(Direita em A, B e C)** Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

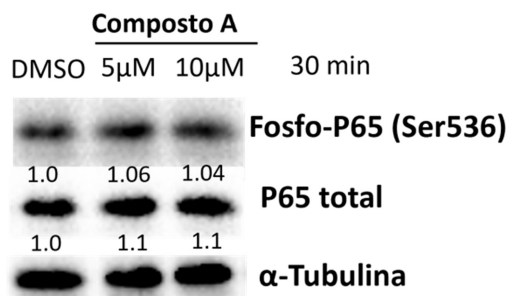


**Figura 36. A inibição de IKK $\beta$  por interferência de RNA afeta a expressão de genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (EMT).** As células AsPC-1 foram transfectadas com 50nM do *smartpool* siRNA para IKK $\beta$  (siIKK $\beta$ ) ou siRNA controle (siCTRL, sem alvos conhecidos) e, após 96h, a expressão dos genes indicados foi analisada por RT-qPCR (método  $\Delta\Delta Ct$ ) usando HBMS como controle endógeno para normalização. Em todos os casos, os gráficos de barras representam a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD). A significância estatística foi avaliada através do teste *Student-t* (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) comparando os grupos siCtrl e siIKK $\beta$ .

Com relação aos demais marcadores mesenquimais, obtivemos resultados contrastantes para os dois principais fatores de transcrição que medeiam a transição epitélio-mesenquimal, com a redução na expressão relativa de Snail e um aumento mais significativo de Slug, acompanhado de um aumento na expressão relativa de vimentina, filamento intermediário associado à motilidade celular (GEORGAKOPOULOS-SOARES *et al.*, 2020; USMAN *et al.*, 2021). Assim, embora as células com inibição de IKK $\beta$  apresentem redução da capacidade migratória e invasiva, não podemos afirmar que esta redução se deva a uma inibição da transição epitelial-mesenquimal (EMT), já que nem todos os marcadores de EMT analisados apresentam uma alteração de expressão coerente com a inibição do fenótipo mesenquimal.

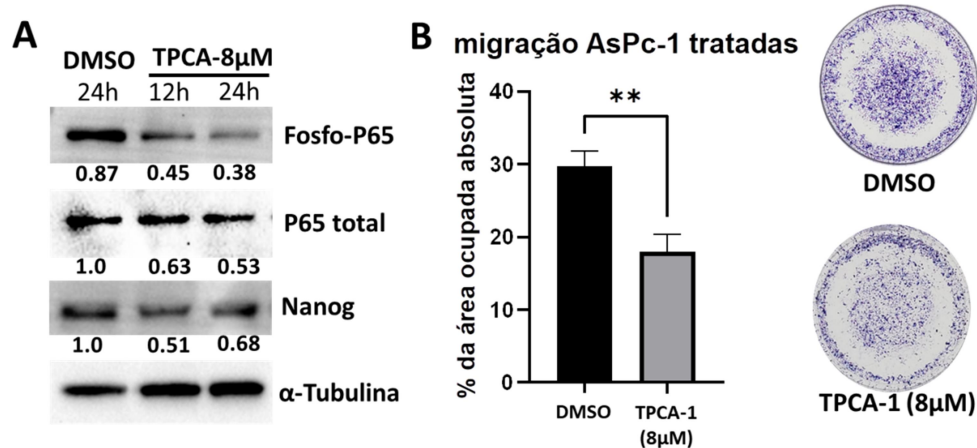
Tendo em vista que a inibição farmacológica de IKK $\beta$  com o Composto A não afetou o fenótipo tronco-tumoral, enquanto a inibição da sua expressão por interferência de RNA reduziu este fenótipo, nós nos perguntamos se a inibição da migração celular também seguiria o mesmo padrão. A estratégia inicial era usar o Composto A nestes ensaios, mas ao descongelarmos e testarmos uma nova alíquota deste inibidor, verificamos que o mesmo não inibiu a atividade de IKK $\beta$ , medida através da fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B (Fig. 36). Neste momento resolvemos adquirir um inibidor diferente da IKK $\beta$ , o TPCA-1, pois o uso de um inibidor diferente

nos permitiria determinar se a redução na migração observada com inibição da expressão de IKK $\beta$  é dependente ou não da atividade quinase desta proteína.



**Figura 37. Uma nova alíquota do Composto A não inibe a fosforilação de alvos da IKK $\beta$ .** As células AsPC-1 foram tratadas com o inibidor farmacológico da IKK $\beta$  (Composto A) nas concentrações indicadas ou volume idêntico do veículo dimetilsulfóxido (DMSO) por 30min, seguido da preparação de extratos proteicos. A inibição da atividade de IKK $\beta$  foi avaliada por *western blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas relativas a Fosfo-p65 foram normalizadas pelo p65 total, este já normalizado pelo controle endógeno ( $\alpha$ -tubulina) e a quantificação relativa das bandas foi feita em relação à amostra referência (DMSO) usando o *software* ImageJ.

Primeiro, testamos a atividade do inibidor TPCA-1 e determinamos que o mesmo na concentração de 8 $\mu$ M inibiu efetivamente a fosforilação de p65 no resíduo 536, que é alvo da IKK $\beta$  (**Fig. 38-A**). Interessantemente, o TPCA-1 parece ser um inibidor mais efetivo da IKK $\beta$  do que o Composto A, promovendo uma redução maior e mais duradoura da fosforilação do substrato p65 (62% em 24h) do que a redução observada na fosforilação do substrato I $\kappa$ B $\alpha$  pelo composto A (45% em 30 minutos) (**Figs. 38 e 22**, respectivamente). Além disso, o TPCA-1 reduziu em cerca de 39% a capacidade migratória (equivalente a redução de 11.67% na área ocupada) das células AsPC-1 (**Fig. 38-B**), indicando que a atividade de quinase da IKK $\beta$  participa do seu mecanismo pró-migratório.



**Figura 38. A inibição farmacológica de IKK $\beta$  com TPCA-1 reduz a migração celular.** As células AsPC-1 foram tratadas com o inibidor farmacológico da IKK $\beta$  (TPCA-1) na concentração de 8 $\mu$ M ou volume idêntico do veículo dimetilsulfóxido (DMSO). **(A)** Extratos proteicos foram preparados nos tempos indicados e a inibição da atividade de IKK $\beta$  foi avaliada por *western blotting* com os anticorpos indicados. As bandas proteicas relativas a Fosfo-p65 foram normalizadas pelo p65 total, este já normalizado pelo controle endógeno ( $\alpha$ -tubulina) e a quantificação relativa das bandas foi feita em relação à amostra referência (DMSO) usando o *software* ImageJ. As imagens mostradas são representativas de 2 experimentos independentes. **(B)** As células foram submetidas ao ensaio de migração “*transwell*” após 24h de tratamento com o inibidor TPCA-1 e as células que migraram foram coradas com cristal violeta e quantificadas. Esquerda) Quantificação da área ocupada por células migratórias. O gráfico de barras representa a média  $\pm$  1 desvio padrão (SD) de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através teste *student-t* (\*\* $p < 0,01$ ) comparando os grupos DMSO e TPCA-1. Direita) Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

Quando avaliados em conjunto, os resultados deste capítulo indicam que a quinase IKK $\beta$  promove o fenótipo tronco-tumoral e migratório/invasivo em PDAC e sugerem a inibição efetiva desta quinase como uma abordagem adjuvante promissora para a terapia de PDAC, podendo diminuir a proporção de CITs migratórias e impactando, desta forma, a disseminação metastática e a sobrevida dos pacientes.

## 12. DISCUSSÃO

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), que representa mais de 90% dos tumores de pâncreas, ainda é uma doença extremamente letal, com uma sobrevida média de 6 meses e uma sobrevida global de 5 anos de menos de 10% (NEVALA-PLAGEMANN; HIDALGO; GARRIDO-LAGUNA, 2020; PARK; CHAWLA; O'REILLY, 2021). Uma razão importante para explicar a letalidade do PDAC é o comportamento agressivo da doença, sendo frequente a disseminação metastática, responsável por 90% das mortes devido ao câncer e que tem, conseqüentemente, uma relação direta com um pior prognóstico (CHAFFER; WEINBERG, 2011). Interessantemente, através de modelagem matemática de dados radiológicos e patológicos, foi possível determinar que os pacientes portadores de PDAC já possuem células com capacidade metastática no momento do diagnóstico, mesmo quando o tumor primário ainda apresenta um pequeno volume (HAENO *et al.*, 2012). Além disso, um estudo com animais geneticamente modificados cujas células tumorais expressavam um marcador fluorescente mostrou que as células tumorais entram na corrente circulatória antes mesmo do aparecimento de tumores histologicamente detectáveis (RHIM *et al.*, 2012), corroborando a noção de que a disseminação metastática seja um evento precoce na evolução do PDAC.

As alterações moleculares e funcionais que conferem a capacidade de uma subpopulação das células presentes na massa tumoral de invadirem a circulação e migrarem para sítios distantes, 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) (PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014). Apesar da descoberta das CITs pancreáticas ter ocorrido em 2007, ainda não existe um consenso na literatura quanto a quais marcadores de superfície ou conjunto desses são mais eficientes ou ideais para o isolamento/detecção dessa subpopulação tumoral. Os dois primeiros grupos que detectaram essas células em PDAC, utilizaram dois modelos diferentes com análise de CITs oriundas diretamente de tumores propagados em camundongos, chegando a marcadores distintos: CD133+ (HERMANN *et al.*, 2007) e CD24+/CD44+/ESA+ (LI, C. *et al.*, 2007).

No entanto, outros relatos na literatura questionam a eficiência desses marcadores quando explorados em linhagens de PDAC propagadas *in vitro*. Por

exemplo, o estudo de JAISWAL et al. (2012) utilizou duas linhagens de PDAC em ensaios de inoculação subcutânea de 100 células com diferentes combinações para os marcadores CD24/CD44/ESA/SP, em camundongos atímicos (Balb/c *nude*). Eles encontraram a combinação CD24-/CD44-/ESA+/SP como a mais tumorigênica, sendo SP (*Side population*) células capazes de fazer o efluxo do corante fluorescente Hoechst 33342, resultando em um número total de tumores/inoculações de 31/62 (50%), superior quando comparado com a combinação CD24+/CD44+/ESA+, que apresentou 23/76 (30%).

Ainda no estudo de JAISWAL et al. (2012), o grupo avaliou a porcentagem de células positivas para os marcadores CD24/CD44/ESA/CD133 individualmente em cinco linhagens de tumores pancreáticos, sendo duas delas também avaliadas por nós (PANC-1 e BxPC-3). Assim como em nossos resultados, foi constatada uma grande variabilidade na expressão desses marcadores entre as diferentes linhagens. Entretanto, ao compararmos nossos resultados de porcentagem de células positivas para esses marcadores nas linhagens PANC-1 e BxPC-3, encontramos diferenças significativas. Por exemplo, enquanto quase todas as células (>90%) foram positivas para CD44 e ESA no estudo de JAISWAL *et al.*, nós identificamos apenas 52-64% e 54-61%, respectivamente. Além disso, eles não detectaram células CD133+ nessas duas linhagens, enquanto nós encontramos 22,5% (PANC-1) e 2,5% (BxPC-3). Alternativamente, outro estudo realizado por KURE et al. (2012) também avaliou os mesmos marcadores em linhagens de tumores pancreáticos, incluindo PANC-1 e Mia PaCa-2. Eles também chegaram a porcentagens de células positivas bastante diferentes das nossas em ambas as linhagens, principalmente em relação ao marcador ESA.

Essas divergências nos levam a acreditar que a expressão desses marcadores não é muito estável e pode ser influenciada por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, como possíveis variações nas condições de cultivo, grau de confluência celular, número de passagens, entre outros fatores que ao nosso entendimento dificultam a sua utilização na identificação de CITs em linhagens pancreáticas propagadas *in vitro* por muito tempo, tendo em vista que a linhagem PDX8, que possivelmente por ter menor tempo de cultivo, apresentou percentuais bem mais altos para todos os marcadores testados (**Fig. 19**). Além disso, embora estes marcadores de superfície já tenham sido utilizados para identificar populações



celulares enriquecidas em CITs em PDAC e outros tumores (ATASHZAR *et al.*, 2020; EUN; HAM; KIM, 2017; LI, X. *et al.*, 2015; WALCHER *et al.*, 2020), eles não estão consistentemente expressos em CITs de todos os tumores estudados, o que indica que subpopulações celulares com propriedades tronco-tumorais também podem ser heterogêneas quanto a expressão destes marcadores, o que parece ser o caso em PDAC. Isto é corroborado pelo fato de que outros marcadores vêm sendo reportados para CITs pancreáticas, como DLCK1, nestina, ALDH1, ABCG2 e CXCR4 (GZIL *et al.*, 2019). Esta heterogeneidade impediu a identificação de um ou alguns marcadores de superfície universais a serem utilizados para identificar CITs pancreáticas no nosso estudo e nos fez recorrer a estratégias alternativas para separar as CITs pancreáticas.

Uma das estratégias que resolvemos perseguir para identificar CITs pancreáticas envolveram uma abordagem funcional através da cultura de tumoresferas que sabidamente enriquece para células com propriedades tronco-tumorais (HERREROS-POMARES *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2019). Porém, como o enriquecimento obtido com esta estratégia não é muito alto, resolvemos também identificar células com uma alta atividade de fatores de transcrição que promovem pluripotência. Neste sentido, os fatores de transcrição OCT4 e SOX2 são apontados como funcionalmente atrelados às CITs, advindo do seu bem estabelecido papel na manutenção de pluripotência das células tronco normais e sua utilização na geração de células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês “*induced pluripotent stem cells*”) em conjunto aos demais fatores de Yamanaka (KLF-4 e c-MYC) (FATMA; SIDDIQUE, 2021; GZIL *et al.*, 2019; MOHAN *et al.*, 2021).

Comparado com outros genes de pluripotência, diferentes estudos tem demonstrado que OCT4 tem expressão universal em CITs de diversos tipos de câncer, como mama, hepático, próstata, melanoma, osteossarcoma, ovário, pulmão e pancreático (WEN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015; ZEINEDDINE *et al.*, 2014; ZHANG, Q. *et al.*, 2020), promovendo a capacidade de autorrenovação, aumento na resistência a quimioterápicos e maior fenótipo invasivo das células tumorais (BLISS *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2015). Similarmente, SOX2 também mostra expressão aumentada em diversos tipos de tumores (AL MAMUN *et al.*, 2020), incluindo o pancreático (HERREROS-VILLANUEVA, M. *et al.*, 2013), promovendo proliferação celular, quimiorresistência, sobrevivência celular e a transição epitélio-mesenquimal,

favorecendo, desta forma, o fenótipo metastático (AL MAMUN *et al.*, 2020; HERREROS-VILLANUEVA, M. *et al.*, 2013).

Reforçando ainda mais a importância desses marcadores de pluripotência no fenótipo tronco tumoral, CITs de linhagens de câncer de mama obtidas por diferentes modelos, incluindo cultura de tumoresfera, tiveram seus perfis de expressão analisados por RT-qPCR de células únicas, gerando a estratificação das CITs em três subgrupos: CITs quiescentes, progenitoras e progenitoras-*like* (AKRAP *et al.*, 2016; MOHAN *et al.*, 2021). Todas elas apresentaram a expressão dos genes de pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG, sendo a maior expressão nas CITs quiescentes e decrescendo conforme diferenciam-se nas progenitoras e depois em progenitoras-*like*, sendo que os marcadores de superfície associados a CITs, como CD44, tem o padrão inverso, passando a ser expressos em quantidade crescente na medida em que as CITs se diferenciam e aumentam sua capacidade proliferativa (AKRAP *et al.*, 2016; MOHAN *et al.*, 2021).

Por se tratarem de fatores de transcrição, diferentes sistemas de expressão de genes repórteres contendo na região promotora motivos de ligação para esses fatores foram desenvolvidos visando a investigação, rastreamento e purificação de CITs (ADACHI *et al.*, 2018; GERRARD *et al.*, 2005; IGLESIAS *et al.*, 2014; TANG, B. *et al.*, 2015). Dentre esses sistemas, optamos pelo SORE6-GFP capaz de avaliar a atividade transcricional de ambos, principalmente do SOX2 em complexo com OCT4, validado na identificação de CITs com maior potencial tumorigênico, metastático e quimiorresistente em câncer de mama (TANG, B. *et al.*, 2015), próstata (VADDI *et al.*, 2019) e gástrico (PÁDUA *et al.*, 2020). Modificando o sistema SORE6 para expressão do gene suicida da TK (timidina quinase) ao invés da GFP, VADDI *et al.* (2019) ainda foram capazes de mostrar em experimentos *in vivo*, com linhagens celulares de câncer de próstata, a importância de células com atividade transcricional de SOX2/OCT4 não só no início da tumorigênese, mas também na progressão de tumores já formados e na quimiorresistência dos mesmos, uma vez que a eliminação das células SORE6-TK+ pelo tratamento com ganciclovir levou a um bloqueio no desenvolvimento dos tumores em animais xenotransplantados e a um aumento na eficácia no tratamento com Docetaxel.

Para o câncer de pâncreas, o único relato na literatura com o sistema SORE6-GFP é o trabalho de SMIGIEL *et al.* (2017), que utilizou esse modelo apenas para mostrar um aumento de células GFP-positivas (CITs) numa linhagem de PDAC após o tratamento com oncostatina M, não avaliando funcionalmente ou diferencialmente as células positivas e negativas. Neste trabalho, apesar de ainda não termos realizado validação *in vivo* do potencial tumorigênico das com células tumorais pancreáticas SORE6-GFP-positivas (ensaio padrão ouro para CITs), nossos resultados *in vitro* mostram-se promissores na identificação e isolamento de CITs, visto que as células GFP-positivas foram capazes de formar maior número de tumoresferas e mostraram maior capacidade migratória em comparação às negativas. O uso das células SORE6-GFP também possibilitou contornarmos a utilização de grandes quantidades de anticorpos para os marcadores de superfície e assim levarmos para a separação celular um maior número de células totais, visto que CITs compreendem uma subpopulação minoritária.

Uma ampla gama de papéis é atribuída às CITs, incluindo a formação do tumor, recorrência tumoral, invasão e formação de metástases em diversos tipos de câncer humanos (ATASHZAR *et al.*, 2020; KUŞOĞLU; BIRAY AVCI, 2019). Dentre as várias vias imbricadas com essas propriedades, a via do NF- $\kappa$ B se destaca como uma das mais intensamente investigadas (KALTSCHMIDT, C. *et al.*, 2019; RINKENBAUGH; BALDWIN, 2016). O NF- $\kappa$ B possui diversos genes alvos envolvidos em diversas funções, incluindo genes que promovem a transição epitelial-mesenquimal (EMT), que tem um papel proeminente na regulação das células iniciadoras de tumores (KALTSCHMIDT, C. *et al.*, 2019; MIN *et al.*, 2008). Nesse contexto, o NF- $\kappa$ B tem papel chave no controle da transcrição de genes como SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2 e Twist, que reprimem o fenótipo epitelial e promovem fenótipo mesenquimal, estando diretamente ligados à invasão e à agressividade do câncer, além de correlacionarem-se com menor sobrevida dos pacientes (KALTSCHMIDT, C. *et al.*, 2019; MIN *et al.*, 2008). Como a principal via para a ativação do NF- $\kappa$ B (via canônica) depende da quinase IKK $\beta$  (BASSÈRES, D S; BALDWIN, 2006), nós hipotetizamos que a IKK $\beta$  seria importante para as características tronco-tumorais e metastáticas em PDAC. De fato, a própria IKK $\beta$  já foi implicada na plasticidade celular de diferentes cânceres (GÖKTUNA; DIAMANTI; CHAU, 2018), promovendo o fenótipo tronco-tumoral e metastático, por meio da transição epitélio-mesenquimal (EMT), em tumores, como mama (CHEN, C. *et*

*al.*, 2015; LIU, MANRAN *et al.*, 2010; MAGLIOZZI *et al.*, 2013), colorretal (SCHWITALLA; FINGERLE; *et al.*, 2013; SCHWITALLA; ZIEGLER; *et al.*, 2013) e pulmão (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Condizente com a nossa hipótese, os nossos resultados mostraram que a quinase IKK $\beta$  regula propriedades associadas ao processo metastático em PDAC, visto que sua inibição por RNA de interferência ou farmacológica reduziram significativamente a capacidade migratória e invasiva destas células. Apesar da participação da IKK $\beta$  na metástase de PDAC ainda ser pouco explorada na literatura, em linhagens de câncer de mama sua relevância no processo metastático já foi demonstrada por meio de experimentos independentes em camundongos, com inoculação ortotópica das células tumorais e nos quais a administração oral de dois inibidores distintos desta quinase (BI-5700 e IMD-0354) resultaram em expressivas reduções de metástases pulmonares (CHEN, C. *et al.*, 2015; HUBER *et al.*, 2010). Complementarmente, a IKK $\beta$  mostra-se importante na EMT de células tumorais de mama, nas quais a superexpressão de IKK $\beta$  gera a redução de E-caderina (marcador epitelial), aumento de Vimentina (marcador mesenquimal) e alteração morfológica mesenquimal (fusiforme) em ensaios *in vitro*, mesmo na ausência de indução por TGF- $\beta$ , sendo o efeito aumentado na presença desse indutor de EMT (HUBER *et al.*, 2004), assim como a inibição farmacológica de IKK $\beta$  é capaz de inibir/atenuar a EMT *in vitro* e *in vivo*, observando-se em ambos o aumento de marcação para E-caderina e redução de fibronectina (outro marcador mesenquimal) em comparação aos controles não tratados (HUBER *et al.*, 2010). Similarmente, nós observamos que o silenciamento da expressão da IKK $\beta$  por interferência de RNA em PDAC, também causou um aumento na expressão do marcador epitelial E-caderina e uma redução na expressão dos marcadores mesenquimais Snail e N-caderina, enfatizando a importância da via IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B no EMT e fenótipo invasivo. Entretanto, nestas mesmas análises observamos um aumento na expressão de Vimentina e Slug, que também são marcadores mesenquimais, indicando a possibilidade de que a IKK $\beta$  possa ter um efeito parcial sobre a EMT em PDAC, talvez iniciando o processo, sendo necessário outros fatores para que a transição se complete.

Além dos efeitos sobre o fenótipo migratório e EMT, observamos também que a inibição de IKK $\beta$  por interferência de RNA afetou propriedades funcionais de CITs,

levando à diminuição na formação de tumoresferas *in vitro*, característica que está correlacionada com a capacidade tumorigênica (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Interessantemente, CHEN *et al.* (2015) mostraram que a inibição farmacológica de IKK $\beta$  com IMD-0354, além de diminuir a capacidade metastática de células tumorais de mama, também reduziu a capacidade de formação de tumoresferas, de células positivas para o marcador ALDH e da expressão dos genes de células tronco SOX2, OCT4 e NANOG. Comparativamente, nosso grupo mostrou resultados semelhantes em linhagens de adenocarcinoma pulmonar com a inibição de IKK $\beta$ , por siRNA e farmacológica (Composto A), também resultando na redução de formação de tumoresferas e na expressão dos mesmos genes de células tronco (RODRIGUES *et al.*, 2020). Apesar das observações desses estudos anteriores, não observamos o mesmo efeito com a inibição farmacológica de IKK $\beta$  (Composto A) nas linhagens de PDAC, a qual não gerou alterações no número de tumoresferas formadas e nem mesmo alterou o percentual de células GFP positivas no modelo SORE6-GFP com a célula AsPC-1.

Já quanto as discrepâncias observadas entre o silenciamento da expressão da IKK $\beta$  por interferência de RNA (mais efetivo) e a sua inibição farmacológica nos nossos resultados, não encontramos dados na literatura que corroborem ou possam explicar, mas, ao nosso ver, estas discrepâncias podem ser explicadas por duas hipóteses possíveis e não excludentes: 1) Os inibidores utilizados, apesar de seletivos para IKK $\beta$ , são do tipo ATP-competitivos, permitindo ainda atividades residuais da quinase ao longo dos ensaios, visto que ainda detectamos fosfo-P65 no tratamento com TPCA-1 e fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  nas amostras tratadas com o Composto A; 2) A inibição farmacológica de IKK $\beta$  não deve comprometer formação do complexo IKK, o qual apesar de funcionalmente comprometido pela inibição da sua principal unidade catalítica (IKK $\beta$ ) ainda seria capaz de desempenhar parcialmente suas ações por meio da atividade catalítica da IKK $\alpha$ , o que pode não acontecer no *knockdown* de IKK $\beta$ , sem o qual não haveria a estruturação do complexo IKK. Neste sentido, não podemos excluir a possibilidade de que o efeito da IKK $\beta$  sobre as propriedades tronco-tumorais possa ser independente da sua atividade de quinase, levantando a possibilidade de que novas estratégias, além da inibição farmacológica da atividade de quinase, tenham que ser desenvolvidas ao se explorar a IKK $\beta$  como alvo terapêutico anti-metastático.

### 13. CONCLUSÕES

1. O modelo SORE6-GFP é um modelo promissor para seleção/identificação de CITs pancreáticas, já que as células GFP-positivas apresentam expressão aumentada dos fatores de pluripotência OCT4 e NANOG e possuem uma maior capacidade de formar tumoresferas e maior capacidade migratória em relação às células GFP-negativas;
2. Embora a inibição farmacológica de IKK $\beta$  tenha afetado a expressão de NANOG, ela foi ineficaz de interferir no fenótipo das CITs, sem alterar a formação de tumoresferas ou alterando transitoriamente a população SORE6-GFP-positiva, indicando uma baixa seletividade pelas CITs.
3. Por outro lado, a inibição da expressão de IKK $\beta$  por interferência de RNA reduziu significativamente a formação de tumoresferas, corroborando a importância da IKK $\beta$  para a biologia das CITs pancreáticas, mesmo que independentemente da sua atividade de quinase.
4. Tanto a inibição farmacológica com TPCA-1, quanto a inibição da expressão de IKK $\beta$  por interferência de RNA foram capazes de reduzir a capacidade migratória de células de PDAC, sendo que a inibição por interferência de RNA reduziu também a capacidade invasiva. Estas alterações funcionais foram acompanhadas por alterações de expressão gênica sugestivas de uma diminuição no programa de transição epitelial-mesenquimal.
5. Em conjunto estes resultados apoiam a nossa hipótese de que a IKK $\beta$  promove o fenótipo tronco-tumoral e metastático e sugere que esta quinase seja um bom alvo terapêutico anti-metastático a ser explorado em PDAC através de estratégias que, não só inibam a atividade catalítica desta quinase, mas também que reduzam a sua abundância celular.

## 14. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, L. N.; CHOW, E. K.-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine*, v. 2, n. 1, p. 3, jan. 2013.
- ADACHI, K. *et al.* Esrrb Unlocks Silenced Enhancers for Reprogramming to Naive Pluripotency. *Cell stem cell*, v. 23, n. 2, p. 266-275.e6, 2 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29910149/>>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- AILLES, L.; PRINCE, M. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [S.l.: s.n.], 2009. v. 568. p. 175–193.
- AKRAP, N. *et al.* Identification of Distinct Breast Cancer Stem Cell Populations Based on Single-Cell Analyses of Functionally Enriched Stem and Progenitor Pools. *Stem Cell Reports*, v. 6, n. 1, p. 121–136, 12 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S2213671115003719/fulltext>>. Acesso em: 6 ago. 2023.
- AL-HAJJ, M. *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 1 abr. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12629218/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.
- AL MAMUN, M. *et al.* SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 2, p. 85–98, 20 fev. 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjy080>>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- ALTOMARE, D. A. *et al.* Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *Journal of cellular biochemistry*, v. 87, n. 4, p. 470–476, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14735903/>>. Acesso em: 7 abr. 2023.
- AOKI, M. N. *Identificação de micrornas diferencialmente expressos em células pulmonares e pancreáticas transformadas pelo oncogene KRAS*. 2014. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-30092014-133228/>>. Acesso em: 11 mar. 2023.
- ATASHZAR, M. R. *et al.* Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *Journal of cellular physiology*, v. 235, n. 2, p. 790–803, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31286518/>>. Acesso em: 8 ago. 2023.
- BALDWIN, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, v. 14, p. 649–681, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8717528/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281–297, 23 jan. 2004.
- BASSÈRES, D S. *et al.* IKK is a therapeutic target in KRAS-induced lung cancer with disrupted p53 activity. *Genes and Cancer*, v. 5, n. 1–2, p. 41–55, abr. 2015.
- BASSÈRES, D S; BALDWIN, A. S. Nuclear factor-κB and inhibitor of κB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, v. 25, n. 51, p. 6817–6830, out. 2006.
- BASSÈRES, DANIELA S *et al.* Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer research*, v. 70, n. 9, p. 3537–46, maio 2010.
- BLISS, S. A. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Research*, v. 76, n. 19, p. 5832–5844, 1 out. 2016.

Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1092>>. Acesso em: 7 ago. 2023.

BOYD, L. N. C. *et al.* Diagnostic accuracy and added value of blood-based protein biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis of aggregate and individual participant data. *eClinicalMedicine*, v. 55, 1 jan. 2023. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S258953702200476X/fulltext>>. Acesso em: 7 abr. 2023.

BRYANT, K. L. *et al.* KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in biochemical sciences*, v. 39, n. 2, p. 91–100, fev. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24388967/>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

CABRERA, M. C.; HOLLINGSWORTH, R. E.; HURT, E. M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World Journal of Stem Cells*, v. 7, n. 1, p. 27, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26300934/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

CARNEIRO-LOBO, T. C. *et al.* IKK $\beta$  targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: A potential anti-angiogenic therapeutic target. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, v. 130, p. 169–178, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30885340/>>. Acesso em: 6 abr. 2023.

CELIÀ-TERRASSA, T.; JOLLY, M. K. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 10, n. 7, p. a036905, 1 jul. 2020. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/10/7/a036905.full>>. Acesso em: 2 ago. 2023.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 25 mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21436443/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

CHEN, C. *et al.* IKK $\beta$  Enforces a LIN28B/TCF7L2 Positive Feedback Loop That Promotes Cancer Cell Stemness and Metastasis. *Cancer research*, v. 75, n. 8, p. 1725–1735, 15 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25744721/>>. Acesso em: 23 ago. 2023.

CHEN, M.; LIN, M.; WANG, X. Overexpression of miR-19a inhibits colorectal cancer angiogenesis by suppressing KRAS expression. *Oncology reports*, v. 39, n. 2, p. 619–626, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29207158/>>. Acesso em: 20 dez. 2022.

CHOI, Y. W. *et al.* MicroRNA Expression Signatures Associated With BRAF-Mutated Versus KRAS-Mutated Colorectal Cancers. *Medicine*, v. 95, n. 15, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26839821/>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

CHOW, J. Y. C. *et al.* RAS/ERK modulates TGF $\beta$ -regulated PTEN expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, v. 28, n. 11, p. 2321–2327, 2007.

CHU, N. J. *et al.* Inhibition of miR-21 Regulates Mutant KRAS Effector Pathways and Intercepts Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Development. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 13, n. 7, p. 569–582, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32409593/>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

CORRENTI, M. *et al.* The Emerging Role of Tumor Microenvironmental Stimuli in Regulating Metabolic Rewiring of Liver Cancer Stem Cells. *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 5, v. 15, n. 1, p. 5, 20 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/15/1/5/htm>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

COX, A. D. *et al.* Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery* 2014 13:11, v. 13, n. 11, p. 828–851, 17 out. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd4389>>. Acesso em: 9 abr. 2023.



DIDONATO, J. A. *et al.* A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, v. 388, n. 6642, p. 548–554, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9252186/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

DU RIEU, M. C. *et al.* MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clinical chemistry*, v. 56, n. 4, p. 603–612, 1 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20093556/>>. Acesso em: 9 nov. 2022.

DURAN, A. *et al.* The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- $\kappa$ B Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell*, v. 13, n. 4, p. 343–354, abr. 2008.

ESER, S. *et al.* Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer cell*, v. 23, n. 3, p. 406–420, 18 mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23453624/>>. Acesso em: 7 abr. 2023.

EUN, K.; HAM, S. W.; KIM, H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB reports*, v. 50, n. 3, p. 117–125, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27998397/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

FATMA, H.; SIDDIQUE, H. R. Pluripotency inducing Yamanaka factors: role in stemness and chemoresistance of liver cancer. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1915137>, v. 21, n. 8, p. 853–864, 2021. Disponível em: <<https://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/14737140.2021.1915137>>. Acesso em: 7 ago. 2023.

FOX, R. G. *et al.* Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma. *Nature*, v. 534, n. 7607, p. 407–411, 6 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27281208/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

FRELIN, C. *et al.* Targeting NF- $\kappa$ B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood*, v. 105, n. 2, p. 804–811, jan. 2005.

GASPARINI, P. *et al.* MicroRNA classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK-, EGFR-, and KRAS-driven lung cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 48, p. 14924–14929, 1 dez. 2015. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1520329112>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

GAVIRAGHI, M. *et al.* Pancreatic cancer spheres are more than just aggregates of stem marker-positive cells. *Bioscience Reports*, v. 31, n. 1, p. 45–55, 1 fev. 2011. Disponível em: <<https://www.bioscience-reports.com/article/31/1/45/55926/Pancreatic-cancer-spheres-are-more-than-just>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

GAY, L.; MALANCHI, I. The sleeping ugly: Tumour microenvironment's act to make or break the spell of dormancy. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, v. 1868, n. 1, p. 231–238, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28501561/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

GEORGAKOPOULOS-SOARES, I. *et al.* EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 524949, 7 abr. 2020.

GERDES, M. J. *et al.* Emerging Understanding of Multiscale Tumor Heterogeneity. *Frontiers in Oncology*, v. 4, n. DEC, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2014.00176>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

GERRARD, L. *et al.* Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, v. 23, n. 1, p. 124–133, jan. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15625129/>>. Acesso em: 7 ago. 2023.

GLUMAC, P. M.; LEBEAU, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clinical and*

*Translational Medicine*, v. 7, n. 1, p. 18, dez. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6035906/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

GÖKTUNA, S. I.; DIAMANTI, M. A.; CHAU, T. L. IKKs and tumor cell plasticity. *The FEBS Journal*, v. 285, n. 12, p. 2161–2181, 1 jun. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.14444>. Acesso em: 23 ago. 2023.

GOMES FILHO, S. M. *Identificação de alvos da KRAS oncogênica com potencial terapêutico para câncer de pâncreas*. 2019. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-26042022-080615/>. Acesso em: 10 mar. 2023.

GRETEN, F. R. *et al.* IKK $\beta$  Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell*, v. 118, n. 3, p. 285–296, ago. 2004.

GU, G. *et al.* Prostate Cancer Cells with Stem Cell Characteristics Reconstitute the Original Human Tumor In vivo. *Cancer Research*, v. 67, n. 10, p. 4807–4815, maio 2007.

GUERRA, C. *et al.* Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, v. 11, n. 3, p. 291–302, mar. 2007.

GUO, F. *et al.* CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*, v. 35, n. 7, p. 816–826, 18 fev. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25961926/>. Acesso em: 6 abr. 2023.

GZIL, A. *et al.* Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *Molecular Biology Reports* 2019 46:6, v. 46, n. 6, p. 6629–6645, 5 set. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-019-05058-1>. Acesso em: 19 mar. 2023.

HAENO, H. *et al.* Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell*, v. 148, n. 1–2, p. 362–375, 20 jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22265421/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

HARDAVELLA, G.; GEORGE, R.; SETHI, T. Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype. *Translational lung cancer research*, v. 5, n. 3, p. 272–9, jun. 2016.

HATLEY, M. E. *et al.* Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell*, v. 18, n. 3, p. 282–293, 14 set. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610810003107>. Acesso em: 10 nov. 2022.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* 2004 5:7, v. 5, n. 7, p. 522–531, jul. 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg1379>. Acesso em: 10 nov. 2022.

HEERBOTH, S. *et al.* EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, v. 4, n. 1, dez. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4385028/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

HERMANN, P. C. *et al.* Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*, v. 1, n. 3, p. 313–323, set. 2007.

HERREROS-POMARES, A. *et al.* Lung tumorspheres reveal cancer stem cell-like properties and a score with prognostic impact in resected non-small-cell lung cancer. *Cell Death & Disease* 2019 10:9, v. 10, n. 9, p. 1–14, 10 set. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1898-1>. Acesso em: 18 ago. 2023.

HERREROS-VILLANUEVA, M. *et al.* SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 2013 2:8, v. 2, n. 8, p. e61–e61, 5 ago. 2013. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/oncsis201323>>. Acesso em: 7 ago. 2023.

HERREROS-VILLANUEVA, MARTA *et al.* Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 9, p. 2247, mar. 2014.

HETTINGER, K. *et al.* c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death & Differentiation* 2007 14:2, v. 14, n. 2, p. 218–229, 5 maio 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/4401946>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

HIDESHIMA, T. *et al.* MLN120B, a Novel I B Kinase Inhibitor, Blocks Multiple Myeloma Cell Growth In vitro and In vivo. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 19, p. 5887–5894, out. 2006.

HILL, R. *et al.* PTEN loss accelerates KrasG12D-induced pancreatic cancer development. *Cancer Research*, v. 70, n. 18, p. 7114–7124, 15 set. 2010. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerres/article/70/18/7114/559646/PTEN-Loss-Accelerates-KrasG12D-Induced-Pancreatic>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. *The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer*. *Molecular Cancer*. [S.l.]: BioMed Central. Disponível em: <<https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-12-86>>. Acesso em: 27 mar. 2023. , 2 ago. 2013

HOTTA, A. *et al.* Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nature methods*, v. 6, n. 5, p. 370–376, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19404254/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

HUBER, M. A. *et al.* BI 5700, a Selective Chemical Inhibitor of I $\kappa$ B Kinase 2, Specifically Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Mouse Models of Tumor Progression. *Genes & Cancer*, v. 1, n. 2, p. 101, 2010. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3092186/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20091111/)>. Acesso em: 27 ago. 2023.

HUBER, M. A. *et al.* NF- $\kappa$ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, v. 114, n. 4, p. 569–581, ago. 2004.

IGLESIAS, J. M. *et al.* The Activation of the Sox2 RR2 Pluripotency Transcriptional Reporter in Human Breast Cancer Cell Lines is Dynamic and Labels Cells with Higher Tumorigenic Potential. *Frontiers in oncology*, v. 4, n. NOV, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25414831/>>. Acesso em: 7 ago. 2023.

INCA. Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer. [s. d.]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acessado em: 29 Fev. 2023.

ISRAËL, A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- $\kappa$ B Activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 3, 2010. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2829958/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20091111/)>. Acesso em: 27 mar. 2023.

JAGGUPILLI, A.; ELKORD, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: An enduring ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, 2012.

JAISWAL, K. R. *et al.* Comparative testing of various pancreatic cancer stem cells results in a novel class of pancreatic-cancer-initiating cells. *Stem cell research*, v. 9, n. 3, p. 249–260, nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22963768/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

JIAO, L. R. *et al.* MicroRNAs Targeting Oncogenes Are Down-Regulated in Pancreatic Malignant Transformation from Benign Tumors. *PLOS ONE*, v. 7, n. 2, p. e32068, 22 fev. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032068>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

JOHNSON, S. M. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, v. 120, n. 5, p. 635–647, 11 mar. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15766527/>>. Acesso em: 13 mar. 2023.

KALTSCHMIDT, B.; *et al.* Targeting NF- $\kappa$ B Signaling in Cancer Stem Cells: A Narrative Review. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 261, v. 10, n. 2, p. 261, 25 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9059/10/2/261/htm>>. Acesso em: 2 ago. 2023.

KALTSCHMIDT, C. *et al.* A Role for NF- $\kappa$ B in Organ Specific Cancer and Cancer Stem Cells. *Cancers*, v. 11, n. 5, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31083587/>>. Acesso em: 8 ago. 2023.

KENDELLEN, M. F. *et al.* Canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. *Oncogene*, v. 33, n. 10, p. 1297–1305, mar. 2014.

KENNEDY, A. L. *et al.* Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Molecular cell*, v. 42, n. 1, p. 36–49, 8 abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474066/>>. Acesso em: 7 abr. 2023.

KENT, O. A. *et al.* Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes & Development*, v. 24, n. 24, p. 2754–2759, 15 dez. 2010. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/24/24/2754.full>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

KIM, H. *et al.* MicroRNA expression profiles and clinicopathological implications in lung adenocarcinoma according to EGFR, KRAS, and ALK status. *Oncotarget*, v. 8, n. 5, p. 8484–8498, 31 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28035073/>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

KIM, H. J. *et al.* Oncogenic KRAS: Signaling and Drug Resistance. *Cancers*, v. 13, n. 22, 1 nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39861616/>>. Acesso em: 7 abr. 2023.

KIM, M.; SLACK, F. J. MicroRNA-mediated regulation of KRAS in cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, v. 7, n. 1, p. 1–4, 30 nov. 2014. Disponível em: <<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-014-0084-2>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

KISE, K.; KINUGASA-KATAYAMA, Y.; TAKAKURA, N. Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 99, n. Pt B, p. 197–205, abr. 2016.

KLEEFF, J. *et al.* Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 2016 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–22, 21 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrdp201622>>. Acesso em: 10 mar. 2023.

KLEFFEL, S.; SCHATTON, T. Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin? *Advances in experimental medicine and biology*, v. 734, p. 145–179, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23143979/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*, v. 14, n. 3, p. 275–291, 6 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24607403/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

KUMAR, M. *et al.* NF- $\kappa$ B Regulates Mesenchymal Transition for the Induction of Non-Small Cell Lung Cancer Initiating Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. e68597, jul. 2013.

KURE, S. *et al.* Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas. *International journal of oncology*, v. 41, n. 4, p. 1314–1324, out. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22824809/>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

KUŞOĞLU, A.; BIRAY AVCI, Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*, v. 681, p. 80–85, 10 jan. 2019.

LANGSCH, S. *et al.* miR-29b Mediates NF- $\kappa$ B Signaling in KRAS-Induced Non-Small Cell Lung Cancers. *Cancer research*, v. 76, n. 14, p. 4160–4169, 15 jul. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199349/>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

LAPIDOT, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, v. 367, n. 6464, p. 645–648, fev. 1994.

LEE, C. H. *et al.* Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget*, v. 7, n. 2, p. 1215, 1 jan. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC4811455/>. Acesso em: 18 ago. 2023.

LEVINGS, P. P. *et al.* Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Research*, v. 69, n. 14, p. 5648–5655, 15 jul. 2009. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3580>. Acesso em: 31 jul. 2023.

LI, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*, v. 67, n. 3, p. 1030–1037, 1 fev. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17283135/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

LI, C.; LEE, C. J.; SIMEONE, D. M. Identification of Human Pancreatic Cancer Stem Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [S.l.: s.n.], 2009. v. 568. p. 161–173.

LI, X. *et al.* Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 8, n. 10, p. 12084, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4680338/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

LI, Z. W. *et al.* The IKK $\beta$  subunit of I $\kappa$ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor I $\kappa$ B activation and prevention of apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, v. 189, n. 11, p. 1839–45, jun. 1999.

LING, J. *et al.* KrasG12D-induced IKK2/ $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation by IL-1 $\alpha$  and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, v. 21, n. 1, p. 105–20, jan. 2012.

LING, L.; CAO, Z.; GOEDDEL, D. V. NF- $\kappa$ B-inducing kinase activates IKK- $\alpha$  by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 7, p. 3792–3797, 31 mar. 1998. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.95.7.3792>. Acesso em: 27 mar. 2023.

LIU, F. *et al.* IKK Biology. *Immunological Reviews*, v. 246, n. 1, p. 239, mar. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3311052/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

LIU, M. *et al.* The Canonical NF- $\kappa$ B Pathway Governs Mammary Tumorigenesis in Transgenic Mice and Tumor Stem Cell Expansion. *Cancer Research*, v. 70, n. 24, p. 10464–10473, dez. 2010.

LIU, MANRAN *et al.* The canonical NF- $\kappa$ B pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer research*, v. 70, n. 24, p. 10464, 12 dez. 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC3010731/>. Acesso em: 23 ago. 2023.

LIU, T. *et al.* NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–9, 14 jul. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201723>. Acesso em: 27 mar. 2023.

LUNDBERG, I. V. *et al.* MicroRNA Expression in KRAS- and BRAF-mutated Colorectal Cancers. *Anticancer research*, v. 38, n. 2, p. 677–683, 1 fev. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29374690/>. Acesso em: 9 abr. 2023.

LYTLE, N. K. *et al.* A Multiscale Map of the Stem Cell State in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cell*, v. 177, n. 3, p. 572–586.e22, 18 abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30955884/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

MA, X. L. *et al.* Sphere-forming culture enriches liver cancer stem cells and reveals Stearoyl-CoA desaturase 1 as a potential therapeutic target. *BMC Cancer*, v. 19, n. 1, p. 1–12, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5963-z>>. Acesso em: 18 ago. 2023.

MAGLIOZZI, R. *et al.* Control of epithelial cell migration and invasion by the IKK $\beta$ - and CK1 $\alpha$ -mediated degradation of RAPGEF2. *Developmental cell*, v. 27, n. 5, p. 574–585, 9 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290981/>>. Acesso em: 23 ago. 2023.

MALANCHI, I. *et al.* Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, v. 481, n. 7379, p. 85–91, 5 jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22158103/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

MARJANOVIC, N. D.; WEINBERG, R. A.; CHAFFER, C. L. Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. *Clinical Chemistry*, v. 59, n. 1, p. 168–179, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/clinchem/article/59/1/168/5622136>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

MICHOR, F.; POLYAK, K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prevention Research*, v. 3, n. 11, p. 1361–1364, 1 nov. 2010. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/3/11/1361/48620/The-Origins-and-Implications-of-Intratumor>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

MIN, C. *et al.* NF- $\kappa$ B and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 104, n. 3, p. 733–744, jun. 2008.

MITTAL, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual review of pathology*, v. 13, p. 395–412, 24 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29414248/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

MOHAN, A. *et al.* Markers and Reporters to Reveal the Hierarchy in Heterogeneous Cancer Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 668851, 3 jun. 2021. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC8209516/>>. Acesso em: 29 jul. 2023.

MORAES, L. B. DA C. E A. DE. *Desenvolvimento de xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos para varredura genética de alvos moleculares com potencial terapêutico*. 2018. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-07052019-110949/>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

MORRIS, J. P.; WANG, S. C.; HEBROK, M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 10, p. 683–695, out. 2010.

MOSAKHANI, N. *et al.* MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes, chromosomes & cancer*, v. 51, n. 1, p. 1–9, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21922590/>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

NAPOLEON, J. V. *et al.* Small-molecule IKK $\beta$  activation modulator (IKAM) targets MAP3K1 and inhibits pancreatic tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 119, n. 18, p. e2115071119, 3 maio 2022. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2115071119>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

NEVALA-PLAGEMANN, C.; HIDALGO, M.; GARRIDO-LAGUNA, I. From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, v. 17, n. 2, p. 108–123, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31705130/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

NG, S. *et al.* Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clinical cancer research : an*

*official journal of the American Association for Cancer Research*, 2001.

O'NEILL, R. S.; STOITA, A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World Journal of Gastroenterology*, v. 27, n. 26, p. 4045, 7 jul. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8311531/>. Acesso em: 7 abr. 2023.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NFκB Family of Transcription Factors and Its Regulation. 2009.

OHARA, Y. *et al.* Histological and prognostic importance of CD44+/CD24+/EpCAM+ expression in clinical pancreatic cancer. *Cancer Science*, v. 104, n. 8, p. 1127, ago. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC7657217/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

OKAMI K, WU L, RIGGINS G, CAIRNS P, GOGGINS M, EVRON E, HALACHMI N, AHRENDT SA, REED AL, HILGERS W, KERN SE, KOCH WM, SIDRANSKY D, J. J. Infrequent genetic alterations of the PTEN/MMAC1 gene in Japanese patients with primary cancers of the breast, lung, pancreas, kidney, and ovary. *Japanese journal of cancer research: Gann*, v. 88, n. 11, p. 1025–1028, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9439675/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

OKAMI, K. *et al.* Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer research*, v. 58, n. 3, p. 509–511, 1 fev. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9458098/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

OTA, T. *et al.* KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer research*, 2012.

PÁDUA, D. *et al.* A SOX2 Reporter System Identifies Gastric Cancer Stem-Like Cells Sensitive to Monensin. *Cancers*, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7072720/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

PARIKH, K. *et al.* Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review. *Journal of Hematology & Oncology 2022* 15:1, v. 15, n. 1, p. 1–22, 25 out. 2022. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01375-4>. Acesso em: 7 abr. 2023.

PARK, W.; CHAWLA, A.; O'REILLY, E. M. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, v. 326, n. 9, p. 851–862, 7 set. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34547082/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

PATEL, S. A. *et al.* Delineation of breast cancer cell hierarchy identifies the subset responsible for dormancy. *Scientific reports*, v. 2, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23205268/>. Acesso em: 7 ago. 2023.

PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nature reviews. Drug discovery*, v. 13, n. 7, p. 497–512, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24981363/>. Acesso em: 8 ago. 2023.

PISCO, A. O.; HUANG, S. Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: 'What does not kill me strengthens me'. *British Journal of Cancer* 2015 112:11, v. 112, n. 11, p. 1725–1732, 12 maio 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc2015146>. Acesso em: 27 mar. 2023.

POUR, P. M.; PANDEY, K. K.; BATRA, S. K. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Molecular Cancer*, v. 2, p. 13, 22 jan. 2003. Disponível em: </pmc/articles/PMC151686/>. Acesso em: 10 mar. 2023.

PRINCIPE, D. R. *et al.* The Current Treatment Paradigm for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Barriers to Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 2773, 15 jul. 2021.

QUARESMA, M.; COLEMAN, M. P.; RACHET, B. 40-year trends in an index of survival for all cancers

combined and survival adjusted for age and sex for each cancer in England and Wales, 1971-2011: a population-based study. *Lancet (London, England)*, v. 385, n. 9974, p. 1206–1218, 28 mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25479696/>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

QUATTROCHI, B. *et al.* MicroRNAs of the mir-17~92 cluster regulate multiple aspects of pancreatic tumor development and progression. v. 8, n. 22, p. 35902–35918, 2017. Disponível em: <[www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)>. Acesso em: 10 nov. 2022.

RACHAGANI, S. *et al.* Clinical implications of miRNAs in the pathogenesis, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *Advanced drug delivery reviews*, v. 81, p. 16–33, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25453266/>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

RAGUSA, M. *et al.* Specific alterations of microRNA transcriptome and global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment. *Molecular cancer therapeutics*, v. 9, n. 12, p. 3396–3409, dez. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20881268/>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

RAHIB, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Research*, v. 74, n. 11, p. 2913–2921, 1 jun. 2014. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerres/article/74/11/2913/592763/Projecting-Cancer-Incidence-and-Deaths-to-2030-The>>. Acesso em: 3 nov. 2022.

REN, X. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals invasive trajectory and determines cancer stem cell-related prognostic genes in pancreatic cancer. *Bioengineered*, v. 12, n. 1, p. 5056–5068, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34474642/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

REYA, T. *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature 2001 414:6859*, v. 414, n. 6859, p. 105–111, 1 nov. 2001. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35102167>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

RHIM, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, v. 148, n. 1–2, p. 349–361, 20 jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22265420/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

RICH, J. N. Cancer stem cells: Understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (United States)*, v. 95, n. 1, p. S2–S7, 2016. Disponível em: <[https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2016/09081/Cancer\\_stem\\_cells\\_\\_understanding\\_tumor\\_hierarchy.3.aspx](https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2016/09081/Cancer_stem_cells__understanding_tumor_hierarchy.3.aspx)>. Acesso em: 27 mar. 2023.

RINKENBAUGH, A. L.; BALDWIN, A. S. The NF- $\kappa$ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells*, v. 5, n. 2, abr. 2016.

RODRIGUES, F. S. *Explorando a quinase IKK como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene KRAS*. 2018. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-26112018-080111/>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

RODRIGUES, F. S. *et al.* IKK $\beta$  Kinase Promotes Stemness, Migration, and Invasion in KRAS-Driven Lung Adenocarcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 16, p. 1–19, 2 ago. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7460870/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/327460870/)>. Acesso em: 19 abr. 2023.

RODRIGUEZ-TORRES, M.; ALLAN, A. L. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors. *Clinical & experimental metastasis*, v. 33, n. 1, p. 97–113, jan. 2016.

RONCARATI, R. *et al.* The importance of microRNAs in RAS oncogenic activation in human cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 9, n. SEP, p. 988, 1 set. 2019.

RUGGERI, B. A. *et al.* Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human



pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, v. 21, n. 2, p. 81–86, 1 fev. 1998. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/MED/9496907>>. Acesso em: 7 abr. 2023.

SANCHO, P. *et al.* MYC/PGC-1 $\alpha$  Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell metabolism*, v. 22, n. 4, p. 590–605, 6 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26365176/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SANTOS, M. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023–2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, p. 213700, 6 fev. 2023. Disponível em: <<https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>>. Acesso em: 10 mar. 2023.

SASAKI, N. *et al.* Fetal bovine serum enlarges the size of human pancreatic cancer spheres accompanied by an increase in the expression of cancer stem cell markers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 514, n. 1, p. 112–117, 18 jun. 2019.

SATO, S. *et al.* Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, v. 6, n. 11, p. 1087–1095, nov. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16186825/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

SCALABRINI, L. C. *Explorando a quinase aurora A como alvo terapêutico em células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas por KRAS*. 2022. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-02122022-155942/>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

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 biology*, v. 13, n. 10, p. 251, 22 out. 2012. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-10-251>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SCHWITALLA, S.; FINGERLE, A. A.; *et al.* Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, v. 152, n. 1–2, p. 25–38, 7 jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23273993/>>. Acesso em: 23 ago. 2023.

SCHWITALLA, S.; ZIEGLER, P. K.; *et al.* Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. *Cancer cell*, v. 23, n. 1, p. 93–106, 14 jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23273920/>>. Acesso em: 23 ago. 2023.

SHI, L. *et al.* KRAS induces lung tumorigenesis through microRNAs modulation. *Cell Death & Disease* 2018 9:2, v. 9, n. 2, p. 1–15, 13 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41419-017-0243-9>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews. Clinical oncology*, v. 14, n. 10, p. 611–629, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397828/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 1, p. 7–33, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21654>>. Acesso em: 3 nov. 2022.

SINGH, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, v. 63, n. 18, p. 5821–8, set. 2003.

SKOULIDIS, F. *et al.* Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*, v. 384, n. 25, p. 2371–2381, 24 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2103695>>. Acesso em: 3 nov. 2022.

SMIGIEL, J. M.; PARAMESWARAN, N.; JACKSON, M. W. Potent EMT and CSC Phenotypes are Induced by Oncostatin-M in Pancreatic Cancer. *Molecular cancer research: MCR*, v. 15, n. 4, p. 478, 1 abr. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5380554/>. Acesso em: 6 ago. 2023.

SONG, L. *et al.* TGF- $\beta$  induces miR-182 to sustain NF- $\kappa$ B activation in glioma subsets. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 10, p. 3563–78, out. 2012.

SONG, M. *et al.* miR-19b-3p promotes human pancreatic cancer Capan-2 cells proliferation by targeting phosphatase and tension homolog. *Annals of Translational Medicine*, v. 7, n. 11, p. 236–236, jun. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6603353/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012 13:5, v. 13, n. 5, p. 283–296, 4 abr. 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3330>. Acesso em: 10 nov. 2022.

STEINBICHLER, T. B. *et al.* Cancer stem cells and their unique role in metastatic spread. *Seminars in Cancer Biology*, v. 60, p. 148–156, 1 fev. 2020.

STEPHEN, A. G. *et al.* Dragging ras back in the ring. *Cancer cell*, v. 25, n. 3, p. 272–281, 17 mar. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651010/>. Acesso em: 9 abr. 2023.

SUI, Y. *et al.* IKK $\beta$  is a  $\beta$ -catenin kinase that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *JCI insight*, v. 3, n. 2, 25 jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29367460/>. Acesso em: 2 ago. 2023.

SUN, S. C. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell research*, v. 21, n. 1, p. 71–85, jan. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21173796/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 1 maio 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 9 abr. 2023.

TAKIKAWA, T. *et al.* Clinical features and prognostic impact of asymptomatic pancreatic cancer. *Scientific Reports* 2022 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–11, 11 mar. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-08083-6>. Acesso em: 10 mar. 2023.

TANG, B. *et al.* Stem Cell Reports Resource A Flexible Reporter System for Direct Observation and Isolation of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Reports*, v. 4, p. 155–169, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.11.002ThisisanopenaccessarticleundertheCCBYlicense>. Acesso em: 5 abr. 2023.

TANG, D. G. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell research*, v. 22, n. 3, p. 457–472, mar. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357481/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology* 2018 18:5, v. 18, n. 5, p. 309–324, 22 jan. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.142>. Acesso em: 27 mar. 2023.

TESFAYE, A. A.; AZMI, A. S.; PHILIP, P. A. miRNA and Gene Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, v. 189, n. 1, p. 58, 1 jan. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6854437/>. Acesso em: 12 mar. 2023.

THIBAUT, B. *et al.* Pancreatic cancer intrinsic PI3K $\alpha$  activity accelerates metastasis and rewires macrophage component. *EMBO molecular medicine*, v. 13, n. 7, 7 jul. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34033220/>. Acesso em: 7 abr. 2023.

TODARO, M. *et al.* Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*, v. 1, n. 4, p. 389–402, out. 2007.

TOMASELLO, G. *et al.* Outcome of head compared to body and tail pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of 93 studies. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 10, n. 2, p. 259, 1 abr. 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6465486/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35465486/)>. Acesso em: 10 mar. 2023.

TORRISANI, J. *et al.* let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Human gene therapy*, v. 20, n. 8, p. 831–844, 1 ago. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19323605/>>. Acesso em: 13 mar. 2023.

TSUNODA, T. *et al.* Oncogenic KRAS regulates miR-200c and miR-221/222 in a 3D-specific manner in colorectal cancer cells. *Anticancer research*, 2011.

USMAN, S. *et al.* Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 4985*, v. 13, n. 19, p. 4985, 5 out. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/19/4985/htm>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

VADDI, P. K. *et al.* Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response. *Cancers*, v. 11, n. 9, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500347/>>. Acesso em: 4 ago. 2023.

VILA-CASADESÚS, M. *et al.* Deciphering microRNA targets in pancreatic cancer using miRComb R package. *Oncotarget*, v. 9, n. 5, p. 6499, 1 jan. 2018. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5814228/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30442228/)>. Acesso em: 10 mar. 2023.

VINOGRADOV, S.; WEI, X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (London, England)*, v. 7, n. 4, p. 597–615, abr. 2012.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell*, v. 10, n. 6, p. 717–728, jun. 2012.

VLASHI, E.; PAJONK, F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Seminars in Cancer Biology*, v. 31, p. 28–35, abr. 2015.

WALCHER, L. *et al.* Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 539291, 7 ago. 2020.

WANG, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, v. 412, n. 6844, p. 346–351, 19 jul. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11460167/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

WANG, Q.-E. DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World journal of biological chemistry*, v. 6, n. 3, p. 57–64, ago. 2015.

WANG, W. *et al.* The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 5, n. 1, p. 119–27, jan. 1999.

WANG, Y. *et al.* PI3K inhibitor LY294002, as opposed to wortmannin, enhances AKT phosphorylation in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, v. 50, n. 2, p. 606–612, 14 dez. 2016. Disponível em: <<http://europepmc.org/article/MED/28000865>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

WATERS, A. M.; DER, C. J. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 9, p. a031435, 1 set. 2018. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/8/9/a031435.full>>. Acesso em: 3 nov. 2022.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, v. 17, n. 1, p. 1, 1 jan. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4309685/>. Acesso em: 28 ago. 2023.

WEN, J. *et al.* Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis. *Pancreas*, v. 39, n. 5, p. 622–626, jul. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20173672/>. Acesso em: 7 ago. 2023.

WINTER, J. *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009 11:3, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncb0309-228>. Acesso em: 12 mar. 2023.

WINTER, J. M. *et al.* Survival after resection of pancreatic adenocarcinoma: results from a single institution over three decades. *Annals of surgical oncology*, v. 19, n. 1, p. 169–175, jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21761104/>. Acesso em: 10 mar. 2023.

WU, G. *et al.* Oct4 Is a Reliable Marker of Liver Tumor Propagating Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Discovery Medicine*, v. 20, n. 110, p. 219–229, 27 out. 2015.

XIA, L. *et al.* Role of the NF $\kappa$ B-signaling pathway in cancer. *OncoTargets and therapy*, v. 11, p. 2063, 11 abr. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5905465/>. Acesso em: 6 abr. 2023.

XIA, Y. *et al.* Phosphorylation of p53 by I $\kappa$ B kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 8, p. 2629–34, fev. 2009.

XIA, Y. *et al.* Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nature Cell Biology*, v. 14, n. 3, p. 257–265, fev. 2012.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 29, n. 2, p. 72–79, fev. 2004.

YIN, T. *et al.* Cancer Stem-Like Cells Enriched in Panc-1 Spheres Possess Increased Migration Ability and Resistance to Gemcitabine. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, Vol. 12, Pages 1595-1604, v. 12, n. 3, p. 1595–1604, 1 mar. 2011. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/12/3/1595/htm>. Acesso em: 27 jul. 2023.

YING, H. *et al.* PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF- $\kappa$ B-cytokine network. *Cancer Discovery*, v. 1, n. 2, p. 158–169, 23 maio 2011. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/1/2/158/2249/PTEN-Is-a-Major-Tumor-Suppressor-in-Pancreatic>. Acesso em: 10 nov. 2022.

YU, S. *et al.* miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Research*, v. 70, n. 14, p. 6015–6025, 15 jul. 2010.

ZAKARIA, N. *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling reduces the stemness characteristics of lung cancer stem cells. *Frontiers in Oncology*, v. 8, n. MAY, p. 366363, 17 maio 2018.

ZEINEDDINE, D. *et al.* The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *American Journal of Stem Cells*, v. 3, n. 2, p. 74, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4163606/>. Acesso em: 7 ago. 2023.

ZHANG, G. F. *et al.* MiR-19 enhances pancreatic cancer progression by targeting PTEN through PI3K/AKT signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 3, p. 1098–1107, 2020.

ZHANG, J. *et al.* An unexpected twist to the activation of IKK $\beta$ : TAK1 primes IKK $\beta$  for activation by autophosphorylation. *Biochemical Journal*, v. 461, n. Pt 3, p. 531, 8 ago. 2014. Disponível em:

</pmc/articles/PMC4206954/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

ZHANG, Q. *et al.* The Role and Specific Mechanism of OCT4 in Cancer Stem Cells: A Review. *International Journal of Stem Cells*, v. 13, n. 3, p. 312, 1 nov. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7691851/>. Acesso em: 7 ago. 2023.

ZHANG, S. *et al.* Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Research*, v. 68, n. 11, p. 4311–4320, jun. 2008.

ZHANG, YANTING *et al.* Targeting I $\kappa$ B Kinase  $\beta$ /NF- $\kappa$ B Signaling in Human Prostate Cancer by a Novel I $\kappa$ B Kinase  $\beta$  Inhibitor CmpdA. *Molecular cancer therapeutics*, v. 15, n. 7, p. 1504–14, jul. 2016.

ZHANG, YUAN *et al.* MicroRNA-19b Promotes Nasopharyngeal Carcinoma More Sensitive to Cisplatin by Suppressing KRAS. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 17, 1 jan. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6149031/>. Acesso em: 20 dez. 2022.

ZHAO, W. G. *et al.* The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 10, p. 1726–1733, 1 out. 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article/31/10/1726/2477236>. Acesso em: 12 mar. 2023.

ZHONG, X. *et al.* Suppression of MicroRNA 200 Family Expression by Oncogenic KRAS Activation Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition in KRAS-Driven Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, v. 36, n. 21, p. 2742, 11 nov. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5064220/>. Acesso em: 9 abr. 2023.

ZHOU, K.; LIU, M.; CAO, Y. New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene–microRNA–Tumor Suppressor Gene Network. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 4, n. JUL, p. 46, 7 jul. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5500619/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

ZHU, G. *et al.* Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Molecular Cancer*, v. 20, n. 1, 1 dez. 2021.

ZIEGELBAUER, K. *et al.* A selective novel low-molecular-weight inhibitor of I $\kappa$ B kinase-beta (IKK-beta) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. *British journal of pharmacology*, v. 145, n. 2, p. 178–192, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15753951/>. Acesso em: 8 ago. 2023.

ZINZI, L. *et al.* ABC transporters in CSCs membranes as a novel target for treating tumor relapse. *Frontiers in pharmacology*, v. 5, p. 163, 2014.

## Anexo 1 – Sequência completa do 3'UTR de PTEN humana com os insertos clonados

### LEGENDA:

Sítios dectados para: **miR-494-3p**    **miR-221-3p**    **miR-205-5p**    **miR-19b-3p**    **miR-21-5p**  
**miR-29a/b-3p**    Primers da clonagem    **Insertos clonados**

### Sequência completa do 3'UTR de PTEN humana (~6.4 kb)

ATTTTTTTTTATCAAGAGGGATAAAACACCATGAAAATAAATTGAATAAACTGAAAATGGACCTTTTTTTTT  
TTAATGGCAATAGGACATTGTGTCAGATTACCAGTTATAGGAACAATTCTCTTT**TCCTGACCAATCTTGT**  
**TTACCC**TATACATCCACAGGGTTTTGACACTTGTGTCC**AGTTGAAAAAGTTGTGTAGCT**GTGTCAT  
GTATATACCTTTTTGTGTCAAAAGGACATTTAAAATTCAATTAGGATTAATAAAGATGGCATTTCCTGTT  
TTATTCCAGTTTTATAAAAAGTGGAGACAGACTGATGTGTATACGTAGGAATTTTTCTTTTTGTGTTCTG  
TCACCAACTGAAGTGGCTAAAGAGCTTTGTGATATACTGGTTCACATCCTACCC**TTTGAC**TTGTGGCA  
ACAGATAAGTTGCAGTTGGCTAAGAGAGGTTCCGAAGGGTTTTGCTACATTCTAATGCAT**GTATTGGG**  
**GTTAGGGGAATGGAGGG**AATGCTCAGAAAGGAAATAATTTTATGCTGGACTCTGGACCATATACCATCT  
CCAGCTATTTACACACACCTTTCTTTAGCATGCTACAGTTATTAATCTGGACATTCGAGGAATTGGCCGC  
TGTCACTGCTTGTGTTT**CGCATT**TTTTTTAAAGCATATT**GGTGCT**AGAAAAGGCAGCTAAAGGAAGT  
GAATCTGTATTGGGGTACAGGAATGAACCTTCTGCAACAT**CTTAAGATCCACAAATGAAGGG**ATATAAA  
AATAATGTCATAGGTAAGAAACACAGCAACAATGACTTAACCATATAAATGTGG**AGGCTATCAACAAAG**  
**AATGGGC**TTGAAACATTATAAAAATTGACAATGATTTATTAATATGTTTTCTCAATTGTAACGACTTCTCC  
ATCTCCTGTGTAATCAAGGCCAGTGCTAAAATTCAGATGCTGTTAGTACCTACATCAGTCAACAACCTTAC  
ACTTATTTACTAGTTTTCAATCATAATACCTG**CTGTGGATGCTTCATGTGCT**GCCTGCAAGCTTCTTTTT  
TCTCATTAAATATAAAATATTTTGAATGCTGCACAGAAATTTCAATTTGAGATTCTACAGTAAGCGTTTT  
TTTTCTTTGAAGATTTATGATGCACTTATTCATAGCTGTCAGCCGTTCCACCCTTTGACCTTACACATT  
CTATTACAA**TGAATTTTGCAGTTTGCACA**TTTTTAAATGTCATTAAGTGTAGGGAAATTTACTTGAATA  
CTGAATACATATAATGTTTATAATTAAGGACATTTGTGTTAAAAGGAAATTAGAGTTGCAGTAACTT  
TCAATGCTGCACACAAAAAAGACATTTGATTTTTAGTAGAAATTGCTTACATGTGCTTTATTGATT  
GCTATTGAAAGAATAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGTGCAGTGTGAATCATTCTT  
CATAGTGTCCCCCGAGTTGGGACTAGGGCTTCAATTTCACTTCTTAAAAAATCATCATATATTTGATA  
TGCCAGACTGCATACGATTTTAAAGCGGAGTACAACACTACTTTGTAAGCTAATGTGAAGATATTATTAA  
AAAGGTTTTTTTTTCCAGAAATTTGGTGTCTTCAAATTATACCTTACCTTGACATTTGAATATCCAGCCAT  
TTGTTTCTTAATGGTATAAA**ATCCATTTCAATACTTATTGGTGCT**GAAATTGTTCACTAGCTGTGGT  
CTGACCTAGTTAATTTACAAATACAGATTGAAT**AGGACCTACTAGAGCAGCATT**TATAGAGTTTGGATGGC  
AAATAGATTAGGCAGAATTCATCTAAAATATTCTTAGTAAATAATGTTGACACGTTTCCATACCTTGTG  
AGTTTCAATCAACAATTTTTAAATTTTTAACAAAGCTCTTAGGATTTACACATTTATATTTAAACATTGATAT  
ATAGAGTATTGATTGATTGCTCATAAGTTAAATTGGTAAAGTTAGAGACAACTATTCTAACACCTCACCAT  
TGAAATTTATATGCCACCTTGTCTTTCATAAAAGCTGAAAATTGTTACCTAAAATGAAAATCAACTTCATGT  
TTTGAAGATAGTTATAAATATTGTTCTTTGTTACA**ATTCGGGCACCCGATATTA**AAACGTAACCTTTATTG  
TTCCAATATGTAACATGGAGGGCCAGGTCATAAATA**TGACATTATAATGGGCTTTTGACT**GTTATTAT  
TTTTCTTTGGAATGTGAAGGTCTGAATG**AGGGTTTTGATTTGAATGTTTCA**ATGTTTTTGAGAAGCCTT  
GCTTACATTTTATGGTGTAGTCATTGGAAATGGAAAATGGCATTATATATATATATATAAATATATAT  
TATACATACTCTCCTTACTTTATTTAGTTACCATCCCATAGAATTTGACAAGAATTGCTATGACTGAAA  
GGTTTTCGAGTCCTAATTAAACTTTATTTATGGCAGTATTCATAATTAGCCTGAAATGCATTCTGTAGGT  
AATCTCTGAGTTTCTGGAATATTTCTTAGACTTTTTGGATGTGCAGCAGCTTACATGTCTGAAGTACTT  
GAAGGCATCACTTTTAAAGAAAGCTTACAGTTGGGCCCTGTACCATCCCAAGTCCTTT**GTAGCT**CCTCTTG  
AACATGTTTGCCACTTTTAAAGGGTAGTTGAATAAATAGCATCACCATTCTTTGCTGTGGCACAGGT  
TATAAATTAAGT**GGAGTTTACCGGCAGCATCAAATGTTTCA**AGCTTTAAAAATAAAAGTAGGGTACAAG  
TTTTAATGTTTAGTTCTAGAAATTTGTGCAATATGTTTATAACGATGGCTGTGGTTGC**CACAAAGTGCT**  
**CGTTTACC**TTTAAATACTGTTAATGTGTGCATGCATGCAGATGGAAGGGGTGGAAGTGTGCACTAAAGTG  
GGGGCTTTAACTGTAGTATTTGGCAGAGTTGCCTTCTACCTGCCAGTTCAAAGTTCAACCTGTTTTTAT  
ATAGAATATATACTAAAAATTTAGTCTGTTAAACAGCCTTACTCTGATTCAGCCTCTTACAGATACTC  
TTGTGCTGTGCAGCAGTGGCTCTGTGTGTAATGCTATGCACTGAGGATACACAAAAATACCAATATGAT  
GTGTACAGGATAATGCCTCATCCAATCAGATGTCCATTTGTTATTGTGTTTGTAAACAACCTTTATCTC

TTAGTGTTATAAACTCCACTTAAAAGTCTCATTCTTGTGATTGTGTGGGTGTTTTATTAATG  
 AGAGTTTATAAATCAAATTGCTTAAGTCCATTGAAGTTTTAATTAATGGGCAGCCAAATGTGAATACAAAG  
 TTTTCAGTTTTTTTTTTTCTGCTGCTCCTTCAAAGCCTACTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGGC  
 CTGAGAGTAGAGTATCTGTCTACTCATGTTAATTAAGGAAAAACACTTATTTTTAGGGCTTTAGTCATCA  
 CTTCATAAATTGTATAAGCACATTAATAGCGTTCTAGTCCTGAAAAAGTCCAAGATTCTTAGAAAATTGT  
 GCATATTTTTATTATGACAGATGTTTGAAGATAATCCCCAGAATGGATTTGATACTTTAGATTTCATTTTT  
 GTGGCTTTTGTCTATTATTCTGTACTCTGCCATCAGCATATGGAAAGCTTCATTTACTCATCATGACTTGT  
 GCCATATAAAAATTGATATTTCCGAATAGTCTAAAGGACTTTTTGTACTTGAATTTAATCATGTTGTTTCTA  
 ATATTCTTAAAAGCTTGAAGACTAAAGCATATCCTTTCAACAAAGCATAGTAAGGTAATAAGAAAGTGTAG  
 TTTGTACAAGTGTTAAAAAATAAAGTAGACAATGTTACAGTGGGACTTATTATTTCAAGTTTACATTTTTCT  
 CCATGTAATTTTTTAAAAGTAAATGAAAAATGTGCAATAATGTAAA**ATATGAAGTGTATGTGTACACAC**  
 ATTTATTTTTCGGTATCTTGGGTATACGTATGGTTGAAAACTATACTGGAGTCTAAAAGTATTCTAATTTA  
 TAAGAAGACATTTTGGTGTATGTTTGAAGATAAGAAATGT**CTAGTTTTGTTTTATATCATGCTTTTGTAG**  
**CGTTTGAATATGAGCTGGCTTGGTTCAGTAAATGCCATCACCATTTCCATTGAGAATTTAAAAGTCCACCA**  
 GTGTTTAAATATGCAGGCTTCCAAAGGCTTATGAAAAAATCAAGACCCTTAAATCTAGTTAATTTGCTGCT  
 AACATGAAACTCTTTGGTTCTTTTATTTTTGCCAGATAATTAGACACACATCT**AAAGCTTAGTCTTAAATG**  
**GCTTAAGTGTAgctATTGATTAGTGCTGTTGCTAGTTT**CAGAAAGAAATGTTTGTGAATGGAAACAAGAATA  
 TTCAGTCCAAACTGTTGTAAGGACAGTACCTGAAAACCAGGAAACAGGATAATGGAAAAAGTCTTTTAAA  
 GATGAAATGTTGGAGCCAACCTTTCTTATAGAATTAATTGTATGTGGCTATAGAAAGCCTAATGATTGTTGC  
 TTTTTTTGAGAGCATATTATTCTTTTATGACCATAATCTTGCTGTTTTTCCATCTTCCAAAAGATCTTCT  
 TCTAATATGTATATCAGAATGTGGGTAGCCAGTCAGACAAATTCATATTGGTTGGTAGCTTTAAAAGTTT  
 GTAATGTGAAGACAGGAAAGGACAAAATAGTTTGTCTTGGTGGTAGTACTCTGGTTGT**TAAGCTA**GGTA  
 TTTTGAGACTACTTCCCATCACAAACAATAAAAATAAT**CACTCATAATCCTATCACCT**GGAGACATAG  
 CCATCGTTAATATGTTAGTGACTATACAATCATGTTTTCTCTGTATATCCATGTATATTCTTTAAAATGA  
 AATTTACTGTACCTGATCTCAAAGCTTTTTAGCTTAGTATATCTGTCATGAATTTGTAGGATGTTCCATT  
 GCATCAGAAAACGGACAGTGATTTGATTACTTTCTAATGCCACAGATGCAGATTACATGTAGTTATTGAG  
 AATCCTTTTGAATTCAGTGGCTTAAATCATGAATGTCTAAATATTGTTGACATTAGGATGATACATGTAAT  
 TAAAGTTACATTTGTTTAGCATAGAC**AAAGCTTAACATTGTAGATGTTTCT**CTTCAAAAATCATCTTAAACA  
 TTTGCATTTGGAATTTGTGTTAATAGAATGTGTGAAACACTGTATTAGTAAACTTCATCACCTTTCTACTT  
 CCTTATAGTTTGAACTTTTAGTTTTGTAGTTCCCAAACAGTTGCTCAATTTAGAGCAAATTAATTTAACA  
 CCTGCCAAAAAAGGCTGCTGTTGGCTTATCAGTTGTCTTTAAATTCAAATGCTCATGTGACTTTTATCAC  
 ATCAAAAATATTTTCAATTAATGATTCACCTTTAGCTCTGAAAATTACCGCTTTAGTAATTATAGTGGGCT  
 TATAAAAACATGCAACTCTTTTTGATAGTTATTTGAGAATTTTGGTGAAGAAATATTTAGCTGAGGGCAGTA  
 TAGAACTTATAAACCAATATATTGATATTTTTAAAACATTTTTACATATAAGTAAACTGCCATCTTTGAGCA  
 TAACTACATTTAAAATAAAGCTGCATATTTTTAAATCAAGTGTTTAAACAAGAATTTATTTTTTATTTTT  
 AAAATTAATAAATTTATATTTCTCTGTTGCATGAGGATTCTCATCTGTGCTTATAATGGTTAGAGATTT  
 T**ATTTGTGTGGAATGAAG**TGAGGCTTGTAGTCATGGTTCTAGTGTTTCAGTTTGCCAAGTCTGTTTACTG  
 CAGTGAAATTCATCAA**ATGTTTC**AGTGTGTTTTCTGTAGCCTATCATTTACTGGCTATTTTTTTATGTAC  
 ACCTTTAGGATTTTTCTGCCTACTCTATCCAGTTGTCCAAATGATATCCTACATTTTACAAATGCCCTTTCA  
 GTTTCTATTTTTCTTTTCCATTAATTTGCCCTCATGTCCTAATGTGCAGTTTGAAGTGTGTGTGTGTG  
 TCTGTGTGTGTGAATTTGATTTTCAAGAGTGCTAGACTTCCAATTTGAGAGATTAATAATTTAATTCA  
 GGCAAACATTTTTTATTGGAATTTACAGTTCATTGTAATGAAAATGTTAATCCTGGATGACCTTTGACAT  
 ACAGTAATGAATCTTGATATTAATGAATTTGTTAGTAGCATCTTGATGTGTGTTTTAATGAGTTATTTTCA  
 AAGTTGTGCATTAACCAAAGTTGGCATACTGGAAGTGTTTATATCAAGTTCCATTTGGCTACTGATGGA  
 CAAAAATAGAAATGCCTTCTATGGAGAGTATTTTTCTTTAAAAAATTAATAAAGGTTAATTTTGGACT  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA