# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

# VANESSA SILVA MIRANDA

Investigação da quinase IKKβ como um alvo terapêutico anti-metastático em câncer de pulmão associado à ativação do oncogene KRAS

Versão Original

São Paulo Data do depósito na SPG: 28/11/2018

# VANESSA SILVA MIRANDA

# Investigação da quinase IKKβ como um alvo terapêutico anti-metastático em câncer de pulmão associado à ativação do oncogene KRAS

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères

São Paulo 2018 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

# Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Miranda, Vanessa Silva

M672i Investigação da quinase IKKbeta como um alvo terapêutico anti-metastático em câncer de pulmão associado à ativação do oncogene KRAS / Vanessa Silva Miranda. - São Paulo, 2018.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Basseres, Daniela Sanchez

1. câncer de pulmão. 2. KRAS. 3. metástase. 4. quinase IKKbeta. I. T. II. Basseres, Daniela Sanchez, orientador.



# **AGRADECIMENTOS**

Só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil descrever os meus sentimentos por todos que fizeram parte deste caminho, mas sou eternamente grata a todos que estiveram ao meu lado me apoiando.

Primeiramente, agradeço a *Deus*, que permitiu que tudo fosse possível, pela dádiva da vida, por ter permitido o aprendizado em cada experiência vivida, deixando com que eu leve as resultantes de cada acerto.

À *Professora Dra. Daniela Bassères*, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigado por ter me recebido tão bem em seu laboratório, só tenho a agradecer por todo ensinamento, palavras de incentivo, paciência e pela confiança.

Aos membros e ex-membros do LBMC que me receberam de braços abertos. Primeiramente, à *Luiza*, que sempre se fez tão presente, por primeiro ter sido uma professora para mim tanto antes no Curso de Verão, quanto depois sendo colegas de laboratório. Você me fez perceber que ali no bloco 9 eu tinha ganhado muito mais que apenas colegas, e sim amigos que tenho certeza que levarei para a vida toda, por ter me apoiado diversas vezes tanto em experimentos como na vida. Ao *Edmilson*, por ter acreditado em mim e ter me incentivado tanto a percorrer esse caminho, por ter se mostrado amigo em vários momentos mesmo quando estava na Itália. Ao *Felipe*, por ter dividido tudo comigo, alvo terapêutico, bancada, mesa, casa, marido e até o nosso "baby", por ter sido sempre leal e compartilhado tantos momentos que ficarão sempre na memória. Ao *Lutero* por ter sido meu fiel escudeiro de experimentos *in vivo*, por sempre ter as melhores ideias nos melhores momentos, por ser tão prestativo e por ter me ensinado a arte de ser antissocial e todo mundo ainda gostar de você.

Ao *Sandro*, pelas risadas, besteiras, baladas e por ser um ombro amigo em diversos momentos. Á *Thalita*, pela sua doçura, preocupação, e um jeito que é só dela de compartilhar a vida, por ter me apresentado e me proporcionado momentos importantíssimos para minha saúde mental e por ter sido companheira de disciplinas enlouquecedoras no primeiro ano de mestrado. Por fim, à *Tatiana* por ter iniciado este projeto

Aos membros do Laboratório de Pesquisas Integradas em Câncer (LAPIC). Ao Prof. Dr. Eduardo Reis e à Profa. Dra. Deborah Schechtman pelas ideias e colaborações que acrescentaram maior qualidade a todos os trabalhos do laboratório. Aos demais membros do LAPIC, que fizeram do laboratório sempre um ambiente agradável e descontraído com conversas enriquecedoras e positivas. Em especial à Bianca, que salva a nossa vida pela competência e também pela astrologia, ao Arthur por ser essa pessoa boa e prestativa em todos os momentos, ao Diogo Pessoa pelos almoços sempre muito agradáveis e por ter sempre palavras que confortam, ao Julio Cesar (in memoriam) por levar sempre alegria a nossas vidas, a Ester pelo bom humor de todo dia, ao Diogo Pellegrina, pelas conversas nerds, aos membros Damiam, Dimitrius, Allan e Beatriz que mesmo pelo pouco tempo de convivência se fizeram sempre prontos a ajudar.

Aos professores que tanto me ensinaram na UFTM, obrigada pela dedicação durante o meu período de graduação, que me possibilitou estar aqui hoje.

Ao meu marido *Vinicius*, que sempre foi meu porto seguro, por todo amor, carinho, por sempre acreditar em mim, mais até do que eu mesma, por sempre apoiar minhas decisões, mesmo naquelas que menos compreendia, e por ter feito inúmeros sacrifícios para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada pelo maior presente que ganhei durante o período de mestrado, a nossa filha Melissa e por saber me fazer feliz.

À minha filha *Melissa*, que veio durante esse período, por ter me ensinado o que é o amor incondicional, e que em tão curto tempo me mostrou os maiores ensinamentos da vida. Por ter me transformado em outra pessoa e me mostrado o real e verdadeiro sentido da vida.

À minha mãe *Marilene* e ao meu pai *Antônio*, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. À minha irmã *Viviane*, meus irmãos *Vitor* e *Francisco* e meus sobrinhos *Caio* e *Manuela* sempre prontos a me apoiar em tudo nesta vida.

Aos meus sogros *Rose* e *Jorge* pelo apoio incondicional nas nossas vidas.

Aos meus tios *Rosita* e *Ivan*, que foram de vital importância para o início de todo o processo de mudança, por terem me recebido em sua casa e terem me fornecido um lar para que eu iniciasse a minha vida em São Paulo e por terem sido meu apoio aqui durante os primeiros meses.

À toda a minha família pelo suporte incondicional.

Aos *animais*, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Aos funcionários do Instituto de Química pela atenção, apoio e profissionalismo.

À FAPESP pelo incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial desse estudo. E à CAPES pela bolsa durante o início do mestrado.

# **RESUMO**

Miranda, V. S. Investigação da quinase IKKβ como um alvo terapêutico anti-metastático em câncer de pulmão associado à ativação do oncogene KRAS. 2018. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O câncer de pulmão é o tipo de câncer que apresenta o maior índice de mortalidade em todo o mundo. As alterações genéticas mais frequentes em câncer de pulmão são as mutações pontuais no oncogene que codifica a GTPase KRAS. Apesar destas mutações estarem diretamente ligadas à oncogênese, terapias que visam inibir diretamente a proteína Ras falharam em ensaios clínicos. Uma das propriedades mais importantes na oncogênese é a aquisição de capacidade metastática tumoral. Desta forma, o objetivo deste projeto é identificar alvos terapêuticos que inibam as metástases tumorais induzidas pelo oncogene KRAS no pulmão. Com base em relatos recentes mostrando que a forma oncogênica de KRAS promove, não só a iniciação tumoral, mas também promove a aquisição de um fenótipo metastático, a hipótese deste projeto é que (1) a capacidade mestastática tumoral induzida por KRAS no pulmão é potencializada pela quinase ΙΚΚβ; e (2) que a inibição desta quinase reduzirá a capacidade invasiva celular e metastática tumoral. Esta hipótese foi formulada com base em estudos anteriores, os quais demonstraram que o principal substrato da IKKβ, o fator de transcrição NF-κB, é ativado por KRAS em tumores pulmonares in situ de forma dependente da IKKβ, que o NF-κB é capaz de promover metástase em diferentes modelos tumorais, e que a inibição da atividade da IKKβ com um inibidor farmacológico em um modelo animal de câncer de pulmão induzido por KRAS, diminui o crescimento tumoral e a progressão tumoral para graus histológicos mais avançados. Nosso objetivo era avaliar se a inibição de IKKβ é capaz de afetar a migração e invasão de células portadoras de mutação em KRAS in vitro e se a inibição de IKKB é capaz de afetar a capacidade metatática dessas células in vivo. Primeiramente, avaliamos a expressão de enzimas relacionadas ao fenótipo metastático, as metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) e, também uma molécula intimamente relacionada ao processo de adesão mediado por integrinas, FAK (quinase de adesão focal), frente a inibição de IKKβ através de um inibidor farmacológico altamente especifico (Composto A) e frente a inibição genética de IKKβ por interferência de RNA (siRNA) em células A549 e H358. Avaliamos também a atividade das MMPs frente inibição genética de KRAS (siKRAS) e ΙΚΚβ (siIKKβ) e vimos que ΙΚΚβ parece modular a expressão ou atividade de MMP-9 e reduz a expressão de FAK. Já a expressão de MMP-2 não apresentou alteração. Posteriormente avaliamos migração na célula A549 e invasão nas células A549 e H358 com inibição de IKKβ, por ensaios Transwell, e observamos uma redução da migração e invasão celular in vitro. Em seguida, fomos gerar linhagens celulares paraa expressar luciferase, as linhagens A549 pLUC e H358 pLUC. Os clones A549 pLUC B4 e H358 pLUC F1 com inibição de KRAS e IKKβ por interferência de RNA, foram injetados pela veia da cauda nesses camundongos e as metástases foram monitoradas por imageamento in vivo. Houve metástases em 20% dos animais com siIKKβ na região anatômica da boca. Os animais que receberam siControle e siKRAS não apresentaram nenhuma metástase visível no equipamento, mas foi observado micrometástases nas análises histológicas dos pulmões. O resultado do experimento de metástase in vivo é inesperado, não só pelo fato de ocorrer no grupo experimental siIKKβ, mas também pelo local anatômico do tumor, sendo necessária uma maior investigação do papel de IKKβ nesse processo, podendo ser um resultado aleatório. Quando avaliamos em conjunto, nossos resultados sugerem que a quinase IKKβ desempenha um papel importante no fenótipo migratório e invasivo de células pulmonares portadoras de KRAS oncogênica, contribuindo para a capacidade metastática.

Palavras-chave: câncer de pulmão, KRAS, metástase, quinase IKKβ.

# **ABSTRACT**

Miranda, V. S. Exploring IKKbeta as an anti-metastatic therapeutic target in KRAS-induced lung câncer. 2018. Master's Degree Dissertation — Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide. The most frequent genetic changes found in lung cancer are driver mutations in the KRAS proto-oncogene. Even though KRAS mutations have been causally linked to the oncogenic process, therapies targeted to oncogenic RAS have failed in clinical trials. One of the main characteristics in oncogenesis is the ability of tumors to acquire metastatic capability. The objective of this project is to identify therapeutic targets that reduce KRASinduced lung cancer metastasis. Based on previous reports that oncogenic KRAS, drives not only tumor initiation, but also promotes a metastatic phenotype, the hypothesis of this project is that (1) the acquisition of metastatic ability induced by KRAS in the lung is potentiated by the IKKβ kinase; and (2) that IKKbeta inhibition will reduce KRAS-induced cell invasive properties and KRAS-induced tumor metastasis. This hypothesis has been formulated on the basis of previous studies showing that the main IKKbeta substrate, the transcription factor NF-kappaB, is activated by KRAS in lung tumors in situ in an IKKbeta-dependent manner, that NF-kappaB is known to promote metastasis in different tumor models, and that pharmacological IKKbeta inhibition in a KRAS-induced lung cancer mouse model reduces tumor growth and progression to higher histological tumor grades. Our goal was evaluate how inhibition of IKKβ affects migration and invasion of KRAS-positive lung cells in vitro and whether inhibition of IKKβ is capable of affecting the metatactic capacity of these cells in vivo. First, we evaluated the expression of enzymes involved in the metastatic phenotype, matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) and also a molecule involved in the integrinmediated adhesion, FAK (focal adhesion kinase), we targeted IKKβ by a highly specific IKKβ inhibitor (Compound A) or with RNA interference in A549 and H358 cells. We also used colorimetric Matrix Biotrak Activity Assay System to measure the activity of MMPs with RNA interference for KRAS (siKRAS) and IKKβ (siIKKβ) and we have seen that IKKβ appears to modulate the expression or activity of MMP-9 and decreases the expression of FAK. The expression of MMP-2 did not change. Then we evaluated migration in A549 cell and invasion in A549 and H358 cells with inhibition of IKKβ by RNA interference or with Compound A treatment in Transwell assays, and observed a significantly reduced cell migration and invasion in vitro. We then generated cell lines to express luciferase, the A549 pLUC and H358 pLUC lines. A549 pLUC B4 and H358 pLUC F1 cells with RNA interference for KRAS and IKKB were injected in the tail vein in nude (balb/c) mice and metastases were monitored by in vivo imaging. There were metastases in 20% of siIKKβ animals in the anatomical region of the mouth. Animals that received siControl and siKRAS had no visible metastasis in the live imaging, but micrometastases were observed in the histological analyzes of the lungs. The result of this experiment is unexpected, not only due to the fact that it occurs in the siIKKβ experimental group, but also due to the anatomical site of the tumor, and a further investigation of the role of IKKβ in this process, can be a random result. When evaluated together, our results suggest that the IKKβ kinase plays an important role in the migratory and invasive phenotype of in KRAS positive lung cancer cells, contributing to metastatic capacity.

Keywords: lung cancer, KRAS, metastasis, IKKβ kinase.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas no mu	
no ano de 2012.	
Figura 1.2. Ocorrência de casos de câncer em ambos os sexos no Brasil	18
Figura 1.3. Sobrevida relativa em cinco anos para os graus variados de câncer de	
pulmão a partir do momento do diagnóstico.	19
Figura 1.4. Mutações que causam o desenvolvimento de NSCLC.	20
Figura 1.5. As proteínas RAS são compostas de dois domínios funcionais, o domínio	
o domínio de ancoragem à membrana.	
Figura 1.6. Modificações pós traducionais de RAS.	25
Figura 1.7. Regulação da atividade de KRAS mediada via receptor tirosina quinase	
Figura 1.8. Vias efetoras conhecidas de RAS.	
Figura 1.9. O mutante de KRAS está continuamente em um estado ativo ligado ao	
Figura 1.10. Inibição de KRAS via efetores downstream.	
Figura 1.11. As etapas do processo metástico.	
Figura 1.12. Esquema dos domínios funcionais de IKKα e IKKβ.	
Figura 1.12. Esquema dos dominios funcionais de ficko e ficko Figura 1.13. As vias canônica (clássica) e não-canônica (alternativa) IKK/NF-κB	
Figura 4.1. Validação da inibição farmacológica de IKKβ por Composto A	
Figura 4.1. Vandação da mibição farmacológica de IKKβ em células A549 e H358 reduz a expi	
dos genes FAK e MMP-9.	
Figura 4.3. Inibição de IKKβ por interferência de RNA em células A549 e H358 rec	
expressão dos genes FAK e MMP-9.	
Figura 4.4. As células A549 e H358 foram transfectadas com siRNA controle (siCtr	
siRNA para KRAS (siKRAS) ou para IKKβ (siIKKβ) por 72 horas	
Figura 4.5. Inibição da atividade ou expressão de IKKβ promove uma diminuição o	
capacidade migratória das células A549.	
Figura 4.6. Inibição da atividade de IKKβ promove uma diminuição da capacidade	
invasiva.	
Figura 4.7. Vetor de expressão pGL4.51[luc2/CMV/Neo] da Promega	
Figura 4.8. Validação da atividade de luciferase nos clones obtidos na seleção clona	
Figura 4.9. Validação da inibição de KRAS e IKKβ por RNA de intereferência no c	
A549 pLUC B4.	
Figura 4.10. Imagens obtidas do IVIS Spectrum de camundongos nude balb/c	
Figura 4.11. Análise histológica de lâminas dos pulmões dos animais do primeiro	
experimento de formação de metástases in vivo coradas com Hematoxilina/Eosina.	78
Figura 4.12. Validação da atividade de luciferase no clone H358 pLUC F1	
Figura 4.13. Imagens obtidas do IVIS Spectrum.	
Figura 4.14. Validação da inibição de KRAS e IKKβ por RNA de intereferência no	
H358 pLUC F1.	
Figura 4.15. Imagens obtidas do IVIS Spectrum de camundongos nude balb/c	82
Figura 4.16. Análise histológica de lâminas do tumor da boca e pulmões do animal	
pLUC siIKKβ coradas com Hematoxilina/Eosina	

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Frequência de mutações em RAS em cânceres humanos	.30
Tabela 3.1. Sequências dos pares de primers forward (Fw) e reverse (Rv) utilizados na	ıS
reações 57	
Tabela 3.2. Anticorpos primários utilizados nos experimentos de Western Blot	.59
Tabela 3.3. Anticorpos secundários utilizados nos experimentos de Western Blot	.59

# LISTA DE ABREVIATURAS

**ACTB**: β-actina

**ADP:** adenosina difosfato

**Akt**: serina treonina quinase (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog*)

**ATP:** adenosina trifosfato

**BAFF:** fator de ativação de células B

**BM:** membrana basal (basal membrane)

**BRAF:** gene codificador da proteína B-Raf

**c-Rel:** fator de transcrição membro da família NF-kB

CA: Composto A

**CD40:** proteína transmembrana envolvida no desenvolvimento

cDNA: DNA complementar

CITs: células iniciadoras de tumor

**CHUK:** gene que codifica IKKα

**COX-2:** ciclooxigenase

**DMSO:** dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

**ECM:** matriz extracelular (*extracellular matrix*)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

**EGF:** fator de crescimento epidermal

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal

**EMT:** transição epitelial-mesenquimal (epithelial-mesenchymal transition)

**ERK:** quinase reguladora de sinais extracelulares

**FAs:** aderências focais intracelulares

**FAK:** quinase de adesão focal

FTase: enzima farnesiltransferase

G418: geneticina

**GAP:** proteína ativadora de GTPase (*GTPase-activating protein*)

**GAPDH:** gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDP: difosfato de guanosina

**GEFs:** fatores de troca de nucleotídeos de guanina (guanine nucleotide exchange factors)

**GGT-1:** enzima geranilgeraniltransferase do tipo I

**GGT-2:** geranilgeraniltransferase do tipo II

GRB2: proteína adaptadora envolvida na transdução de sinal

**GTP:** trifosfato de guanosina

HE: hematoxilina/eosina

**HRAS:** pequena GTPase da família RAS (*Harvey rat sarcoma vírus*)

IkB: proteína inibidora do fator nuclear kappa-B

**IKBKB:** gene que codifica para a quinase IKKβ

**IKK**α: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade alfa.

**IKK**β: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta.

**IKK**γ: quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade gama (NEMO).

**Icmt:** enzima isoprenil-cisteina-carboximetiltransferase

IL-1: interleucina-1 citocina pró-inflamatória

**IL-6:** interleucina-6

IL-8: interleucina-8 citocina pró-angiogênica

KD: domínio quinase

**KRAS:** pequena GTPase da família RAS (*Kirsten rat sarcoma vírus*)

**LTβR:** receptor linfotoxina- $\beta$  (*lymphotoxin beta receptor*)

**MEK:** quinase ativadora da MAP quinase

**MET:** transição mesenquimal-epitelial (*mesenchymal-epithelial transition*)

**MMPs:** metaloproteinases de matriz

**MMP-2:** metaloproteinase de matriz 2

**MMP-9:** metaloproteinase de matriz 9

MMP-13: metaloproteinase de matriz 13

mRNA: RNA mensageiro

**mTOR:** proteína quinase (mammalian target of rapamycin)

**NBD:** domínio de ligação a NEMO (*NEMO-binding domain*)

**NEMO:** modulador essencial de NF-kB

**NF-**k**B:** fator nuclear kappa-B

**NIK:** quinase indutora do NF-kB

NRAS: pequena GTPase da família RAS

**NSCLC:** câncer de pulmão de não-pequenas células (non-small cell lung cancer)

**p100:** fator que atua como um inibidor do fator nuclear kappa-B antes de ser clivado em p52

p105: fator de transcrição membro da família NF-kB

**p50:** fator de transcrição membro da família NF-kB

**p52:** fator de transcrição membro da família NF-kB

PI3K: fosfoinositol 3-quinase

**PBS:** tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PKC: proteína quinase C

PLB: tampão de lise passiva

**PLCε:** 1-fosfatidilinositol-4,5-bifosfato fosfodiesterase ε

**RAF:** serina/treonina quinase (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

**REL:** domínio amino-terminal de homologia (*REL homolody domain*)

Rel A/p65: fator de transcrição membro da família NF-kB

Rel B: fator de transcrição membro da família NF-kB

RNA: ácido ribonucleico

**ROS:** espécies reativas de oxigênio

**RTK:** receptores do tipo tirosina quinase

**SCLC:** câncer de pulmão de pequenas células (*small cell lung cancer*)

**SFB:** soro fetal bovino

**siRNA:** pequeno RNA de interferência (*small interference RNA*)

SOS: fator de troca de nucleotídeo de guanina

SDD: hélice-alfa-hélice

**TBS:** solução salina tris-tamponada

TBST: solução de TBS contendo 0,1% Tween

TNF: citocina pró-inflamatória

**TRAF:** fator associado ao receptor de TNF

**ULD:** domínio análogo a da ubiquitina (*ubiquitin-like domain*)

**VEGF:** fator de crescimento endotelial vascular

# **SUMÁRIO**

1.	INTRODUÇÃO	_ 17
	1.1. Câncer de Pulmão	_ 17
	1.2. A pequena GTPase KRAS	21
	1.2.1. Estrutura e Função	
	1.2.2. Regulação da atividade de RAS	
	1.2.3. KRAS e Câncer	
	1.2.4. KRAS como alvo terapêutico direto	
	1.2.4.1. Inibidores de GEFs	
	1.2.4.2. Inibidores específicos de KRAS oncogênica	
	1.2.4.3. Inibição específica de KRAS oncogênica por silenciamento gênico	
	1.2.5. Inibidores de modificações pós-traducionais de RAS	
	1.2.5.1. Inibidores da farnesiltransferase e geranilgeraniltransferase	
	1.2.5.2. Inibidores de RCE1 e ICMT	
	1.2.5.3. Inibidores de palmitoiltransferase  1.2.6. KRAS como alvo terapêutico indireto	
	-	
	1.3. Metástase	
	1.3.1. O papel de KRAS na metástase	_ 41
	1.4. A quinase IKKβ	_ 43
	1.4.1. Estrutura, função e regulação	
	1.4.2. IKKβ e Câncer	
	1.4.3. IKKβ e KRAS	
	1.4.4. O papel de IKKβ na metástase	_ 48
2.	OBJETIVOS	_ 50
	2.1. Objetivo geral	_ 50
	2.2. Objetivos específicos	_ 50
<i>3</i> .	MATERIAIS E PROCEDIMENTOS	_ 51
	3.1 Linhagens Celulares	_ 51
	3.2. Condições de cultura, subcultura e preservação das linhagens celulares _	_ 51
	3.3. Determinação da concentração efetiva de geneticina (G418)	_ 51
	3.4. Geração das linhagens A549-LUC e H358-LUC	_ 52
	3.5. Seleção clonal das células A549-LUC e H358-LUC	
	3.6. Avaliação da atividade de luciferase em luminômetro através de ensaio de luciferase com kit "Luciferase Assay System" (#E1500 Promega)	
	3.7. Inibição farmacológica da quinase ΙΚΚβ	_ 53
	3.8. Silenciamento da expressão gênica mediado por transfecção transiente co siRNAs	
	3.9. Extração e quantificação de RNA	- 54

3.10. Síntese de cDNA	55
3.11. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)	56
3.12. Determinação da concentração e eficiência de primers	
3.13. Western Blot	
3.14. Ensaio de invasão e migração celular transwell	59
3.15. Ensaio de atividade de MMPs	60
3.16. Ensaios de mestátase in vivo	60
3.17. Análise estatística	62
4. RESULTADOS	63
4.1. Validação do efeito do Composto A por Western Blot nas linhager	
4.2. A inibição farmacológica ou por interferência de RNA de IKKβ rode marcadores de metástase analisados por qPCR	eduz a expressão
4.3. Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 através do kit " <i>Biotra System</i> "	•
4.4. Inibição da atividade de IKKβ com Composto A e inibição da exp por interferência de RNA modula a migração celular das células A549 adenocarcinoma pulmonar humano.	de
4.5. Inibição da atividade de IKKβ com Composto A modula a invasão A549 e H358 de adenocarcinoma pulmonar humano	
4.6. Seleção dos clones A549-LUC e H358-LUC através da avaliação d Luciferase	
4.7. Avaliação da presença de metástases em camundongos Balb/c nud injeção do clone A549 pLUC B4 pela veia da cauda com inibição da ex KRAS e IKKβ por interferência de RNA	pressão de
4.8. Inoculação do clone H358 pLUC F1 no flanco para avaliar crescin	nento tumoral 79
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
SÚMULA CURRICULAR	112

# 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão, é o responsável pelo maior número de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo, com cerca de 1.69 milhões de mortes em 2015, segundo dados da World Health Organization (WHO). Esses dados também apontam que o câncer de pulmão é o tipo de câncer com a maior incidência em todo o mundo em 2012, com cerca de 1,8 milhões de novos casos para ambos os sexos (Figura 1.1), e apresenta aumento de 2% por ano na sua incidência mundial (INCA, 2014).

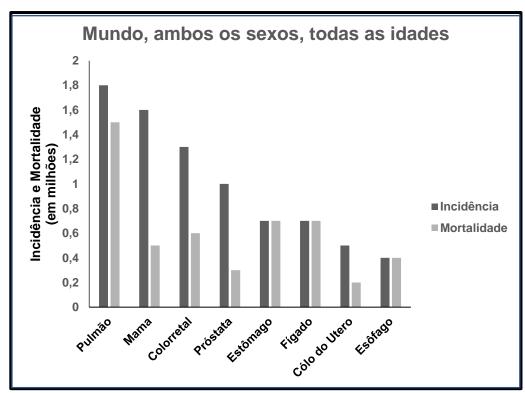


Figura 1.1. Incidência e mortalidade para as principais neoplasias humanas no mundo no ano de 2012. O câncer de pulmão apresentou a maior incidência e foi a principal causa de morte dentre as neoplasias humanas, em ambos os sexos no mundo todo. Adaptado de Organização Mundial da Saúde, 2014 (WHO, 2014).

Dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estimam para o Brasil em 2016-2017 a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer.

Destes casos, o câncer de pulmão é o segundo mais frequente em homens com 8,1% dos casos e o quarto mais frequente em mulheres com 5,3% dos casos. Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,49 casos novos a cada 100 mil homens e 10,54 para cada 100 mil mulheres (**Figura 1.2**).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7.8%		300	Colo do útero	16.340	7.9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%		- 100	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%		- 1	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3.0%		-	Glåndula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linforna não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.2. Ocorrência de casos de câncer em ambos os sexos no Brasil. O número de casos de câncer de pulmão em homens só fica atrás do número de casos de câncer de próstata. Já em mulheres é o quarto maior tipo de câncer incidente em mulheres no Brasil. INCA, 2014.

O câncer de pulmão é classificado em dois grupos: o câncer de células pequenas (Small Cells Lung Cancer – SCLC) e o câncer de células não pequenas (Non-Small Cells Lung Cancer – NSCLC), que é mais frequente, representando 85% dos casos de câncer de pulmão. O NSCLC pode ainda ser subdividido em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (INCA, 2014). O carcinoma de células escamosas é responsável por 30% de todos os casos de câncer de pulmão e se desenvolve na região central, interior dos pulmões ou nos brônquios maiores (American Cancer Society, 2013). O adenocarcinoma pulmonar é o mais frequente, responsável por 40% dos casos e se desenvolve primeiramente nos brônquios periféricos. E por último, o carcinoma de células grandes é responsável por 10% de todos os casos, sendo pouco frequente (Lemjabbar-Alaoui et al. 2015).

O câncer de pulmão é um dos tipos de câncer mais agressivos, possuindo uma razão mortalidade/incidência de 90%. A sobrevida em 5 anos é baixa, cerca de 10% a 15%, possuindo uma variação de 50% quando diagnosticado no estágio menos avançado, até 2% no

estágio mais avançado da doença (**Figura 1.3**). A baixa sobrevida global se deve ao diagnóstico tardio, pois os primeiros estágios da doença geralmente são assintomáticos, ocorrendo o diagnóstico já em estágios mais avançados. Além da dificuldade no diagnóstico precoce, os tratamentos disponíveis são pouco eficazes, geralmente ocasionando a recorrência da doença (**Tan et al, 2003**; **Walter et al, 2015a**; **INCA, 2014**).

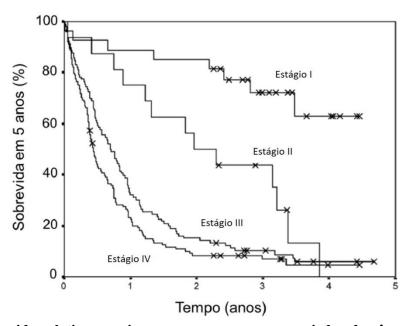
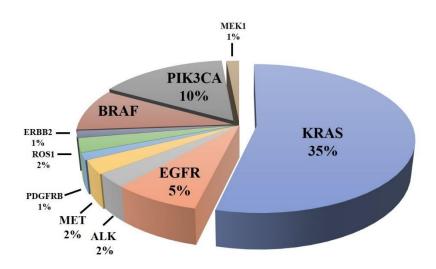


Figura 1.3. Sobrevida relativa em cinco anos para os graus variados de câncer de pulmão a partir do momento do diagnóstico. O curso inicial assintomático da doença leva ao diagnostico tardio. Consequentemente, a grande maioria dos tumores são classificados em estágios III ou IV. A letalidade em cinco anos para o câncer de pulmão aumenta em função da evolução tumoral e resistência ao tratamento, atingindo mais de 95% para casos mais graves da doença. *Modificado de Tan et al*, 2003.

Uma das razões para a alta mortalidade do câncer de pulmão é a ausência, para a maioria dos pacientes, de terapias alvo eficazes. A terapia alvo tem sido uma estratégia poderosa para o tratamento de câncer, que depende da elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desencadeamento e manutenção do fenótipo maligno.

Sabe-se que o NSCLC apresenta mutações que envolvem os genes que regulam a sobrevida e a proliferação celulares, tais como a quinase BRAF, o receptor do tipo tirosina

quinase EGFR e a pequena GTPase KRAS (INCA, 2014; Sharma et al, 2010). Apesar de existirem terapias-alvo para pacientes portadores de mutação em BRAF e EGFR, não existem terapias-alvo para pacientes portadores de mutação em KRAS. Isto é um problema, porque mutações em KRAS são muito frequentes no câncer de pulmão, sendo encontradas em cerca de 35% dos casos (Jang et al., 2009; Riely et al., 2009; Cooper et al, 2013; Boland et al, 2015) (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Mutações que causam o desenvolvimento de NSCLC.** As principais mutações relacionadas ao câncer de pulmão são mutações de ponto em genes que regulam principalmente proliferação celular. A maioria das neoplasias do NSCLC são causadas por mutações em KRAS. *Modificado de Sharma et al, 2010.* 

Apesar da forma mutada de KRAS ser um alvo terapêutico racional, os estudos realizados até hoje no sentido de se inibir a atividade dessa proteína falharam clinicamente, devido a uma alta toxicidade ou a uma inibição incompleta da atividade de Ras (**Friday et al., 2005**; **Saxena et al., 2008**).

Portanto, para que seja possível selecionar melhores alvos terapêuticos para terapia de câncer de pulmão induzido por mutações em KRAS, é extremamente importante o entendimento das vias de sinalização dependentes de KRAS que controlam as características oncogênicas críticas para o crescimento e progressão tumorais.

# 1.2. A pequena GTPase KRAS

KRAS é o integrante mais bem estudado de uma família de pequenas GTPases denominadas RAS, constituída de vários membros, sendo três alterados em neoplasias humanas: KRAS, HRAS e NRAS. As primeiras isoformas da família RAS a serem identificadas foram HRAS e KRAS, através de um estudo de dois vírus causadores de câncer, os vírus dos sarcomas de Harvey e Kirsten (Harvey et al, 1964; Kirsten et al, 1970). Anos após a identificação da família, foi descrita uma forma anormal de uma proteína de 21 kDa expressa em linhagens de células tumorais de cólon e pulmão com alto potencial transformador (Der et al, 1983). Mais tarde, descobriram o gene NRAS, que se encontrava alterado em neuroblastomas (Hall, 1984). Com a descoberta de que 30% das neoplasias humanas são causadas por alterações nos genes RAS, essas proteínas são consideradas essenciais em processos de transformação celular, afetando diretamente crescimento, diferenciação, apoptose, adesão e migração celulares (Esser et al, 1998; Zuber et al, 2000).

# 1.2.1. Estrutura e Função

KRAS é uma pequena proteína de 21 kDa ancorada à membrana plasmática e compartilha 85% de identidade com os outros dois membros da família, HRAS e NRAS. O transcrito primário de KRAS sofre splicing alternativo do exon 4, originando as isoformas KRAS4A e KRAS4B, que possuem extremidades C-terminais diferentes. Os éxons 4A e 4B codificam 39 e 38 aminoácidos, respectivamente. Com isso, embora as 4 isoformas possuam estruturas semelhantes, existem algumas diferenças na funcionalidade. Esse fato é corroborado devido à observação de que certas isoformas oncogênicas são mais comumentes observadas em diferentes tipos de tumores humanos (Castellano; Santos, 2011; Hobbs; Der; Rossman, 2016; Parker; Mattos, 2015), além dos diferentes padrões de expressão, processamento pós traducional e localização subcelular (Nussinov; Tsai; Jang, 2018).

KRAS4A é a isoforma mais semelhante à KRAS retroviral, enquanto que KRAS4B é a isoforma predominantemente expressa em células humanas (Cox et al, 2014). Ocorre uma frequente expressão do mutante oncogênico KRAS4B em alguns tipos de cânceres, sendo eles os adenocarcinomas de pâncreas, colorretal e pulmão (Voice et al., 1999; Prior; Lewis; Mattos, 2012). As proteínas HRAS, NRAS e KRAS4A possuem 188 resíduos de aminoácidos constituintes da sua estrutura primária, enquanto a KRAS4B apresenta 189 aminoácidos.

As proteínas Ras são compostas de dois domínios funcionais, o domínio G catalítico de 166 aminoácidos e um domínio hipervariável composto pelos 24/25 aminoáciodos da região C-terminal (**Figura 1.5**). O domínio G abrange os resíduos 1-164 que são altamente conservados entre as isoformas. Essas regiões conservadas estão envolvidas na interação com o nucleotídeo de guanina e na interação com proteínas que regulam a atividade de RAS.

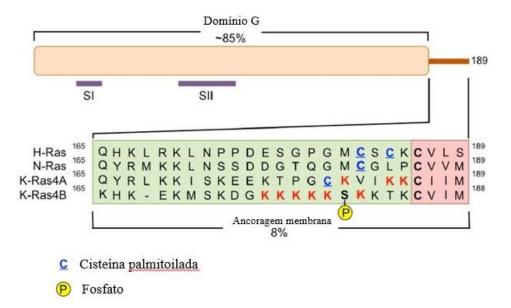


Figura 1.5. As proteínas RAS são compostas de dois domínios funcionais, o domínio G e o domínio de ancoragem à membrana. O domínio G abrange os resíduos 1-164 e inclui as regiões da proteína responsável pela ligação e hidrólise do GTP. Especificamente, o *Switch I* (SI=aminoácidos 30-38) e o *Switch II* (SII=aminoácidos 60-76) são as regiões que sofrem mudança conformacional durante a ciclagem do GDP-GTP. O domínio hipervariável é composto pelos 24/25 resíduos presentes na porção C-terminal. Destes, os primeiros 20-21 aminoácidos exibem a maior diversidade na sequência proteica entre as quatro isoformas de RAS, mas todas contém elementos importantes para associação à membrana como cisteínas (em azul, sublinhado) que sofrem palmitoilação e lisinas (em

vermelho) que promovem associação eletrostática com os lipídeos da membrana. Além disso KRAS4B contém uma serina (181) que pode ser fosforilada e regula a associação desta proteína com a membrana plasmática. Todas as isoformas apresentam o motivo CAAX, compostos pelos quatro resíduos C-terminais, onde C = cisteína, A = qualquer resíduo alifático, e X = aminoácido terminal. Este motivo é reponsável pelo processamento da extremidade C-terminal que culmina com a prenilação da última cisteína, que, por sua vez, é essencial para ancoragem à membrana. *Modificado de Zeitouni*, 2016.

O domínio G é composto de cinco motivos: o motivo G1 (ou *P-loop*) que se liga ao oxigênio do fosfato-β e do fosfato-γ do nucleotídeo de guanina através de uma lisina, o *Switch I* ou motivo G2 (resíduos de aminoácidos 30-38), que é responsável pela interação com proteínas ativadoras de GTPase ("*GTPase activating proteins*", GAPs), que por sua vez são responsáveis por promover a inativação de RAS, o *Switch II* ou motivo G3 (resíduos de aminoácidos 60-76), a qual interage com proteínas trocadoras de nucleotídeos GDP ("*GDP Exchange Factors*", GEFs) responsáveis por promover a ativação de RAS. Já o motivo G4, carrega um aspartato em sua estrutura responsável pela especificidade de ligação à guanina e o motivo G5 auxilia nessa interação (**Vetter, 2001**).

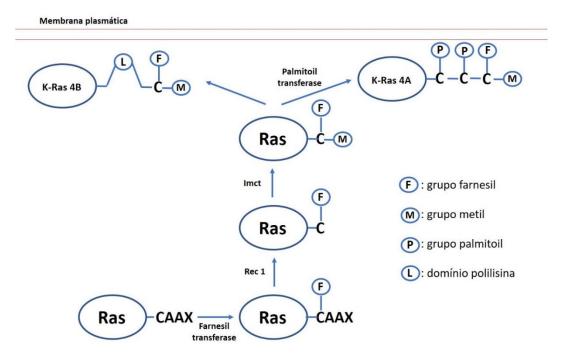
A região hipervariável, é composta pelos resíduos C-terminais. É nesta região que as quatro isoformas de RAS exibem a maior diversidade na sequência de aminoácidos, além de conter elementos importantes para associação da proteína à membrana plasmática, como cisteínas que sofrem palmitoilação e lisinas que promovem associação eletrostática com os lipídeos da membrana (Figura 1.6). Diferentemente das outras isoformas, KRAS4B contém uma serina que pode ser fosforilada e regula a associação desta proteína com a membrana plasmática. Todas as isoformas apresentam o motivo CAAX, compostos pelos quatro resíduos C-terminais, onde C é uma cisteína, A se refere a qualquer aminoácido alifático e X a qualquer aminoácido. Este motivo é reponsável pelo processamento da extremidade C-terminal que culmina com a prenilação da última cisteína, que, por sua vez, é essencial para ancoragem à membrana. (Friday; Adjei, 2005; Gorfe; Grant; Mccammon, 2008; Zeitouni et al., 2016) (Figura 1.6).

A localização de RAS na membrana é essencial para a sua função, mas como essas proteínas são pequenas e hidrofílicas elas sofrem modificações pós traducionais que permitem sua associação com a membrana, sendo este um processo que possui quatro estágios. Primeiramente, as proteínas sofrem prenilação, com a adição de um grupo farnesil à cisteína do motivo CAAX na região C-terminal catalisada pela enzima farnesiltransferase (FTase). Após essa adição do grupo farnesil, a extremidade carboxi-terminal continua sendo processada pela enzima Rce1 localizada no reticulo endoplasmático, que cliva a região terminal AAX, e em seguida, a cisteina terminal farnesilada é metilada pela enzima isoprenil-cisteina-carboximetiltransferase (Icmt) (Wright; Philips, 2006).

Um segundo sinal é necessário para estabilizar as interações entre RAS e a membrana, e em alguns casos, o tráfico para a membrana plasmática (Hancock et al., 1991). A KRAS4B possui uma região rica em lisinas próxima a região carboxi-terminal que interagem eletrostaticamente com a membrana fosfolipidica auxiliando na ancoragem da proteína à membrana, todas as outras isoformas de RAS sofrem palmitoilação dos grupos SH de cisteínas da região carboxi-terminal, pela enzima palmitoiltransferase, o que contribui para a correta ancoragem das proteínas a membrana plasmática (Lobo et al., 2002; Swarthout et al., 2005).

Na presença de um inibidor da enzima farnesiltransferase, um grupo geranilgeranil pode ser adicionado à essa região carboxi-terminal pela enzima geranilgeraniltransferase do tipo I (GGT-1) ou pela geranilgeraniltransferase do tipo II (GGT-2). A GGT-1 reconhece o mesmo motivo CAAX para catalisar a transferência do grupo geranilgeranil. O aminoácido X do domínio CAAX terminal determina o reconhecimento pelas enzimas FTase ou GGT-1, ocorrendo farnesilação ou geranilgeranilação respectivamente (Moores et al., 1991). Na presença do inibidor de farnesiltransferase, KRAS e NRAS são prenilados por GGT-1, sendo que em HRAS isso não ocorre. A enzima GGT-2 reconhece proteínas que possuem dois

resíduos de cisteina carboxi-terminal, e é improvável que desempenhe papel importante na prenilação de RAS (Whyte et al., 1997).



**Figura 1.6. Modificações pós traducionais de RAS.** Todas as proteínas RAS contém o motivo CAAX na região carboxi-terminal, que sofre farnesilação direta do resíduo de cisteína pela farnesiltransferase. Algumas proteínas RAS são também substratos para a geranilgeraniltransferase, quando na presença de um inibidor da farnesiltransferase. A seguir o tripeptídeo terminal AAX é removido pela protease RceI, seguida por metilação do resíduo de cisteína terminal. As proteínas KRAS são diferencialmente modificadas neste ponto, a KRAS4A recebe sofre palmitoilação dos resíduos de cisteína perto da região carboxi-terminal, enquanto KRAS4B utiliza um domínio de polilisina para lozalização eficiente na membrana. *Modificado Friday, Adjei, 2005.* 

### 1.2.2. Regulação da atividade de RAS

As proteínas RAS são ativadas através de sinais a montante (*upstream*), através de receptores celulares como receptores de integrinas, proteínas G heterotríméricas e receptores de citocinas (**Cantrell, 2003**; **Kinbara et al., 2003**). Entretanto, os receptores mais bem estudados, são os receptores do tipo tirosina quinase (RTK), sendo o principal destes receptores, o receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR).

Os receptores RTK são glicoproteínas transmembrana com peso molecular de 170 a 185 kDa. Estruturalmente, possuem um domínio extracelular N-terminal rico em cisteína, que

interage com ligantes, um braço de dimerização, um domínio transmembrana hidrofóbico e um domínio C-terminal citoplasmático intracelular, altamente conservado, com atividade de tirosina quinase (**Ogiso et al., 2002**; **Ferguson et al., 2003**).

A ligação de um ligante ao receptor de EGF induz a sua dimerização, de forma que ocorre a justaposição de seus domínios catalíticos citoplasmáticos e autofosforilação cruzada dos sítios de fosforilação desse receptor, ativando-o (Weiss; Daub; Ullrich, 1997; Seshacharyulu et al., 2012). Após a dimerização e ativação do receptor, proteínas adaptadoras, como Grb2 (do inglês *Growth factor Recptor-Bound protein 2*), são recrutadas. Essas proteínas adaptadoras possuem o papel de recrutar fatores de troca do nucleotídeo de guanina (GEFs) para a membrana plasmática. Várias GEFs são conhecidas, como por exemplo, SOS1 e SOS2, as quais são responsáveis por mediar a ativação de RAS pelos receptores tirosina quinase (Simon; Dodson; Rubin, 1993). As proteínas SOS reconhecem e interagem com o complexo RAS-GDP no domínio *Switch II* promovendo a liberação do GDP. Assim, como consequência, o complexo RAS-GDP é desfeito. Devido ao fato de que a concentração celular de GTP é maior que de GDP, RAS se liga preferencialmente ao GTP, tornando-se ativa (Lowenstein et al., 1992Bos; Rehmann; Wittinghofer, 2007) (Figura 1.7).

Uma vez cessado o sinal, as GEFs deixam de atuar e RAS é inativado através da hidrólise do GTP a GDP. Esta hidrólise é mediada pela própria RAS, que possui atividade GTPásica intrínseca. Entretanto, esta atividade é muito lenta, sendo que é necessária a interação com proteínas ativadoras de GTPase, as GAPs, para que a catálise ocorra de forma eficiente, levando à inativação de KRAS e ao controle do crescimento celular. As GAPs que interagem com RAS-GTP na região *Switch I*, aumentam a velocidade da reação aproximadamente 1.000 vezes (**Prior; Hancock, 2012**).

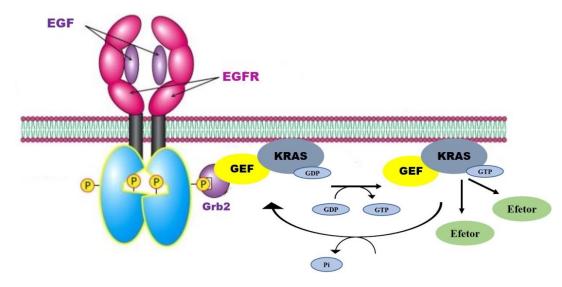
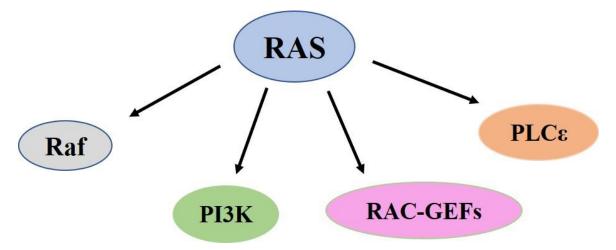


Figura 1.7. Regulação da atividade de KRAS mediada via receptor tirosina quinase. Um sinal externo, representado por EGF é reconhecido pelo receptor tirosina quinase, induzindo sua dimerização e autofosforilação. Esse processo recruta a proteína acessória Grb2, que interage com as GEFs. Uma vez ativadas, as GEFs reconhecem a forma inativa de KRAS ligada a GDP e induzem a troca do nucleotídeo de guanina. Em sua forma ativa ligada a GTP, KRAS interage com seus efetores cujas funções estão relacionadas a processos a proliferação e sobrevida celular. Quando o sinal externo cessa, as GAPs interagem com KRAS ligada a GTP e promovem a hidrólise do GTP a GDP. Quando isto ocorre, a ativação dos efetores é interrompida e um novo ciclo é iniciado.

RAS apresenta dois resíduos de aminoácidos no seu sitio catalítico importantes para a catálise enzimática, sendo eles uma gluamina no códon 61 e uma tirosina no códon 35, responsáveis diretamente pela hidrólise do GTP. As GAPs possuem o papel de fornecer um terceiro aminoácido, a arginina, que é fundamental para acelerar o processo de catálise do GTP. As GAPs fornecem esse dedo de arginina para que ocorra um melhor posicionamento do GTP e dos aminoácidos presentes no sitio catalítico, com isso aumentando a atividade GTPásica de RAS (Kotting et al., 2008).

Após sua ativação, as proteínas RAS desencadeiam uma cascata de sinalização a jusante (*downstream*) através de efetores específicos. São diversos os efetores moleculares ativados por RAS, sendo estes relacionados com diversas funções celulares como proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevida e angiogênese. Dentre as vias mais conhecidas ativadas por RAS estão PI3K/AKT, RAC-GEFs, PLCɛ/PKC, RAF/MEK/ERK,

entre outras. O número de efetores descritos na literatura tem aumentado cada vez mais fazendo com que a regulação dessas vias se torne cada vez mais complexa (Figura 1.8) (Shields et al., 2000; Castellano e Downward, 2011).



**Figura 1.8. Vias efetoras conhecidas de RAS.** Uma vez em sua forma ativa ligada a GTP, RAS consegue interagir com várias famílias de proteínas efetoras, cujas principais estão descritas aqui, resultando em estimulação da sua atividade. *Modificado de Downward*, 2003.

# 1.2.3. KRAS e Câncer

As proteínas RAS mutadas são responsáveis pela origem e manutenção do fenótipo maligno em diversos tipos de tumores, ocorrendo em aproximadamente 30% dos canceres humanos. RAS sofre mutações oncogênicas em regiões que codificam o domínio de interação com as GAPs, os códons 12 e 13, os quais codificam glicinas que são importantes para o reconhecimento de RAS-GTP pelas GAPs. Quando mutados esses códons impedem que esse reconhecimento ocorra fazendo com que RAS permaneça constantemente ativa. Já o domínio catalítico da GTPase possui um resíduo de glutamina, que está envolvida na hidrólise do GTP, esse resíduo é codificado pelo códon 61. A mutação neste códon leva a substituição desse resíduo de glutamina, o que causa a perda da capacidade catalítica de RAS, apesar dessa perda, RAS continua a ser reconhecido pelas GAPs, o que não é suficiente para a hidrólise do GTP levando também a ativação constitutiva de RAS. Seja por perda da atividade enzimática ou perda da interação proteína-proteina, as mutações nos códons 12, 13 e 61, levam ao

bloqueio da hidrólise do GTP, estabelecendo uma ativação constante da proteína e impossibilitando o bloqueio da sinalização, mesmo na ausência de sinais externos. Esta ativação constitutiva causa proliferação celular descontrolada, transformação maligna e desenvolvimento tumoral (Macaluso et al., 2002; Mascaux et al., 2005; Quinlan; Settleman, 2008; Jang et al., 2009) (Figura 1.9).

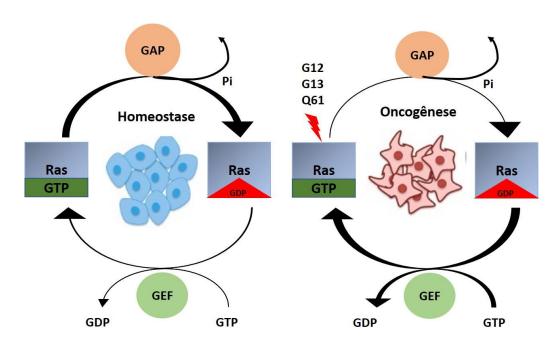


Figura 1.9. O mutante de KRAS está continuamente em um estado ativo ligado ao GTP. KRAS normal cicla entre um estado ativo, ligado ao GTP e inativo, ligado ao GDP. A) Em condições normais, a KRAS é ativada pelas GEFs, as quais facilitam a troca do GPD por GTP, levando a ativação de KRAS. Esta ativação é transiente, pois é contrabalançada pela ação das GAPs, que são capazes de promover a hidrólise do GTP à GDP levando à inativação de KRAS. B) As mutações nos resíduos G12, G13 ou Q61 ativam KRAS constitutivamente, impedindo a formação de interações de van der Waals entre RAS e RASGAPs (G12 e G13) ou interferindo na posição de uma molécula de água necessária para a hidrólise do GTP (Q61), respectivamente. Neste caso a ativação é permanente, pois não é contrabalançada pela inativação. A espessura da flecha e o tamanho dos símbolos para GEFs e GAPs indicam o nível de sinalização. *Modificado de Zeitouni, 2016*.

Apesar das isoformas de Ras estarem mutadas em 30% dos tumores humanos, as mutações não são distribuídas uniformemente entre as isoformas. A isoforma KRAS4B é a que apresenta maior prevalência de mutações, encontrando-se alterada em aproximadamente 90% dos tumores pancreáticos, 30% a 40% de tumores colorretais e de 15% a 20% dos tumores pulmonares (**Tabela 1.1**). As mutações em NRAS são menos frequentes, mas

ocorrem em 15% a 25% de melanomas cutâneos e em 10% dos pacientes com leucemia mieloide aguda. Mutações em HRAS, a isoforma menos comum, são raras(**Singh; Longo; Chabner, 2015**).

**Tabela 1.1. Frequência de mutações em RAS em cânceres humanos**. *Modificado de Singh; Longo; Chabner, 2015*.

Tipo de câncer/sitio do tumor	KRAS	NRAS	HRAS
Pâncreas	90	0,5	
Colon	34,6	4	0,6
Pulmão	16,5	0,6	0,5
Intestino	22,6	0,7	<del>-</del>
Peritoneal	29	<u>-</u>	_
Estômago	6,2	1	1,3
Esôfago	2	_	0,6

Diversos trabalhos demonstraram que mutações em KRAS são responsáveis pelo desenvolvimento de um fenótipo maligno.KRAS foi primeiramente descrita como a forma celular do agente transformador do vírus de sarcoma Kirsten (Chang et al., 1982). Outros estudos posteriores demonstraram que a expressão da forma ativa da KRAS em camundongos é suficiente para causar uma transformação neoplásica e o aparecimento de tumores (Chan et al., 2004; Tuveson et al., 2004; Vitale-Cross et al., 2004; Raimondi et al., 2006; Carrière et al., 2009). Além disso a eliminação da atividade de KRAS através do bloqueio da expressão ou através da expressão de formas dominante-negativas, é capaz de reverter células malignas para um fenótipo não maligno (Fleming et al., 2005). Finalmente, a alta prevalência das mutações em KRAS dentro de um amplo espectro de neoplasias sugere que a KRAS desempenha um papel central no desenvolvimento do fenótipo maligno (Puig et al., 2000; Arvanitakis et al., 2004). Com isso, estudos mais atuais já demonstraram que mutações em

KRAS estão associadas a um comportamento agressivo e pior prognóstico de carcinoma de tireóide (Garcia-Rostan et al., 2003), adenocarcinoma colorretal (Andreyev et al., 2001; Krtolica et al., 2007) e câncer de pulmão (Mascaux et al., 2005).

# 1.2.4. KRAS como alvo terapêutico direto

Dada a importância de KRAS para o fenótipo maligno, utilizar KRAS como um alvo terapêutico é uma estratégia racional que deveria trazer benefícios clínicos. Porém, as terapias que visam inibir diretamente a atividade biológica de RAS falharam em ensaios clínicos, devido a uma alta toxicidade ou a uma inibição incompleta da atividade de RAS (Friday; Adjei, 2005; Saxena et al., 2008). Uma das dificuldades do desenvolvimento de inibidores diretos é que RAS possui uma alta afinidade pelo GTP. Além disso existe um número limitado de sítios de ligação acessíveis que foram identificados através de abordagens computacionais, mas esses sítios não parecem conferir estabilidade de ligação a pequenas moléculas candidatas, o que explica a dificuldade em desenvolver inibidores específicos de RAS (Spoerner et al., 2001; Buhrman et al., 2011; Chakrabarti et al., 2016). Entretanto algumas abordagens para inibição de RAS já foram exploradas, como será descrito a seguir.

### 1.2.4.1. Inibidores de GEFs

Uma estratégia interessante para a inibição direta de KRAS seria a inibição das GEFs ou a ativação das proteínas GAPs. Em estudos realizados anteriormente, a estrutura tridimensional do complexo RAS:GEF foi descrita (Boriack-Sjodin et al., 1998) e alguns grupos de pesquisas conseguiram identificar moléculas que conseguem se ligar próximo ao sítio de interação deste complexo, interferindo na ativação de RAS *in vitro* (Maurer et al., 2012; Sun et al., 2012). Além disso, alternativas para promover o estado inativo de KRAS mutante pelo aumento da atividade das GAPs, através do desenvolvimento de pequenas moléculas também foi estudado. No entanto, o desenvolvimento de moduladores de GAP é

um desafio, pois as mutações oncogênicas alteram o sitio ativo de KRAS, e agentes que estimulam atividade são mais difíceis de serem desenvolvidos do que compostos inibitórios (Scheffzek et al., 1997).

# 1.2.4.2. Inibidores específicos de KRAS oncogênica

Uma abordagem elegante foi descrita recentemente para inibição direta da atividade de KRAS mutante, mas apenas para tumores com mutação RAS<sup>G12C</sup>, pois baseia-se em modificações covalentes do resíduo de cisteína mutante. Moléculas pequenas derivadas de acrilamida ou sulfonamidas vinílicas se encaixam em uma cavidade próxima à cisteína 12 e reagem com o grupo tiol, modificando este resíduo covalentemente de forma irreversível. Com isso, há um aumento na preferência de KRAS por GDP (Vasan; Boyer; Herbst, 2014). Outros trabalhos utilizam um análogo de GTP, que é capaz de se ligar especificamente a KRAS<sup>G12C</sup> no sitio de ligação do nucleotídeo de guanina. Esse análogo liga-se covalentemente nesta região, impedindo a ativação de KRAS (Burns et al., 2014). Recentemente um grupo publicou um outro estudo utilizando um composto com alta seletividade para KRASG12C denominado de ARS-1620, esse composto foi capaz de induzir regressão do tumor in vivo. Este estudo forneceu evidencias in vivo de que a mutação em KRAS pode ser seletivamente alvejada e sugere que o ARS-1620 possa ser um representante de uma nova geração de inibidores específicos para a mutação KRASG12C com um potencial terapêutico promissor (Janes et al., 2018). No entanto, os efeitos clínicos desses inibidores ainda não foram testados, além do que estes inibidores específicos não beneficiariam pacientes portadores de outras mutações oncogênicas em KRAS. Embora, a mutação KRAS<sup>G12C</sup>, represente 52% dos casos de mutações, sendo a mutação mais frequente em NSCLC, (Cox et al., 2014; Wang; Wang, 2015), outras mutações são encontradas nestas neoplasias e predominam em outros tipos de câncer. Por exemplo, no câncer de pâncreas a mutação mais frequentemente encontrada é a KRAS<sup>G12D</sup> (Cox et al., 2014).

# 1.2.4.3. Inibição específica de KRAS oncogênica por silenciamento gênico

Com base na inibição direta da expressão proteica de RAS foram descritas duas estratégias, sendo uma baseada no uso de oligonucleotídeos antisenso e a outra em RNA de interferência. A estratégia de inibição com oligonucleotídeos já demonstrou possuir um efeito antitumoral in vitro e in vivo (Gray et al., 1993; Zhang et al., 1993; Duursma; Agami, 2003). Mas apesar de possuir um efeito antitumoral várias sequências antisenso foram desenvolvidas e testadas, porém nenhuma obteve sucesso do ponto de vista clínico (Friday et al., 2005). Já a segunda abordagem que consiste no uso de RNAs de interferência (siRNA, do inglês small interference RNA). Esse método consiste na diminuição da síntese da proteína KRAS, usando moléculas de RNA de dupla fita capazes de parear com a sequência do RNA mensageiro alvo, com isso bloqueando a tradução do mRNA em proteína. Estes siRNAs podem ser administrados nas células através de uma transfecção lipossomal. Testes in vitro demonstraram uma redução na oncogenicidade (Valentino et al., 2012; Wang et al., 2013) e na tumorigenicidade in vivo (Wang et al., 2014; Zeng et al., 2015). Através de modelos celulares com expressão estável de KRAS<sup>G12V</sup>, foi observado uma perda de função específica de KRAS<sup>G12V</sup> gerando um menor crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade (Brummelkamp et al., 2002). Entretanto o progresso com esse método é limitado devido ao sistema de entrega desses siRNAs. Um teste clínico foi iniciado em pacientes com câncer de pâncreas com mutação KRAS<sup>G12D</sup>. Os pacientes foram tratados com siKRAS<sup>G12D</sup> através de injeção intratumoral, porém, ainda não se obteve sucesso na clínica, pois o maior desafio é garantir o endereçamento correto do siRNA às células tumorais in vivo (Burnett et al 2011).

Embora alguns estudos já demonstraram estratégias promissoras para a inibição direta de KRAS, essas estratégias são especificas para um tipo único de mutação oncogênica, ou

então com difícil sucesso clínico. Portanto, atualmente as estratégias existentes para inibição direta de KRAS não demonstraram eficácia significativa.

# 1.2.5. Inibidores de modificações pós-traducionais de RAS

Uma das estratégias para inibição de KRAS é inibir sua ancoragem à membrana, envolvendo diversas transferases e proteases (farnesil transferase, geranilgeranil transferase, RCE1 e Icmt) sendo as modificações pós-traducionais fundamentais para ativação de RAS. Foram estudadas várias formas de impedir a atividade de KRAS através da inibição da sua ancoragem à membrana.

# 1.2.5.1. Inibidores da farnesiltransferase e geranilgeraniltransferase

Os primeiros inibidores desenvolvidos da farnesiltransferase foram os Lonafarnib e Tipifarnib, os quais foram eficazes em testes pré-clínicos, mas demonstraram pouca eficácia em testes clínicos com pacientes portadores da mutação em KRAS (Adjei et al., 2003; Kim et al., 2005). Um outro inibidor de segunda geração da FTase, denominado de Salirasib, demonstrou resultados promissores *in vitro* e em modelos murinos, mas falhou nos ensaios clínicos em pacientes com câncer de pulmão (Rotblat et al., 2008; Riely et al., 2011). A falha na utilização desses inibidores acontece devido à prenilação alternativa de KRAS pelas geranilgeraniltransferases, tornando possível o ancoramento da GTPase na membrana (Whyte et al., 1997). Como consequência dessa prenilação alternativa, foi estudada a possibilidade de uma inibição dupla da FTase e GGT1ase. Lobell et al (2001) avaliou essa inibição dual e observou a morte dos camundongos após 72h da administração das drogas, indicando que houve toxicidade e que essa abordagem seria incompatível com testes clínicos. Já em 2002, um inibidor para as duas transferases denominado L-778,123, estudado pelo mesmo grupo,

foi eficaz em inibir a ação da FTase e parcialmente da GGT1, porém não se obteve sucesso em inibir KRAS (**Lobell et al., 2002**).

### 1.2.5.2. Inibidores de RCE1 e ICMT

Outra abordagem seria a inibição de RCE1 e ICMT, enzimas que atuam após a ação da FTase e GGT1. Vários inibidores foram desenvolvidos e demonstraram resultados promissores *in vitro* e em modelos murinos, mas é necessária uma otimização adicional antes que essas drogas entrem em estudos clínicos (**Bergo et al., 2004**). Por exemplo, em estudo feito com modelos de células hematopoiéticas de camundongos, a expressão de KRAS<sup>G12D</sup> associada à inibição de ICMT reduz a transformação mediada por KRAS (**Wahlstrom et al., 2008**); por outro lado, a inibição de RCE1, piorou o distúrbio mieloproliferativo (**Wahlstrom et al., 2007**).

### 1.2.5.3. Inibidores de palmitoiltransferase

A palmitoilação acontece no processamento de HRAS, NRAS E KRAS4A (**Resh, 2004**), mas não ocorre em KRAS4B (**Jackson et al., 1994**). Um estudo recente demonstrou que a inibição da palmitoilação reduz o crescimento de células hematopoiéticas que expressam NRAS oncogênica (**Xu et al., 2012**). Entretanto, a maioria dos tumores humanos mediados por RAS são causados por mutações em KRAS4B (**Cox et al., 2014**).

Com isso, concluímos que a inibição de modificações pós-traducionais de RAS pode ser muito específica para apenas alguns tipos de tumores ou demonstrou ser tóxica para as células, pois esses mecanismos de prenilação são utilizados por outras proteínas em diversos tecidos, e a dose necessária para que aconteça a inibição da ancoragem de RAS é alta, o que pode afetar outros alvos das transferases.

### 1.2.6. KRAS como alvo terapêutico indireto

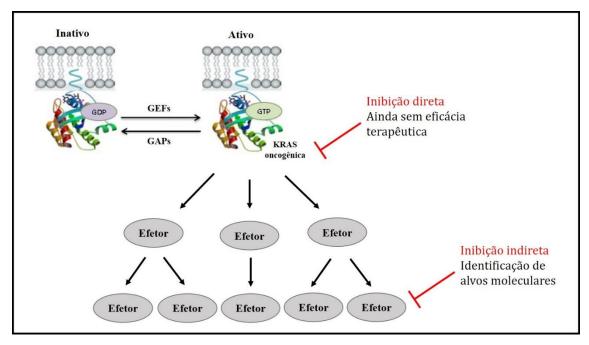
Uma vez que não foi obtido sucesso na abordagem direta, uma maneira alternativa é inibição indireta de KRAS através da inibição de suas vias efetoras. A inibição indireta de KRAS através de seus efetores também é um desafio, sendo que KRAS regula diversos efetores responsáveis pelo fenótipo maligno. Os efetores mais estudados da via de KRAS são PI3K, mTOR, BRAF e MEK. PI3K faz parte da via PI3K/AKT/mTOR, sendo este um local de convergência de diversas vias, portanto a sua regulação é muito complexa. Novos inibidores de PI3K (BKM120, GDC0941 e XL147) foram desenvolvidos e demonstraram resultados iniciais promissores (Bendell et al., 2012). Eles estão atualmente sendo testados em ensaios clínicos em pacientes com NSCLC que possuem mutação em PI3K. No entanto, embora a atividade oncogênica de KRAS exija atividade de PI3K, dados anteriores sugerem que os tumores com mutação em KRAS são insensíveis aos inibidores exclusivos de PI3K (Dan et al., 2010; Gupta et al., 2007; Ihle et al., 2009).

mTOR é uma serina/treonina quinase localizada *downstream* de PI3K na via PI3K/AKT/mTOR. Testes pré-clinicos demonstraram que a inibição de mTOR inibe o crescimento de tumores em camundongos com adenocarcinoma pulmonar com mutação em KRAS (**Wislez et al., 2005**). Vários inibidores de mTOR tem sido investigados para o tratamento de NSCLC com resultados promissores (**Gridelli; Maione; Rossi, 2008**).

Outra serina/treonina quinase, ativada via MAPK, que interage diretamente com KRAS ligado a GTP é BRAF. Inibidores de BRAF, o dabrafenib e vemurafenib, específicos para tumores com mutação em BRAF, foram investigados pela primeira vez em pacientes com melanoma. Atualmente, não há dados sobre a atividade desses inibidores contra tumores que não possuem mutação em BRAF, nem sua sensibilidade para NSCLC induzido por KRAS (Sosman et al., 2012; Planchard et al., 2016;).

Portanto, considerando que o sucesso dos estudos com os efetores *downstream* de KRAS são limitados, o detalhamento das vias ativadas por KRAS e a identificação de alvos

regulados por KRAS que contribuem para um fenótipo maligno, serve de fundamento teórico para o desenvolvimento de novas terapias-alvo, mais seguras e eficientes que possam levar a um sucesso terapêutico (**Figura 1.9**).



**Figura 1.10. Inibição de KRAS via efetores downstream**. A identificação de novos alvos de KRAS, potencialmente exploráveis como alvos terapêuticos indiretos.

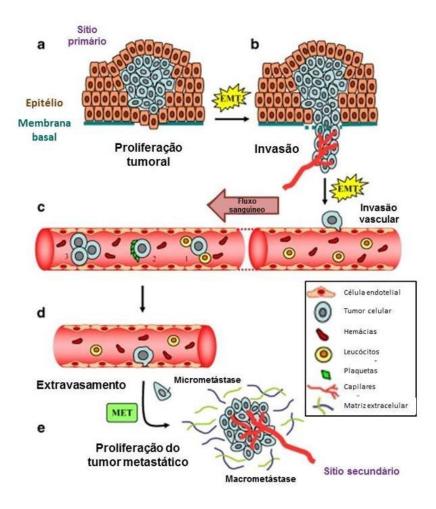
Portanto, para que seja possível selecionar melhores alvos terapêuticos para terapia de câncer de pulmão, será preciso identificar os mediadores induzidos por KRAS, que controlam as características oncogênicas críticas para o crescimento e progressão tumorais.

### 1.3. Metástase

Uma das características importantes na oncogênese é a aquisição de capacidade metastática tumoral. Esta capacidade é importante, porque na grande maioria dos casos a morbidez associada ao câncer é causada pela doença metastática, que tem uma relação direta com um pior prognóstico. Desta forma, a inibição da capacidade metastática tumoral constitui uma importante estratégia terapêutica, que pode resultar em um aumento significativo de sobrevida.

A metástase é um processo que consiste na disseminação de células cancerígenas provenientes de um tumor primário, que conseguem se estabelecer e crescer em um outro local. A metástase é a principal causa de morbidade e mortalidade por câncer, sendo responsável por cerca de 90% das mortes por câncer. A distribuição do tumor e o crescimento no local secundário não é uma questão de acaso, mas sim determinado pela dependência das "sementes" (células cancerígenas) do "solo adequado" (o órgão alvo para metástase) como proposto pelo cirurgião inglês Stephen Paget em 1889 (Damsky; Theodosakis; Bosenberg, 2014).

A metástase consiste de uma sucessão complexa de uma série de eventos celulares e biológicos denominada "cascata invasão-metástase". Essa cascata envolve o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), saída de células metastáticas do tumor primário (perda de adesão e migração), invasão através da membrana basal (BM) e matriz extracelular (ECM) adjacente do tumor, invasão da BM do endotélio de vasos sanguíneos e linfáticos locais, intravasamento das células metastáticas para o interior dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, adesão das células metastáticas circulantes no endotélio de capilares do órgão alvo, invasão dessas células através da camada de células endoteliais e BM adjacente (extravasamento), e finalmente o estabelecimento e crescimento de tumores no local do órgão alvo (Figura 1.11) (Daenen et al., 2011; Hu et al., 2012).



**Figura 1.11.** As etapas do processo metástico. a) Proliferação do tumor primário. b) Invasão local de algumas células provenientes do tumor primário. c) Intravasamento dessas células em um capilar e sobrevivência dessas células tumorais na circulação sanguínea. 1. Interação com leucócitos. 2. Agregação com plaquetas, as quais protegem as células contra mecanismos de estresse e leucócitos. 3. Agregação célula-célula capaz de proteger contra estresse. d) Adesão e extravasamento para o órgão alvo. e) Estabelecimento de micrometástases e posterior desenvolvimento de macrometástases. *Modificado Gout; Huot, 2008.* 

Sob circunstâncias normais, células endoteliais e epiteliais sofrem apoptose quando perdem adesão, um fenômeno denominado de *anoikis* (Sakamoto; Kyprianou, 2010). Células epiteliais normais requerem ligação à ECM para sobreviver. Portanto, células metastáticas desenvolvem um mecanismo de resistência à anoikis. Essa resistência junto com algumas outras alterações de propriedades das células tumorais (como mudanças de adesão célula-célula ou célula-matriz, polaridade celular, e propriedades invasiva e migratória) são coletivamente conhecidos como transição epitelial-mesenquimal (EMT) (Alizadeh; Shiri;

Farsinejad, 2014). Especificamente, as células epiteliais são transformadas de células altamente diferenciadas, polarizadas e organizadas em células indiferenciadas, isoladas e semelhantes a células mesenquimais, com propriedades migratórias e invasivas (Profumo; Gandellini, 2013). Curiosamente a EMT nas células tumorais é transitória. Antes que uma célula metastática se estabeleça e cresça, ela precisa reverter seu fenótipo mesenquimal para um fenótipo mais epitelial, essa conversão é conhecida como transição mesenquimal-epitelial (MET) (Profumo; Gandellini, 2013).

Nem todas as células de um determinado tumor primário são capazes de metastatizar (Eccles; Welch, 2007). Os quatro passos essenciais do processo metastático (perda de adesão, migração, invasão e adesão) são distintos entre si, mas também inter-relacionados. Por exemplo, a migração celular envolve perda de adesão e invasão celular, enquanto a invasão envolve migração e adesão. A compreensão desses quatro passos e seu papel na metástase ajuda a entender o processo e identificar pontos para intervenção.

Um dos pontos do processo importantes é a adesão celular, que não é apenas uma maneira de ligar células ou ligar células com a matriz, mas é também um mecanismo que ativa vias de proliferação e sobrevivência através de interações de receptores do tipo integrinas com moléculas *downstream* que são essenciais para função de motilidade e sobrevivência (Alizadeh; Shiri; Farsinejad, 2014). Os receptores do tipo integrinas são membros de uma família de glicoproteínas responsáveis pela adesão da célula à ECM (Alizadeh; Shiri; Farsinejad, 2014). O domínio extracelular se liga a moléculas de ECM, como fibronectina, laminina, colágeno, fibrinogênio e vitronectina, enquanto o domínio intracelular está ligado ao citoesqueleto através de aderências focais intracelulares (FAs) formadas por mais de 150 proteínas diferentes (Bravo-Cordero; Hodgson; Condeelis, 2014). As FAs também ativam vias de sinalização intracelulares e são estruturas dinâmicas que se montam, dispersam e reciclam durante a migração celular (Li; Feng, 2011; Alizadeh;

Shiri; Farsinejad, 2014). As vias de sinalização ativadas por integrinas promovem a síntese de ciclinas e lipídeos inositol, assim como ativam FAK (quinase de adesão focal) e MAPK (Schlaepfer; Jones; Hunter, 1998; Alizadeh; Shiri; Farsinejad, 2014). As integrinas também facilitam o processo metastático por degradação proteolítica da BM através da ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) (Brooks et al., 1996; Deryugina et al., 1997), que são as principais proteases responsáveis por degradar ECM durante a metástase.

MMPs são uma família de endopeptidases zinco-dependentes capazes de clivar a BM e todos os constituintes da ECM. As MMPs são produzidas por diferentes células do microambiente tumoral, incluindo células endoteliais, leucócitos, macrófagos, fibroblastos e as próprias células tumorais. Elas são sintetizadas como enzimas inativas e são ativadas fora das células por outras MMPs ou serina proteases. As MMPs consistem em pelo menos 26 proteases e são subdivididas em quatro grupos: colagenases, gelatinases, estromelisinas e matrilisinas. O papel dessas MMPs na metástase é basicamente a clivagem da ECM, mas além disso seus alvos também envolvem receptores de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, ligantes apoptóticos e fatores angiogênicos que contribuem para os estágios da progressão tumoral (Alizadeh; Shiri; Farsinejad, 2014).

Apesar do exposto acima, o processo de metástase ainda não é completamente compreendido e alvos terapêuticos antimetastáticos permanecem pouco explorados.

### 1.3.1. O papel de KRAS na metástase

Interessantemente, a KRAS oncogênica promove não só a iniciação tumoral, mas também vem sendo implicada na promoção de um fenótipo metastático (**Pylayeva-Gupta et al., 2011**; **Chan; Chen, 2012; Uekita et al., 2014**). KRAS não só controla a formação de metástases colorretais (**Smakman et al., 2005; Zhu et al., 2014**), mas também induz processos celulares associados a um aumento da capacidade invasiva, como a EMT (**Liu et al., 2009; Liu et al., 2009**; Liu et al., 2009; Liu et

2015; Polyak; Weinberg, 2009), a autofagia (Lock et al., 2014) e a aquisição de um fenótipo tronco tumoral (Liu et al., 2009; Kim et al., 2010).

Além destes processos, outro fator necessário para formação e o crescimento de metástases é a capacidade angiogênica tumoral. Alguns trabalhos vêm demonstrando como as formas oncogênicas das RAS GTPases induzem angiogênese tumoral. Sparman e Bar-Sagi (2004) demonstraram que a forma oncogênica de HRAS era capaz de induzir a angiogênese tumoral através da indução de secreção de IL-8. Este mecanismo angiogênico também é induzido pela GTPase KRAS. Bassères e col. (2010) demonstraram, em células pulmonares, que a IL-8 é um dos fatores mais fortemente induzidos por KRAS. Recentemente, um estudo demonstrou que linhagens celulares de câncer de pulmão apresentando mutações oncogênicas em KRAS apresentam superexpressão de IL-8 e a inibição da atividade de IL-8 com anticorpos anti-IL-8 promove uma diminuição na proliferação e na migração dessas células (Sunaga et al., 2014). Interessantemente a IL-8 também já foi implicada em promover metástase (Luppi et al., 2007).

Consistente com o papel de KRAS na progressão tumoral, mutações em KRAS estão associadas a um comportamento agressivo e pior prognóstico de carcinoma de tireóide (Garcia-Rostan et al., 2003), adenocarcinoma colorretal (Andreyev et al., 2001; Krtolica et al., 2007) e câncer de pulmão (Mascaux et al., 2005).

Apesar destas evidências, o papel de KRAS e de alvos terapêuticos que afetam a progressão tumoral induzida por KRAS na promoção e regulação do fenótipo metastático em câncer de pulmão permanecem pouco explorados.

Neste trabalho propomos a identificação de alvos terapêuticos que inibam a metástase tumoral induzida pelo oncogene KRAS no pulmão. A nossa hipótese é que a quinase IKKβ promove a capacidade mestastática tumoral induzida por KRAS no pulmão.

Para embasar esta hipótese, descreveremos a seguir a estrutura e função biológica da IKKβ, seu papel no câncer e metástase e sua relação com a KRAS oncogênica.

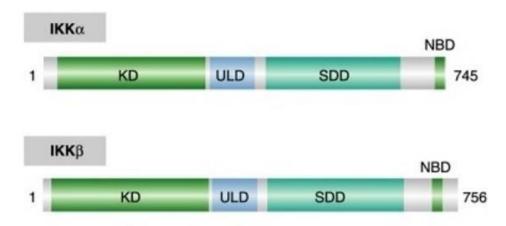
### 1.4. A quinase IKKβ

A quinase IKKβ foi identificada como membro de um complexo multiproteico de alto peso molecular (700 a 900 kDa), denominado complexo IKK, que é composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997), e uma subunidade regulatória denominada NEMO ou IKKγ (Mercurio et al., 1997; Rothwarf et al., 1998). Este complexo é responsável pela ativação do fator de transcrição *nuclear factor-κB* (NF-κB), que por sua vez, regula genes envolvidos na inflamação e câncer (Li; Withoff; Verma, 2005; Sen; Baltimore, 1986), sendo conhecido por regular moléculas inflamatórias como moléculas de adesão, quimiocinas, ciclooxigenase (COX-2), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), metaloproteinases de matriz (MMPs), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), todos envolvidos também no desenvolvimento de tumores.

### 1.4.1. Estrutura, função e regulação

As subunidades catalíticas do complexo IKK (IKKα e IKKβ) são codificadas por dois genes CHUK e IKBKB, respectivamente. A quinase IKKα (*inhibitor of κB kinase α*, IKK1 ou CHUK, do inglês *conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*) possui 745 aminoácidos com 85 kDa, e a quinase IKKβ (inhibitor of κB kinase β; ou IKK2) possui 756 aminoácidos e peso molecular de 87 kDa. Ambas as enzimas possuem um domínio N-terminal de quinase (**Delhase et al., 1999; Hayden; Karin, 1999; Ghosh, 2004**), um domínio de dimerização e um domínio C-terminal de ligação a IKKγ chamado de domínio NBD (*NEMO-binding domain*), com isso ambas as quinases compartilham cerca de 50% de homologia em sua sequência (**Figura 1.11**). IKKβ possui um domínio análogo a ubiquitina (ULD, *ubiquitin-like* 

domain), que é crítico para sua atividade funcional. Se ocorrer uma mutação ou deleção em ULD ocorre uma inativação catalítica de IKKβ, enquanto que uma deleção da região equivalente em IKKα não afeta a atividade dessa quinase (**May et al., 2004**).



**Figura 1.12. Esquema dos domínios funcionais de IKKα e IKKβ.** Os números se referem a posição dos aminoácidos. Os domínios são: KD: domínio quinase, ULD: domínio ubiquitin-like, SDD: hélicealfa-hélice, NBD: domínio de ligação a NEMO. *Modificado de Hinz e Scheidereit*, 2014.

Em geral, o complexo IKK pode ser ativado através de três processos: (I) fosforilação direta de uma das suas subunidades catalíticas, (II) trans-autofosforilação, e (III) mudança conformacional induzida por modificações pós-traducionais nas subunidades (**Hacker**; **Karin**, 2006). As quinases IKKα e IKKβ não são bioquimicamente equivalentes. Experimentos *in vitro* demonstraram que IKKβ é o alvo primordial de estímulos pró-inflamatórios (**Delhase et al., 1999**) sendo fosforilado nos resíduos Ser177 e 181.

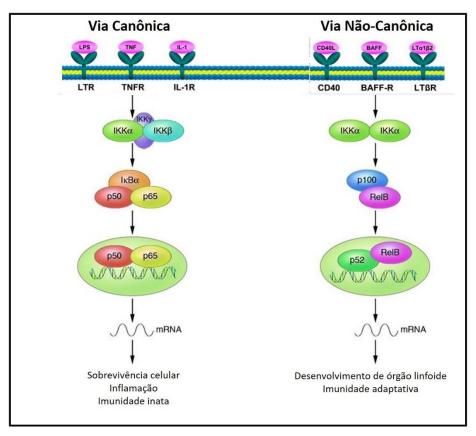
O complexo IKK é o ponto central na integração de vias responsáveis pela ativação do fator de transcrição NF-κB. Em mamíferos, a família do NF-κB é composta de cinco membros: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) e p52/p100 (NF-κB2). Cada uma destas proteínas contém um domínio amino-terminal de homologia REL (RHD, do inglês *REL homolody domain*), que permite localização nuclear, ligação ao DNA, homo e heterodimerização. As proteínas p65, RelB e c-Rel possuem domínios de ativação da transcrição, enquanto que p50 e p52 não possuem. Os precursores p105 e p100 possuem

repetições de anquirinas na região carboxi-terminal, que são clivadas proteoliticamente para produzir as subunidades ativas p50 e p52, respectivamente (**Hayden**; **Ghosh**, **2004**).

Essas subunidades associadas formam heterodímeros ou homodímeros e regulam a expressão de genes alvo dependentes de NF-κB (**Karin**; **Greten**, **2005**; **Luo**; **Kamata**; **Karin**, **2005**). Sob condições normais, as subunidades do NF-κB se encontram retidas no citoplasma através de associação com proteínas inibitórias κB (IκB) (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBNS) (**Ghosh**; **Karin**, **2002**; **Hayden**; **Ghosh**, **2004**).

Mais de 15 caminhos já foram relatados para a ativação de NF-κB, mas as duas vias mais comuns são a via canônica (clássica) e a via não-canônica (alternativa) (Figura 1.12) (Gupta et al., 2010). A via canônica ativa p105/p50 e depende de IKKβ, enquanto a via nãocanônica ativa p100/p52 e depende de IKKα (**Dejardin, 2006**). A ativação da via canônica ocorre através de estímulos como: produtos bacterianos, expressão viral, citocinas próinflamatórias, como TNF e IL-1, fatores de crescimento e sinais de estresse celular, como danos ao DNA e espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes estímulos ativam o complexo IKK e, em seguida, a IKKβ fosforila IκBα em dois resíduos conservados na região Nterminal, Ser32 e 36. A fosforilação de ΙκΒα desencadeia a poliubiquitinação de ΙκΒα mediada por E2- e E3-ligases, e subsequente degradação de IκBα pelo proteassomo (26S) (Karin; Neriah, 2000). A degradação de ΙκΒα libera os dímeros de NF-κΒ (principalmente p65/p50) da interação inibitória permitindo sua translocação para o núcleo, onde regula a expressão de genes alvo dependentes de NF-κB (Beg; Baltimore, 1996; Chow et al., 1999; Hayden; Ghosh, 2008; Hinz; Scheidereit, 2014), que incluem fatores anti-apoptóticos, citocinas, como IL-6, e fatores de proliferação, como ciclina D1. Além disso, a subunidade p65 do NF-κB sofre uma série de modificações pós-traducionais, incluindo a fosforilação em Ser 536 por IKK, que é necessária para a atividade completa do NF-kB (Chaturvedi et al., 2011).

A ativação da via alternativa ocorre através de sinais de desenvolvimento, como BAFF (*B-cell activating factor*), CD40 (*cluster of diferentiation 40*) e LTβR (*lymphotoxin beta receptor*) (**Dejardin et al., 2012**). Estes sinais levam à ativação de NIK (*NF-κB inducing kinase*) por meio de TRAF (*TNF receptor-associated factor*), que ativa dímeros de IKKα que fosforilam p100. Este, por sua vez age como um IκB, mantendo RelB no citoplasma. Após a fosforilação, p100 é clivado em p52, o qual forma o dímero RelB/p52 que se acumula no núcleo e leva a transcrição de seus genes alvo (**Figura 1.12**) (**Coope et al., 2002**).



**Figura 1.13.** As vias canônica (clássica) e não-canônica (alternativa) IKK/NF-κB. A via canônica é envolve a ativação de IKKβ levando a fosforilação e degradação de IκBs. A via não-canônica envolve IKKα e leva a fosforilação e processamento de p100, gerando o heterodímero p52/RelB.

Como podemos perceber, devido ao seu papel central na via de sinalização do NF-κB, e o conhecido papel deste fator de transcrição em neoplasias humanas (**Bassères e Baldwin**, **2006**), o complexo IKK tem sido alvo para a terapia do câncer. Sabe-se que as quinases

relacionadas com o complexo IKK desempenham um papel crucial na promoção da transformação, sobrevivência e proliferação de células cancerígenas.

### 1.4.2. IKKβ e Câncer

A primeira associação do NF-κB com câncer veio quando a subunidade c-Rel foi identificada como o homólogo de v-Rel (Wilhelmsen; Eggleton; Temin, 1984; Kieran et al., 1990) que é o gene de transformação da estirpe T de retrovírus de aves (REV-T) (Gilmore, 1999). Desde então, descobriu-se que a subunidade c-Rel desempenha um papel importante em vários tipos diferentes de câncer, incluindo linfoma, de mama e pancreático (Gilmore; Gerondakis, 2011; Hunter; Leslie; Perkins, 2016). A subunidade Rel-A/p65 é necessária para a transformação induzida por oncogenes como Bcr-Abl (Reuther; Cortez; Pendergast; Baldwin, 1998) e RAS (Finco et al., 1997). Sendo a quinase IKKβ necessária para a ativação canônica de NF-κB, estando envolvida na oncogênese mediada por NF-κB, IKKβ também contribui para a transformação maligna e para a manutenção do fenótipo maligno por mecanismos independentes de NF-κB. Quando ativado por IKKβ, o NF-κB regula a transcrição de genes que codificam para proteínas que estão envolvidas em invasão e metástase (MMP-2 e MMP-9), transcrição epitelial-mesenquimal (vimentina, MMP-2, MMP-13), angiogênese (IL-8, IL-6, IL-1, VEGF), entre outros (Bassères; Baldwin, 2006).

Diferentes estudos demonstraram que a quinase IKKβ desempenha um papel importante na oncogênese. Greten et al. (2004) demonstraram que a inibição da expressão da IKKβ impede a tumorigênese em um modelo animal de câncer de cólon (Greten et al., 2004). Além disso, a inibição farmacológica da IKKβ induz apoptose em células leucêmicas (Frelin et al., 2005), bem como inibe o crescimento de células de mieloma *in vitro* e *in vivo* (Hideshima et al., 2006). Estudos com inibição genética da IKKβ em modelos de câncer de pâncreas e pulmão demonstraram uma inibição da capacidade de crescimento tumoral

associada a alterações do microambiente tumoral e a uma redução da proliferação celular (Ling et al., 2012, Xia et al., 2012). Finalmente, Bassères e col. (2014) mostraram que o tratamento de um modelo animal de câncer de pulmão com um inibidor altamente específico para a IKKβ (Composto A) diminui o crescimento tumoral, reduzindo a proliferação celular e também reduzindo a progressão tumoral para graus histológicos mais avançados. Consistente com estes resultados, através de uma análise em banco de dados usando COSMIC, foi determinado que IKKα e IKKβ apresentam expressão aumentada em diferentes tipos de câncer (Forbes et al., 2015; Slotta et al., 2018), sendo IKKβ superexpresso em câncer de intestino, esôfago e pulmão.

### **1.4.3.** IKKβ e KRAS

Já se sabe que em tumores induzidos por KRAS a via IKK/NF-κB é extremamente importante. Primeiramente, foi visto que KRAS oncogênica ativa o NF-κB através da quinase IKKβ para promover a tumorigênese pulmonar (Bassères et al., 2010) e que a inibição genética de IKKβ inibe a tumorigênese mediada por RAS (Yang et al., 2010; Ling et al., 2012; Xia et al., 2012).

O mecanismo molecular pelo qual KRAS ativa a IKKβ ainda não foi muito bem elucidado. **Duran et al. (2008)** demonstraram que esta via depende da ativação de uma proteína adaptadora denominada p62 com consequente poliubiquitinação de TRAF6, seguida da ativação do complexo IKK. Com isso, ficou evidenciado de que IKKβ pode ser ativado indiretamente por KRAS.

Estes estudos demonstraram a relevância de IKKβ na formação tumoral induzida por KRAS, mas a sua importância na metástase induzida por KRAS ainda é desconhecida.

### 1.4.4. O papel de IKKB na metástase

Como mencionado anteriormente, a ativação do NF-κB está associado a diversas propriedades oncogênicas, incluindo a aquisição de um fenótipo metastático. Já foi visto que o NF-κB é capaz de promover a angiogênese e metástase em certos modelos tumorais, potencialmente através da regulação de VEGF e MMPs (Baldwin, 2001; Karin et al., 2002). A expressão da forma super-repressora de IκBα em melanoma humano e células de câncer de ovário se correlaciona com redução da expressão de VEGF e IL-8 e bloqueia crescimento, angiogênese e metástase de xenoenxertos tumorais (Huang et al., 2000). Além disso, a inibição de NF-κB pela superexpressão de IκBβ em células de câncer de pulmão suprime a habilidade de formar metástase (Jiang et al., 2001).

Sabe-se que, não só a ativação do NF-κB por KRAS em células pulmonares requer a quinase IKKβ (Bassères et al, 2010), e Bassères et al, 2014 demonstraram que a inibição de IKKb em um modelo de câncer de pulmão induzido por KRAS, não só inibe o crescimento tumoral, mas também reduz a angiogênese e a progressão para graus histológicos mais avançados, carcaterísticas associadas à capacidade mestastática. Além disso, através de um modelo de câncer de mama foi visto que a ativação de NF-κB dependente de IKKβ é essencial para que aconteça a EMT e consequentemente disseminação metastática (Huber et al., 2004).

Apesar destes estudos, não existem relatos na literatura demonstrando uma ligação direta entre a IKK $\beta$  e a aquisição de capacidade metastática em câncer de pulmão induzido por KRAS.

### 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Investigar o papel da quinase IKKβ na capacidade invasiva e metastática de células pulmonares portadoras da forma oncogênica da KRAS, promovendo embasamento científico para o desenvolvimento de novas terapias-alvo no câncer de pulmão.

### 2.2. Objetivos específicos

- **1.** Determinar como a inibição da expressão da quinase IKKβ afeta a migração e invasão de células portadoras de mutações em K-Ras *in vitro*;
- **2.** Determinar como a inibição da expressão da quinase IKKβ afeta a capacidade metastática de células portadoras de mutações em KRAS *in vivo*;

### 3. MATERIAIS E PROCEDIMENTOS

### 3.1 Linhagens Celulares

Foram utilizadas duas linhagens celulares disponíveis comercialmente:

- a) linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano, designada A549 (ATCC CCL-185; KRAS<sup>G12S</sup> em homozigose);
- b) linhagem celular de carcinoma bronquioalveolar pulmonar humano, designada  ${\rm H358~(ATCC~CRL\text{-}5807;~KRAS^{G12C}\,em~heterozigose);}$

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

As linhagens celulares A549 e H358 parentais foram cultivadas em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O2 e 5% de CO2 à temperatura de 37°C.

Após a geração das linhagens A549-LUC e H358-LUC (ver item 3.4), o cultivo foi feito em RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% de SFB e 0,6 mg/mL de geneticina (G418). Esta concentração de geneticina foi determinada em ensaios de curva de morte celular (ver item 3.3).

Todas as linhagens celulares foram subcultivadas sempre que atingiam 80% de confluência, utilizando-se solução de tripsina 0.25% (w/v) diluída em PBSA, adicionada de EDTA 0.53mM.

### 3.3. Determinação da concentração efetiva de geneticina (G418)

Células A549 e H358 parentais foram testadas para a determinação da concentração efetiva de geneticina para posterior seleção. Foram testadas concentrações de 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 mg/mL de geneticina por 10 dias, com troca a cada 3 dias para determinar a menor concentração capaz de matar todas as células não resistentes à geneticina (0,6 mg/mL). Essa concentração foi, posteriormente, utilizada no processo de seleção clonal, para gerar as células que possuem o vetor para expressão de luciferase.

### 3.4. Geração das linhagens A549-LUC e H358-LUC

As linhagens A549-LUC e H358-LUC, que expressam luciferase estavelmente, foram geradas através da transfecção das linhagens A549 e H358 com o vetor de expressão pGL4.51[luc2/CMV/Neo] Vector (Promega). Foram plaqueadas 5x10<sup>5</sup> células/poço de H358 e A549 em placas de 6 poços em meio RMPI 10%. No dia seguinte, o meio foi retirado, as células lavadas 2x com PBS e adicionado 1mL de meio RPMI sem soro fetal bovino. Em seguida, foi misturado 7,5 μl do reagente *lipofectamine 3000* (Thermofisher) com 2,5 μg do plasmídeo obtido e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, o conjunto DNA/*lipofectamine 3000* foi adicionado ao poço contendo as células e deixados a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte foi adicionado aos poços meio RPMI 10% SFB com 0,6 mg/ml de geneticina (G418). Após duas semanas as células que sobreviveram foram submetidas ao protocolo de seleção clonal com G418 de acordo com as recomendações do fabricante. Para controle negativo, estas linhagens foram transfectadas com o vetor vazio pGL4.17[luc2/Neo] (promega).

### 3.5. Seleção clonal das células A549-LUC e H358-LUC

As células A549 e H358 obtidas na etapa descrita anteriormente foram plaqueadas na quantidade de 1 célula por poço em placa de 96 poços, a fim de se obter células aderidas de forma individual, e mantidas em meio de cultura RPMI, contendo 10% de SFB, a 37°C e 5% CO2, adicionado de geneticina 0,6 mg/mL. A cultura foi mantida até o aparecimento de colônias celulares isoladas, que foram posteriormente expandidas e testadas quanto à eficiência da atividade de luciferase.

# 3.6. Avaliação da atividade de luciferase em luminômetro através de ensaio de luciferase com kit "Luciferase Assay System" (#E1500 Promega)

Para realizar esse ensaio primeiramente foi feito o preparo do lisado das células A549-LUC e H358-LUC com o tampão de lise passiva (PLB) específico do kit. As células foram lavadas ainda na placa p100 mm, 2x com PBS, e adicionou-se 1 ml de PLB. Os lisados obtidos foram submetidos a 1 ciclo de congelamento à -20 °C, por 10 min e por fim o lisado foi centrifugado à 15000 rpm, por 30 segundos à temperatura de 4°C.

O reagente do kit, "Luciferase Assay Reagent" é preparado em temperatura ambiente para o uso. O reagente foi adicionado no injetore do luminômetro *SpectraMax L*, de acordo com as especificações do aparelho. Foi adicionado 20 µL do lisado de células a placa p96 branca, a qual foi colocada no luminômetro para iniciar a leitura de acordo com o protocolo de leitura específico do kit.

### 3.7. Inibição farmacológica da quinase IKKβ

Para inibir a atividade da quinase IKKβ, nós usamos o inibidor Composto A (CmpdA), que tem como alvo específico a quinase IKKβ (**Zigelbauer et al., 2005**). As concentrações utilizadas variam com os experimentos e estão sempre indicadas nas legendas das figuras.

### 3.8. Silenciamento da expressão gênica mediado por transfecção transiente com siRNAs

A inibição transiente da expressão de KRAS e IKKβ nas linhagens pulmonares A549 e H358 foi realizada utilizando-se um pool contendo 5 siRNAs (Dharmacon siGenome Smart Pool siRNA Design®) para a KRAS humana (siKRAS, Dharmacon cat# M-005069-00) ou para a IKKβ humana (siIKKβ, Dharmacon, cat #M-003545-10). Como controle negativo, as células foram transfectatadas com um siRNA sem homologia a genes humanos conhecidos (non-targeting control siRNA ou siCtrl – catalogo D-001210-03-05 #3). Para tanto, foram plaqueadas 1x10<sup>5</sup> células A549 e 2x10<sup>5</sup> células H538, por poço em placas de 6 poços em meio RMPI 10% SFB. No dia seguinte, o meio foi retirado, as células lavadas 2x com PBS e adicionado 1mL de meio RPMI sem soro fetal bovino. Em seguida, 5µL do siRNA pool 2µM foi misturado com 4µL do reagente de transfecção Lipofectamine TM 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, Cat. 3000015) e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Nesse intervalo, o meio foi retirado da placa, as células lavadas com PBS, e foram adicionados 1,6 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro feral bovino em cada poço. Por fim, 400 μL do mix de siRNA + Lipofectamine foi adicionado a cada poço contendo as células e as mesmas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO2. Em seguida foi adicionado 1mL de meio RPMI 10% SFB. Para os ensaios de migração, invasão e extração de RNA e proteína as células foram coletadas de 48-72h após a transfecção e para o ensaio de atividade de MMPs as células foram coletadas após 96h.

### 3.9. Extração e quantificação de RNA

Para todos os ensaios que envolveram a extração de RNA de células previamente tratadas de acordo com o modelo experimental adotado, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 60mm à confluência de  $1x10^5$  células por placa e mantidas em cultura pelo tempo de tratamento adequados. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e a placa foi lavada com solução de PBS, sem adição de cátions divalentes, por

duas vezes. A seguir, a cada placa foi adicionado 1mL de TRI Reagent® (Life Technologies, Cat. # AM9738). Após homogeneização, as placas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e, a seguir, os lisados celulares obtidos foram centrifugados à velocidade de 12000g por 10 minutos à temperatura de 4°C. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 200 uL de clorofórmio. Cada tubo foi mantido à temperatura ambiente por 15 minutos, e, a seguir, foram centrifugados à velocidade de 12000g por 10 minutos à temperatura de 4°C. Após a obtenção de uma suspensão trifásica, coletou-se a fase que continha RNA em suspensão e adicionou-se 500uL de isopropanol, com o objetivo de precipitar o RNA do restante da suspensão. A seguir, tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados à velocidade de 12000g por 8 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1mL de uma solução de etanol 75% e centrifugado à velocidade de 7500g por 5 minutos à temperatura de 4°C. O etanol foi, então, removido e o precipitado de RNA foi deixado secar brevemente à temperatura ambiente. A dissolução do RNA foi feita em água ultrapura (Millipore, MilliQ System) e a concentração da solução foi determinada por meio de sua absorbância a 260nm em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Como controle de qualidade da extração, foram aceitáveis os valores de concentração de RNA acima de 1000 ng. µL-1 e razões 260/280 e 260/230 com valores próximos a 2 e entre 2,0 e 2,2, respectivamente.

### 3.10. Síntese de cDNA

Para síntese do cDNA, 1 μg de RNA total tratado com DNase 1 (Invitrogen, cat#18047019) foi submetido à transcrição reversa com SuperScriptTM III (Invitrogen cat# 18080093). Para 1 μg de RNA tratado com DNAse 1, foram adicionados 1 μL de iniciadores randômicos (Invitrogen, cat# N8080127, *random hexamers* 50 ng/μL) e 1 μL de tampão de anelamento (*Annealing Buffer*), completando com água para um volume final de 8 μL. Os tubos foram

incubados no termociclador Mastercycler gradient AG22331 (Eppendorf®) a 65°C por 5 minutos e depois colocados em gelo imediatamente. Em seguida, foram adicionados aos tubos, ainda no gelo, 10 μL de mistura de reação de primeira fita 2x (2x First-Strand Reaction Mix) e 2 μL de SuperScript III. As amostras foram agitadas delicadamente e incubadas a 25°C por 10 minutos, em seguida a 50°C por 50 minutos e, finalmente, a 85°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso.

### 3.11. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

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

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

Tabela 3.1. Sequências dos pares de primers *forward* (Fw) e *reverse* (Rv) utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Gene alvo	Primers		
MMP-2	SeqFw: 5' – TGGCTACACACCTGATCTGG – 3'		
	SeqRv: 5' – GAGTCCGTCCTTACCGTCAA – 3'		
MMP-9	SeqFw: 5' - TCTTCCCTGGAGACCTGAGA – 3'		
	SeqRv: 5' – TTTCGACTCTCCACGCATCT – 3'		
FAK	SeqFw: 5' – GCAATAGTGAGCCAACCACC – 3'		
	SeqRv: 5' – ACTGAGGCGGAATCCATAGC – 3'		
GAPDH	SeqFw: 5' – GAGCCGCATCTTCTTTTGC – 3'		
	SeqRv: 5' – CCATGGTGTCTGAGCGATGT – 3'		
ACTB	SeqFw: 5' - GGCACCCAGCACAATGAAG – 3'		
(β-Actina)	SeqRv: 5' – CCGATCCACACGGGAGTACTTG – 3'		
ІККβ	SeqFw: 5'-GCCCTTCCTCCCCAACTG -3'		
	SeqRv: 5'- TCTTCTGCCGCACTTTTGAA -3'		
KRAS	SeqFw:5'- CCCAGGTGCGGGAGAGA -3'		
	SeqRv:5'- CAGCTCCAACTACCACAAGTTT - 3'		

### 3.12. Determinação da concentração e eficiência de primers

Para determinação da concentração ideal de cada par de *primers* a serem utilizados na reação de PCR em tempo real foram testadas as concentrações de 200, 400, 600 e 800nM. A concentração utilizada foi a menor concentração que apresentou curva de dissociação com somente um pico e não apresentou variação do ciclo *threshold* quando comparado às maiores concentrações analisadas.

Para determinação da eficiência de cada par de *primers*, após a determinação da concentração ótima, foi realizada uma reação de PCR em tempo real com diluições de cDNA nas proporções 1:15, 1:30, 1:60, 1:120 e 1:240. Os resultados dos ciclos *threshold* foram então relacionados à concentração do cDNA correspondente, gerando um gráfico. O coeficiente angular da equação de reta gerada foi utilizado para calcular a eficiência de cada par de *primers*, de acordo com a equação a seguir:

Ef = 
$$10^{(-1/a)}$$
  
Ef (%) = (Ef – 1) x 100%

### 3.13. Western Blot

5x10<sup>5</sup> células A549 ou H358 foram plaqueadas em placas de 60mm em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% SFB. No dia seguinte, as células foram tratadas com 0,1% DMSO (controle) e Composto A 5µM por 30 minutos, lavadas com PBS, lisadas com 200 μL de tampão RIPA (1% IGEPAL, 1% SDS, 50 mM Tris pH = 7,5, 150 mM NaCl e 0,5% desoxicolato de sódio) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (1/100) e transferidas para tubos de 1,5 mL. As soluções foram sonicadas por 10 segundos e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). 50 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra 5x, incubadas por 10 min a 90-100 °C e submetidas a fracionamento vertical em gel de poliacrilamida-SDS 10% (SDS PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. A membrana foi então corada com Ponceau para confirmar a transferência. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em solução contendo 5% de leite desnatado em TBS (50 nM Tris-Cl, 150 nM NaCl, pH = 7,6) contendo 0,1% Tween (TBST). Anticorpos primários foram utilizados de acordo com a tabela abaixo (Tabela 4.2). Os anticorpos primários foram diluídos em solução 2,5% BSA em TBST contendo 0,05% de azida sódica e os anticorpos secundários foram diluídos a 1/5000 em solução 5% leite desnatado em TBST (Tabela 4.3). A membrana foi incubada com o anticorpo primário overnight, lavada por 10 min com TBST por três vezes, incubada com o anticorpo secundário por 1 hora, lavada com TBST e revelada por reação de quimioluminescência. A detecção das bandas marcadas foi realizada através do equipamento ChemiDoc MP Imaging System (BioRad®).

Tabela 3.2. Anticorpos primários utilizados nos experimentos de Western Blot.

Anticorpo Primário	Número do catálogo	Fabricante	Diluição	Anticorpo Secundário
Fosfo-IκBα <sup>Ser32</sup>	#2859	Cell Signaling	1:1000	Coelho
ΙκΒα	#9242	Cell Signaling	1:1000	Coelho
Fosfo-p65 <sup>Ser536</sup>	#3033	Cell Signaling	1:1000	Coelho
p65	#3034	Cell Signaling	1:1000	Coelho
ΙΚΚβ	#2684	Cell Signaling	1:1000	Coelho
panRAS	OP40	Merck Millipore	1:1000	Camundongo
GAPDH	sc-25778	Santa Cruz	1:1000	Camundongo
α-Tubulina	#2144	Cell Signaling	1:1000	Coelho

Tabela 3.3. Anticorpos secundários utilizados nos experimentos de Western Blot.

Anticorpo Secundário	Número do catálogo	Fabricante	Diluição
Coelho (HRP anti-rabbit)	W4011	Promega	1:5000
Camundongo (HRP anti- mouse)	W4021	Promega	1:5000

### 3.14. Ensaio de invasão e migração celular transwell

As células H358 foram silenciadas para KRAS e IKKβ e como controle utilizamos o siRNA controle (siCtrl), como mencionado no item 3.8. E após 72h de silenciamento as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspendidas em meio RPMI livre de soro. No caso do tratamento das células com o inibidor farmacológico de IKKβ Composto A (CmpdA), as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspendidas em meio RPMI livre de soro após 24h de tratamento. Após ambos os tratamentos as células foram adicionadas a parte superior das câmaras bipartidas do tipo *Transwell*, utilizando câmaras com poros de 8 μM em placa de 24 poços (Corning, 3422) revestidas (ensaio de invasão) ou não (ensaio de migração) com matrigel. Na parte inferior da câmara foi adicionado meio RPMI suplementado com 10%

SFB, com o intuito de estimular a migração/invasão das células presentes na parte superior da câmara. Após 24-48h horas de incubação, a câmara superior de invasão foi delicadamente invertida, para remoção do conteúdo (células que não migraram/invadiram e meio de cultura). Em seguida, as células que migraram/invadiram (presentes na parte inferior da câmara), foram fixadas em paraformoldeído 4% em PBS, coradas com solução de cristal violeta. Imagens da membrana foram adquiridas em aumento de 4X para determinar o número de células que migraram através de contagem do número de células e área ocupada pelo software Imaje J.

### 3.15. Ensaio de atividade de MMPs

Para a realização deste ensaio foram utilizados kits colorimétricos "Biotrak Activity Assay System" – GE Healthcare Life Sciences. A atividade da enzima MMP foi quantificada usando um peptídeo específico cromogênico como substrato. Os padrões e as amostras foram incubados em poços de microplacas pré-revestidas com anticorpo anti-MMP (MMP2 ou MMP9). Dependendo do anticorpo, a MMP2 ou MMP9 presente nas amostras foi ligada aos poços, outros componentes da amostra que não são MMPs foram removidos através de uma etapa de lavagem e aspiração. O substrato foi adicionado e a atividade da MMP quantificada em espectrofotômetro em Absorbância de 405 nm. A concentração de MMP ativa nas amostras foi determinada por interpolação com uma curva padrão especifica do kit utilizado com concentrações conhecidas de MMPs.

#### 3.16. Ensaios de mestátase in vivo

Foram utilizados camundongos nude (Balb/c), de 4 semanas, provenientes do Biotério Central da FMUSP, os quais foram gerados e mantidos no Biotério de Produção e Experimentação da FCF/IQ-USP e manipulados de acordo com protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Química da USP.

As linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano H358 pLUC clone F1 e A549 pLUC clone B4 (ambas portadoras da forma oncogênica da KRAS), com e sem a inibição da expressão de KRAS e com e sem a inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA, foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultura sem soro e mantidas em gelo até o momento da inoculação no animal. Cada animal foi inoculado na cauda com 0.1 ml da suspensão de células (contendo 1x10<sup>6</sup> células), após assepsia do local com etanol 70%. O monitoramento das metástases nos animais foi por in vivo imaging através do equipamento IVIS Spectrum. O monitoramento teve início 50 dias após a inoculação das células. Quinze minutos antes da realização do monitoramento, os animais foram anestesiados com isofluorano (1-3%) e foi injetado por via intraperitoneal o substrato D-Luciferina (150 mg/Kg em 1X PBS). Os animais foram sacrificados após 120 dias por exsanguinação. Para tanto, os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de Avertina (250mg/kg usando uma solução 1.25%). O estabelecimento da anestesia foi monitorado por ausência de reflexo ao "toe pinch" a ser realizado com uma pinça. Uma vez a anestesia estabelecida, foi feita a abertura da cavidade peritoneal seguida da ressecção da veia porta, que permitirá a exsanguinação pela porção inferior do corpo. Em seguida abrimos a caixa torácica e fizemos a perfusão pulmonar com paraformaldeído 4% através do uso de uma bomba peristáltica. Os tecidos fixados foram envoltos em parafina e seccionados a uma espessura de 5 micrômetros. As amostras de tecido foram então coradas com hematoxilina/eosina para avaliação da presença de micrometástases não detectáveis pelo aparelho de imageamento.

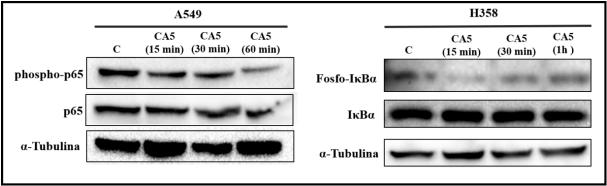
### 3.17. Análise estatística

Todos os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão ou através de imagens representativas de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Prism 6* (*GraphPad Software*, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças entre os grupos foram determinadas por testes de amostras pareadas, como *t-student* e análise da variância (ANOVA). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas que tiveram valor de p $\leq$ 0,05.

### 4. RESULTADOS

### 4.1. Validação do efeito do Composto A por Western Blot nas linhagens A549 e H358

Nos experimentos mostrados a seguir, nós utilizamos um inibidor altamente específico para a quinase IKKβ, denominado Composto A (**Ziegelbauer et al., 2005**). Nós validamos o efeito deste inibidor por Western Blot através da avaliação da atividade de seus alvos como p65 e IκBα e p65 que são alvos de IKKβ. De fato, o tratamento de células da linhagem A549 e H358 com Composto A diminui a fosforilação de p65 e IκBα, indicando uma diminuição na atividade da quinase IKKβ (**Figura 4.1**)

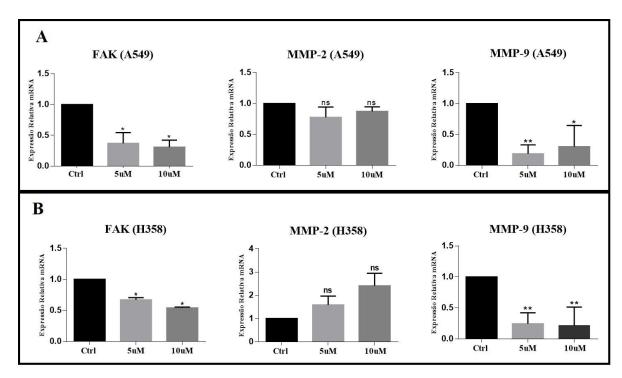


**Figura 4.1. Validação da inibição farmacológica de IKKβ por Composto A.** 5x10<sup>5</sup> células da linhagem A549 e H358 foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com 0,1% DMSO (C), 5 μM de Composto A (CA5) por 15, 30 e 60 minutos e lisadas para extração de proteínas. 50μg de proteínas totais foram utilizadas e avaliadas por Western Blot para a atividade de IKKβ. Os anticorpos utilizados estão indicados do lado esquerdo de cada figura.

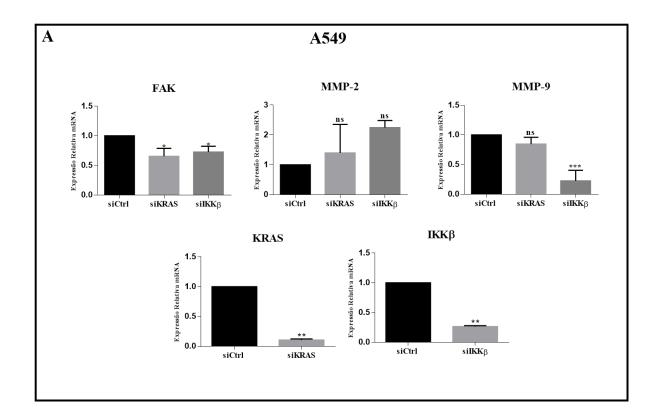
### 4.2. A inibição farmacológica ou por interferência de RNA de IKKβ reduz a expressão de marcadores de metástase analisados por qPCR

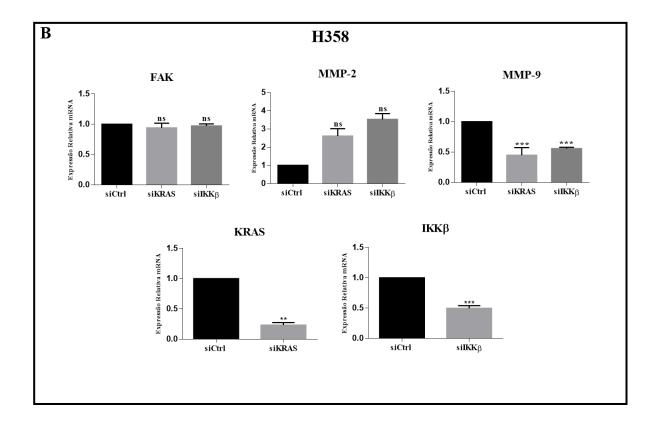
Diversas moléculas essenciais para que o processo de metástase ocorra desempenham um papel no processo invasivo e migratório de células tumorais. Dentre as várias moléculas existentes, decidimos estudar três delas que são essenciais ao processo, sendo elas as metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 e a quinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*). MMP-2 e MMP-9 pertencem a uma família de enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco, que estão envolvidas em vários processos na progressão do câncer, incluindo

angiogênese, invasão e metástase (Hadlr-Olsen; Winberg; Uhlin-Hansen, 2013). As MMPs são capazes de degradar as proteínas da matriz extracelular, bem como regular a atividade de outras proteinases, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e receptores celulares (Nagase; Visse; Murphy, 2006). FAK é uma quinase com um importante papel na sinalização mediada por integrinas (Zhao; Guan, 2009; Brami-Cherrier et al., 2014). Dessa forma, para avaliar se a quinase ΙΚΚβ modula a expressão de MMP-2, MMP-9 e FAK nas células de adenocarcinoma pulmonar humano, nós tratamos as células A549 e H358 com composto A nas concentrações de 5 e 10 µM por 24 horas e avaliamos a expressão destes genes por PCR quantitativo. A inibição farmacológica de IKKB reduziu a expressão de genes relevantes para o contexto do fenótipo metastático, como FAK e MMP-9, sugerindo que IKKβ desempenha um papel importante na manutenção das propriedades desse fenótipo, sendo observado um comportamento semelhante em ambas as linhagens. Entretanto não houve diminuição na expressão de MMP-2 com ambas as concentrações de composto A (Figura 4.2). Para corroborar estes dados, nós analisamos também a expressão desses genes nas mesmas linhagens após a inibição de KRAS e IKKβ por interferência de RNA. A inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduziu a expressão dos genes FAK e MMP-9 na linhagem A549, sendo que a inibição de KRAS reduziu apenas a expressão de FAK. Já na linhagem H358, a inibição da expressão de KRAS e IKKβ por interferência de RNA reduziu a expressão do gene MMP-9 (Figura 4.3 A e B), mas não de FAK. Nós usamos Western Blotting para validar a inibição de IKKB e KRAS por interferência de RNA, e observamos que a inibição foi eficiente em ambos os casos. Interessantemente, a inibição da expressão de IKKβ (downstream de KRAS) leva também à diminuição da expressão de KRAS (Figura 4.3C).



**Figura 4.2.** A inibição farmacológica de IKKβ em células A549 e H358 reduz a expressão dos genes FAK e MMP-9. Células (A) A549 e (B) H358 foram tratadas com 5 μM ou 10 μM de Composto A por 24 horas. Posteriormente, a expressão gênica de FAK, MMP-2 e MMP-9 foi analisada por qPCR. (Ctrl) 0,1% DMSO. Realizado o teste estatístico ANOVA em que os asteriscos indicam \*p<0.05, \*\*p<0.01 e ns: não significativo.





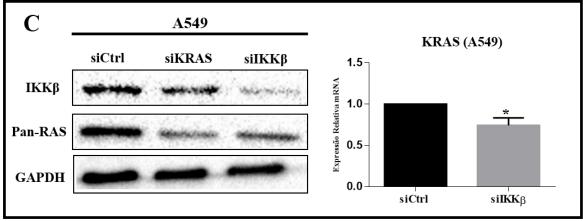
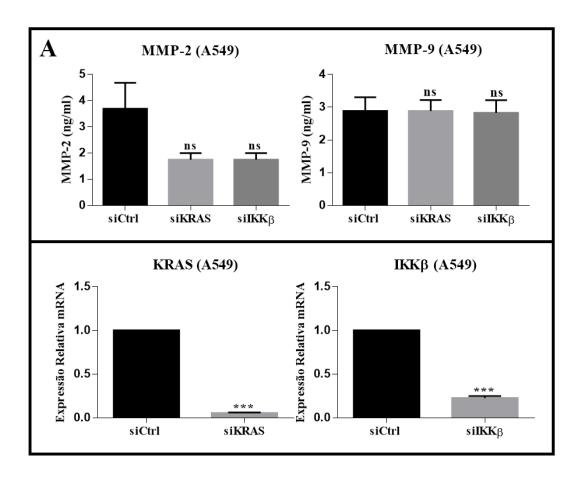


Figura 4.3. Inibição de IKKβ por interferência de RNA em células A549 e H358 reduz a expressão dos genes FAK e MMP-9. As células (A) A549 e (B) H358 foram transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para KRAS (siKRAS) ou para IKKβ (siIKKβ). Após 72h foi extraído o RNA. A expressão dos genes indicados foi analisada por qPCR. O gene ACTB (que codifica para β-Actina) foi utilizado como controle endógeno na normalização da expressão. Realizado o teste estatístico ANOVA em que os asteriscos indicam \*p<0.05, \*\*\*<0.001 e ns: não significativo. No caso da validação da transfecção do siRNA para KRAS e IKKβ por qPCR, foi realizado o teste T-student em que os asteriscos indicam \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 (C) Western Blot e qPCR que mostra a diminuição da expressão de KRAS por inibição da expressão de IKKβ. No qPCR foi realizado o teste T-student em que o asterisco indica \*p<0.05.

# 4.3. Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 através do kit "Biotrak Activity Assay System"

Após avaliar expressão de MMP-2 e MMP-9 por qRT-PCR fomos avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9 frente inibição genética de KRAS e IKKβ por interferência de RNA. Nós utilizamos kits colorimétricos ("Biotrak Activity Assay System" – GE Healthcare Life Sciences) (ver métodos). Pudemos observar uma diminuição na atividade de MMP-2 e MMP-9 frente a inibição de KRAS e IKKβ apenas na linhagem H358. Entretanto, não observamos diferença significativa na atividade de ambas MMPs na linhagem A549, embora a atividade de MMP2 apresente uma tendência a estar diminuída. A inibição genética de KRAS e IKKβ foi validada por qPCR, sendo possível observar pelos gráficos a diminuição da expressão desses genes (**Figura 4.4**).



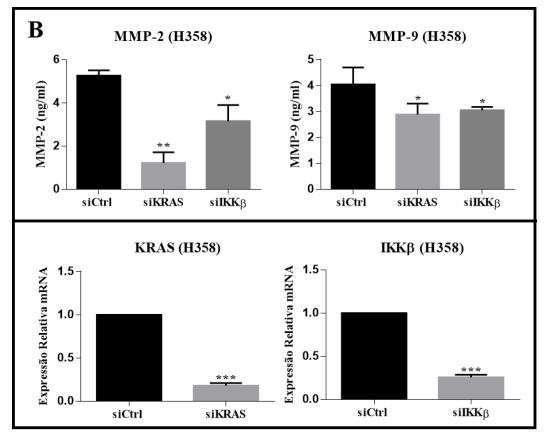
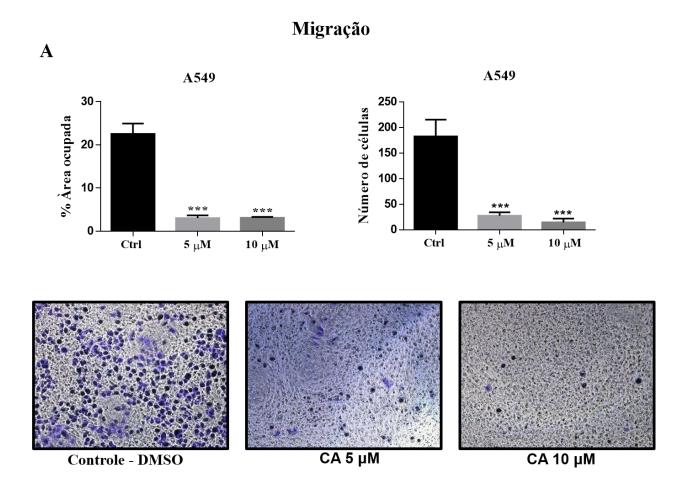


Figura 4.4. As células A549 e H358 foram transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para KRAS (siKRAS) ou para IKKβ (siIKKβ) por 72 horas. Superior: a análise da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 nas células (A) A549 e (B) H358 realizada através do *Matriz Metalloproteinase-2 (MMP-2) e Matriz Metalloproteinase-9 (MMP-9) "Biotrak Actvity Assay System"* (GE Healthcare). Realizado o teste estatístico ANOVA em que o asterisco indica \*p<0.05 e ns: não significativo Inferior: validação da transfecção do siRNA para KRAS e IKKβ por qPCR. Foi realizado o teste *T-student* em que os asteriscos indicam \*\*\*p<0.001.

# 4.4. Inibição da atividade de IKKβ com Composto A e inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA modula a migração celular das células A549 de adenocarcinoma pulmonar humano.

Em seguida, nós avaliamos o papel da IKKβ no processo de migração das células A549 em placas de *Transwell*. Nossos dados mostram que as células que foram tratadas com Composto A apresentaram uma taxa muito menor de migração em relação às células controle tratadas com DMSO, sendo evidenciado tanto pela quantificação do número de células, quanto pela quantificação da porcentagem da área ocupada do inserto (**Figura 4.5A**). Além da inibição da atividade de IKKβ através de um inibidor farmacológico, nós também observamos uma taxa muito menor de migração em células transfectadas com

siRNAs para KRAS e IKKβ em relação as células transfectadas com siRNA controle (**Figura 4.5B**). Esse mesmo experimento foi realizado com a linhagem H358, mas essa linhagem não apresentou capacidade migratória, mesmo quando aumentamos o tempo de ensaio de 24h para 72h ou aumentando o número de células plaqueadas.



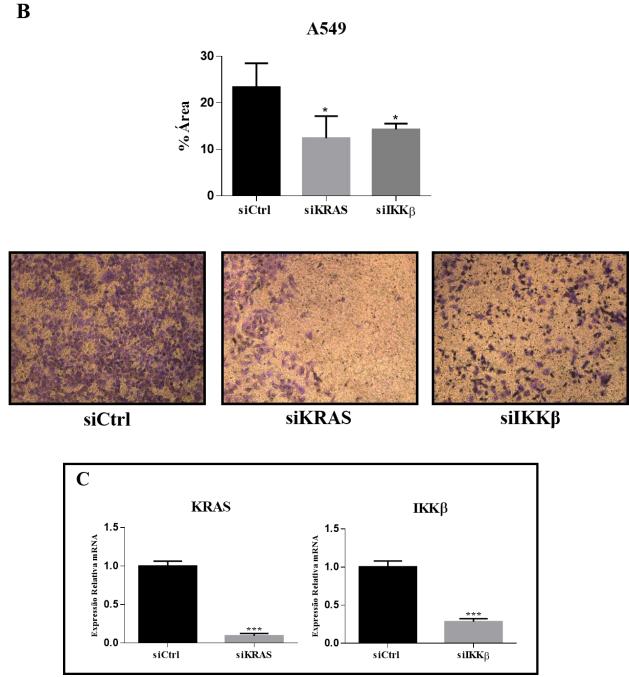
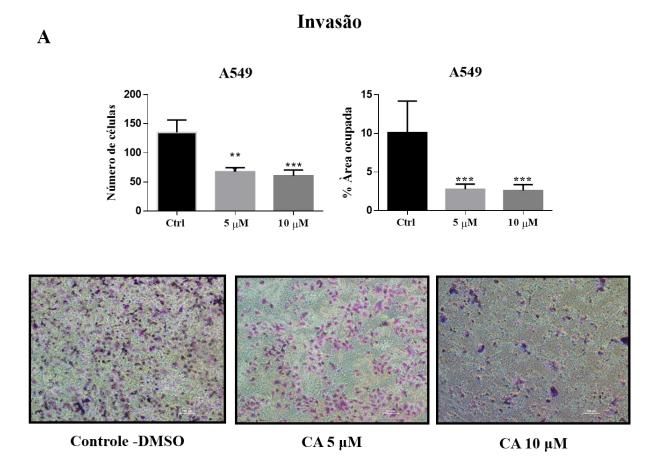


Figura 4.5. Inibição da atividade ou expressão de IKKβ promove uma diminuição da capacidade migratória das células A549. (A) Células A549 foram tratadas com Composto A por 24 horas e posteriormente adicionadas a parte superior das câmaras do tipo *transwell*. (B) Células A549 foram transfectadas com siRNA controle (siCtrl) ou siRNA para KRAS (siKRAS) ou para IKKβ (siIKKβ) por 72 horas e adicionadas a parte superior das câmaras do tipo *transwell*. Em ambos os experimentos (A e B) após 24 horas de incubação quantificamos as células que estavam presentes na parte inferior da *transwell* como descrito em materiais e métodos. Parte superior: gráficos representativos da análise quantitativa dos dados. Parte inferior: imagens representativas. Realizado o teste estatístico ANOVA em que o asterisco indica \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 e ns: não significativo (C) Validação da transfecção do siRNA para KRAS e IKKβ por qPCR. Foi realizado o teste *T-student* em que os asteriscos indicam \*\*\*p<0.001.

# 4.5. Inibição da atividade de IKKβ com Composto A modula a invasão das células A549 e H358 de adenocarcinoma pulmonar humano

A fim de identificarmos o papel da quinase IKKβ no processo de invasão, realizamos ensaio de invasão em placas de *Transwell* com Matrigel com as linhagens A549 e H358. Nossos dados mostram que as células que foram tratadas com Composto A apresentaram uma taxa muito menor de invasão em relação as células controle tratadas com DMSO, sendo evidenciado tanto pela quantificação do número de células, quanto pela quantificação da porcentagem da área ocupada (**Figura 4.6**).



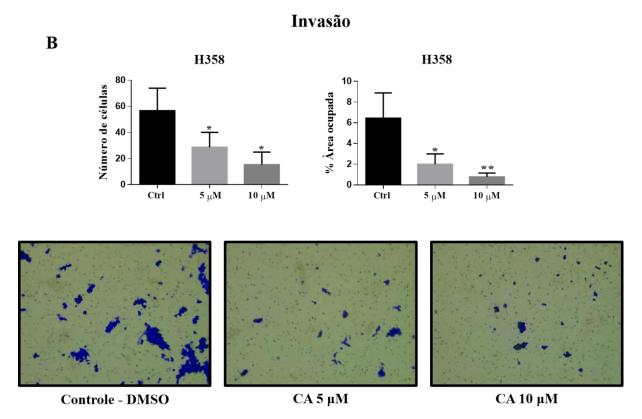


Figura 4.6. Inibição da atividade de IKKβ promove uma diminuição da capacidade invasiva. Células (A) A549 e (B) H358 foram tratadas com Composto A por 24 horas e posteriormente adicionadas a parte superior das câmaras do tipo *transwell*. Após 24 horas de incubação para a A549 e 48h para H358 quantificamos as células que estavam presentes na parte inferior da *transwell* como descrito em materiais e métodos. Parte superior: gráficos representativos da análise quantitativa dos dados. Parte inferior: imagens representativas. Foi realizado a quantificação das imagens dos ensaios de invasão. Realizado o teste estatístico ANOVA em que o asterisco indica \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 e ns: não significativo.

Estes dados demonstram uma importante participação da quinase IKKβ no processo de migração e invasão tumoral *in vitro*. Além do papel de IKKβ nesses processos, conseguimos observar através desses ensaios que a linhagem H358 possui capacidade de invasão, mas não de migração. Temos como hipótese que esta linhagem necessita de algum estímulo proveniente da matriz extracelular para conseguir migrar, visto que no ensaio de migração em *Transwell* os insertos não possuem revestimento com nenhum tipo de proteína de matriz extracelular.

# 4.6. Seleção dos clones A549-LUC e H358-LUC através da avaliação da atividade de Luciferase

Com o objetivo de avaliar o papel da IKKβ na metástase *in vivo*, nós geramos células A549 e H358 expressando estavelmente luciferase. Para tanto, foi feita uma transfecção com um plasmídeo para expressar *firefly luciferase* (pGL4.51[luc2/CMV/Neo]) (**Figura 4.7**), seguida da seleção clonal com geneticina (G418). Os clones gerados foram validados de acordo com a presença de atividade da enzima luciferase medida através de um kit denominado "Luciferase Assay System" em que se usa o substrato da luciferase e a reação quimioluminescente é medida pelo luminômetro (**Figura 4.8**). Posteriormente os clones com atividade de luciferase positiva foram validados através do equipamento de imageamento *IVIS Spectrum*.

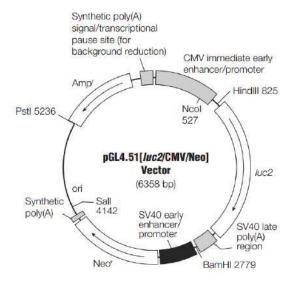
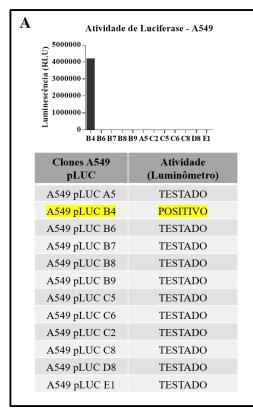
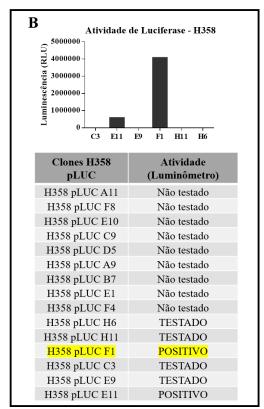


Figura 4.7. Vetor de expressão pGL4.51[luc2/CMV/Neo] da Promega.





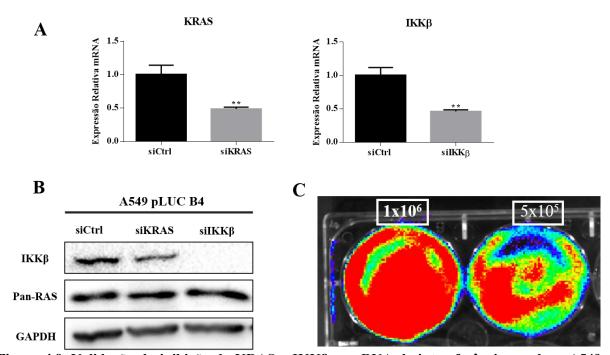
**Figura 4.8.** Validação da atividade de luciferase nos clones obtidos na seleção clonal. Inferior: os clones gerados da linhagem (A) A549 e (B) H358. Superior: gráfico que demonstra a quantificação realizada no luminômetro, da atividade de luciferase em luminescência relativa (RLU) nos clones testados.

# 4.7. Avaliação da presença de metástases em camundongos Balb/c nude submetidos à injeção do clone A549 pLUC B4 pela veia da cauda com inibição da expressão de KRAS e IKKβ por interferência de RNA

Para o primeiro ensaio de metástase *in vivo* usamos o clone gerado da linhagem A549 pLUC B4, com e sem a inibição da expressão de KRAS e com e sem a inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA. Antes da inoculação nos camundongos, fizemos uma validação da inibição da expressão de KRAS e IKKβ através de qPCR e Western Blotting (**Figura 4.9A e B**).

Além disso, fizemos também a validação da atividade de luciferase do clone utilizado através do plaqueamento de duas densidades celulares (1x10<sup>6</sup> e 5x10<sup>5</sup> células) em placa de 6 wells. Adicionamos o substrato D-Luciferina (o mesmo usado nos animais) nas células e analisamos a luminescência pelo IVIS confirmando que as células são capazes de produzir luminescência nestas densidades (**Figura 4.9 C**).

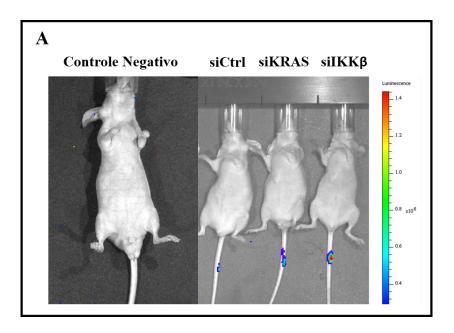
#### A549 pLUC B4



**Figura 4.9.** Validação da inibição de KRAS e IKKβ por RNA de intereferência no clone A549 pLUC B4. (A) Análise da expressão gênica dos genes IKKβ e KRAS por qPCR na linhagem A549 pLUC B4 transfectada com siRNA para IKKβ (siIKKβ) ou KRAS (siKRAS), comparadas às mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Foi realizado o teste *T-student* em que os asteriscos indicam \*\*p<0.01. (B) Análise da eficiência de inibição da expressão por interferência de RNA de IKKβ e KRAS por *Western blot*, mostrando a redução da expressão de IKKβ e KRAS. (C) Validação da atividade de luciferase no clone A549 pLUC B4, em duas concentrações celulares 1x10<sup>6</sup> e 5x10<sup>5</sup>. A imagem foi realizada no equipamento *IVIS Spectrum*.

Após estas validações prosseguimos com a injeção das células pela veia da cauda de camundongos nude (Balb/c). Cada animal foi inoculado na cauda com 0.1 ml da suspensão de células (contendo 1x10<sup>6</sup> células). Os animais foram divididos em 3 grupos da seguinte forma: 5 animais inoculados com células transfectadas com siCtrl, 5 animais inoculados com células transfectadas com siKRAS e 5 animais inoculados com células transfectadas com siIKKβ. Após 50 dias da inoculação das células foi realizado o monitoramento das metástases através de imageamento *in vivo* pelo equipamento *IVIS Spectrum*, com administração por via intraperitoneal do substrato D-Luciferina quinze minutos antes da realização do monitoramento, sendo obtido as seguintes imagens (**Figura 4.10A**).

Como após 50 dias não foi possível observar nenhuma luminescência significativa proveniente das células injetadas, realizamos um novo imageamento *in vivo* 116 dias após a inoculação das células, sendo possível observar o aparecimento de um tumor na região do maxilar e pescoço em um dos 5 animais que receberam células transfectadas com siIKKβ (**Figura 4.10B**).



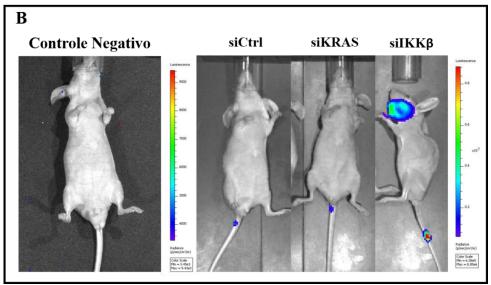
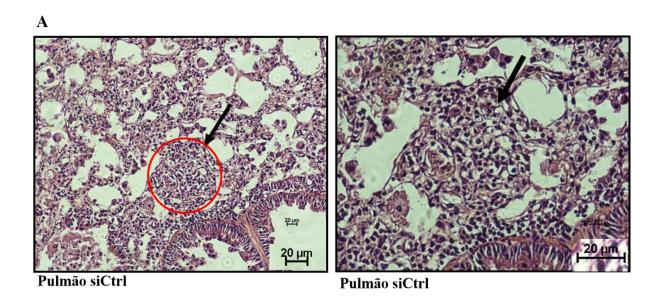


Figura 4.10. Imagens obtidas do IVIS Spectrum de camundongos nude balb/c. (A) Os animais foram inoculados pela veia da cauda com as células A549 pLUC B4 com inibição da expressão por interferência de RNA de IKKβ e KRAS e, após 50 dias da inoculação, comparados ao animal que recebeu células transfectadas com siRNA controle sem similaridade com genes humanos conhecidos (siCtrl) e animal controle negativo, o qual não recebeu nenhum tipo de célula. (B) Após 116 dias da inoculação o animal que possui inibição da expressão de IKKβ apresentou sinal de luminescência na região do maxilar, o que indica a presença de tumor.

Uma vez que mesmo após 116 dias, nenhum tumor foi observado no grupo controle (siCtrl), resolvemos submeter os animais à eutanásia para coleta dos pulmões para fazer uma análise histológica afim de avaliar se houve o estabelecimento de micrometástases com densidade celular muito baixa para detecção pelo aparelho IVIS Spectrum.

Através da coloração com HE conseguimos perceber tanto nos animais que receberam células com siCtrl, quanto nos animais com siKRAS e siIKKβ, a presença de células atípicas, com irregularidades no tamanho e forma, aumento da relação núcleo/citoplasma, polaridade alterada e núcleo hipercorado (**Figura 4.11**). Com essas caracteristicas celulares típicas de neoplasias, podemos inferir que há o início de formação de micrometástases.



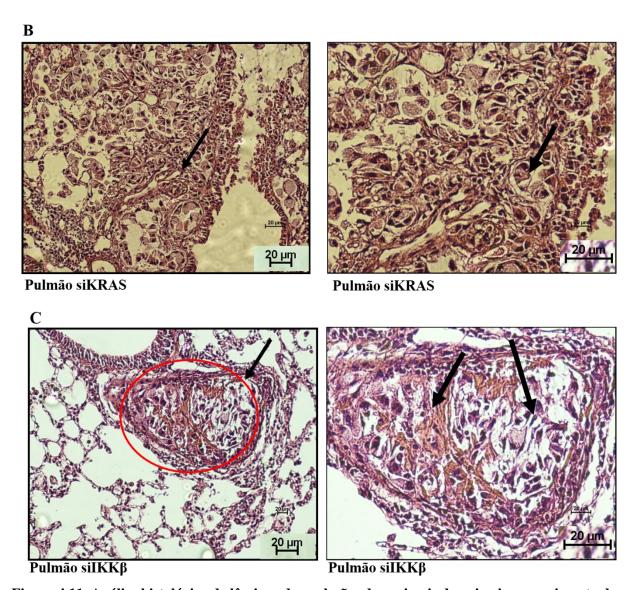
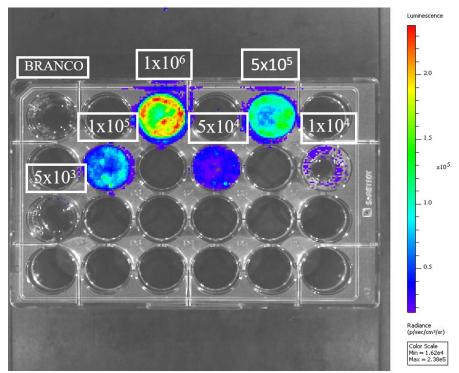


Figura 4.11. Análise histológica de lâminas dos pulmões dos animais do primeiro experimento de formação de metástases in vivo coradas com Hematoxilina/Eosina. As imagens representam a presença de células atípicas (indicadas pela seta preta e pelo círculo em vermelho) que conferem a presença de tumores nos pulmões coletados dos animais siCtrl (A), siKRAS (B) e siIKKβ (C). Aumento 20x (lado esquerdo), aumento 40x (lado direito).

Infelizmente não foi possível coletar material do único animal que apresentou formação tumoral, pois o animal veio à morte antes da coleta.

Ao mesmo tempo em que este experimento estava em andamento, demos início ao segundo experimento com a linhagem H358 pLUC F1, que apresentava uma atividade de luciferase maior que a linhagem A549 pLUC B4. Dados os resultados desanimadores com a linhagem A549, resolvemos fazer uma diluição seriada das células para detecção no IVIS para

determinar o número mínimo de células que conseguem ser detectadas pelo aparelho. Para isto densidades celulares diferentes (1x10<sup>6</sup>; 5x10<sup>5</sup>; 1x10<sup>5</sup>; 5x10<sup>4</sup>; 1x10<sup>4</sup> e 5x10<sup>3</sup> células) foram plaqueadas em placa de 24 *wells*. Adicionamos o substrato D-Luciferina nas células e analisamos a luminescência pelo *IVIS* confirmando que as células são capazes de produzir luminescência (**Figura 4.12**). Com este ensaio conseguimos perceber que o sinal de luminescência é dependente da densidade, sendo necessário pelo menos 5x10<sup>4</sup> células para haver detecção de um sinal robusto de luminescência.

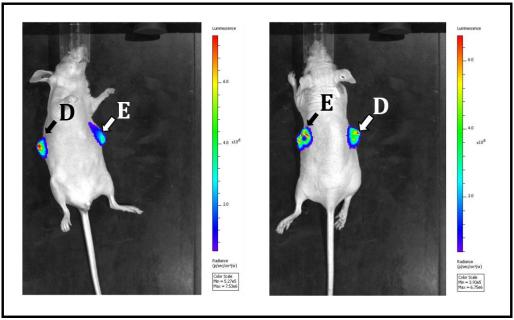


**Figura 4.12. Validação da atividade de luciferase no clone H358 pLUC F1**. Em densidades celulares diferentes  $1x10^6$ ;  $5x10^5$ ;  $1x10^5$ ;  $5x10^4$ ;  $1x10^4$  e  $5x10^3$  células. A imagem foi realizada no equipamento IVIS Spectrum.

# 4.8. Inoculação do clone H358 pLUC F1 no flanco para avaliar crescimento tumoral

Além disso, resolvemos fazer uma validação de que tumores formados por estas células seriam passíveis de detecção *in vivo*. Para tanto, fizemos inoculação subcutânea para gerar tumores xenográficos de  $1x10^6$  células no lado direito e  $5x10^5$  no lado esquerdo de um camundongo nude (Balb/c) e, após 56 dias da inoculação, foi feito o imageamento *in vivo*.

Com este ensaio conseguimos concluir dois parâmetros: o clone H358 pLUC F1 possui a capacidade de formar tumor e possui atividade de luciferase (**Figura 4.13**).



**Figura 4.13. Imagens obtidas do IVIS Spectrum.** O camundongo nude balb/c com inoculação da linhagem H358 pLUC F1 sem tratamento, do lado direito foi inoculado  $1x10^6$  e do lado esquerdo  $5x10^5$ . Primeira imagem animal em decúbito dorsal e segunda imagem animal em decúbito ventral.

Após estas validações prosseguimos com o experimento de metástase *in vivo*. Primeiramente, realizamos a transfecção desta linhagem com os siRNAs de interesse (siCtrl, siKRAS e siIKKβ) e fizemos a validação da inibição de expressão de KRAS e IKKβ através de qPCR e Western Blotting (**Figura 4.14**).

# H358 pLUC F1

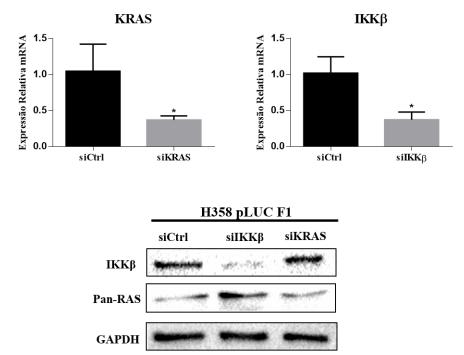
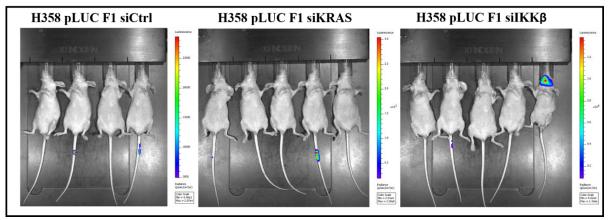


Figura 4.14. Validação da inibição de KRAS e IKKβ por RNA de intereferência no clone H358 pLUC F1. Superior: análise da expressão gênica dos genes IKKβ e KRAS por qPCR na linhagem H358 pLUC F1 transfectada com siRNA para IKKβ (siIKKβ) ou KRAS (siKRAS), comparadas às mesmas células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl). Actina foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Foi realizado o teste T-student em que os asteriscos indicam \*p<0.05. Inferior: Análise da eficiência de inibição da expressão por interferência de RNA de IKKβ e KRAS por Western blot, mostrando a redução da expressão de IKKβ e KRAS.

Uma vez que determinamos a inibição dos alvos de interesse, prosseguimos com a inoculação pela veia da cauda de camundongos nude (Balb/c), com 0.1 ml da suspensão de células H358 pLUC F1 (contendo 1x10<sup>6</sup> células) transfectadas com siRNAs de interesse. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais da seguinte forma: 5 animais siCtrl, 5 animais siKRAS e 5 animais IKKβ.

Após 58 dias da injeção das células foi feito o primeiro imageamento *in vivo*, sendo detectado sinal de luminescência apenas em um animal que recebeu células com inibição de IKKβ, apresentando novamente um tumor na região do maxilar e pescoço (**Figura 4.15**).



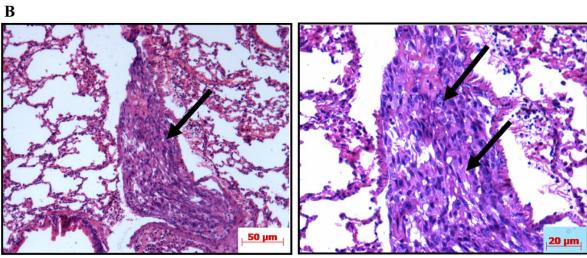
**Figura 4.15. Imagens obtidas do** *IVIS Spectrum* **de camundongos nude balb/c**. Os animais foram inoculados pela veia da cauda com as células H358 pLUC F1 com inibição da expressão de IKKβ e KRAS por interferência de RNA comparados ao animal que recebeu células transfectadas com siRNA controle sem homologia a genes humanos conhecidos (siCtrl).

Esse experimento está em andamento, pois serão feitas novas imagens dos animais com mais tempo de espera para concluir se mais algum animal irá desenvolver metástases detectáveis através da luminescência. O animal com H358 pLUC siIKKβ que desenvolveu metástase, foi submetido à eutanásia e tanto os pulmões quanto o tumor da região maxilar foram coletados para análise histológica.

Como podemos observar pelas imagens, o tumor na boca possui uma grande quantidade de células neoplásicas sem uma delimitação bem definida, de acordo com as características celulares já descritas anteriormente (**Figura 4.11**), além do tumor na boca, os pulmões desse animal apresentaram a presença de micrometástases que não foram detectáveis no imageamento (**Figura 4.16**).

Metástase boca siIKKβ

Metástase boca siIKKβ



Pulmão esquerdo siIKKβ

Pulmão esquerdo siIKKβ

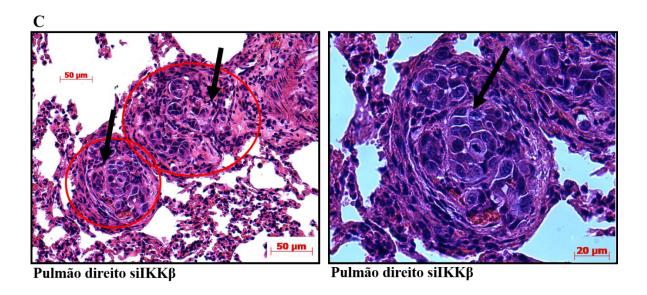


Figura 4.16. Análise histológica de lâminas do tumor da boca e pulmões do animal H358 pLUC siIKKβ coradas com Hematoxilina/Eosina. As imagens representam a presença de células atípicas (indicadas pela seta preta) que conferem a presença de tumores. Há grande quantidade dessas células sem uma delimitação bem definida na boca (A) e presença de micrometástases nos pulmões esquerdo (B) e direito (C). Aumento 20x (lado esquerdo), aumento 40x (lado direito).

Este resultado de formação de metástase em 20% dos animais com inibição de IKKβ é um resultado inesperado e ainda não sabemo se é um resultado estocástico ou real. O resultado é inesperado, não só pelo fato de ocorrer no grupo experimental siIKKβ, mas também pelo local anatômico do tumor, uma vez que é reportado na literatura que células inoculadas na veia da cauda, quando invasivas, tendem a formar metástases pulmonares, sendo este ensaio muitas vezes designado de "Lung Seeding Assay". De qualquer forma, estes animais serão mantidos vivos por mais tempo para avaliarmos se outros animais deste grupo experimental ou de outros grupos desenvolverá metástase.

A dificuldade de observação de metástases nos nossos experimentos (inclusive nos controles) pode se dever tanto ao fato da densidade celular ser muito baixa para detecção, quanto ao fato dos camundongos Nude apresentarem imunidade inata. Iremos repetir este experimento com camundongos da linhagem Nod/SCID que apresentam menor imunidade.

# 5. DISCUSSÃO

No câncer de pulmão as alterações genéticas mais encontradas são mutações no oncogene *KRAS*. Apesar disso e de estudos intensos nesta área, ainda não existem terapias efetivas disponíveis, que possam ser capazes de inibir diretamente a atividade de KRAS (Adjei, 2008). Como as abordagens de inibição direta de KRAS até o momento não foram bem sucedidas, uma abordagem alternativa de inibição dessa GTPase é a inibição indireta de KRAS, através do conhecimento e entendimento dos seus efetores *downstream*. Esta abordagem tem sido um verdadeiro desafio, já que KRAS é responsável por regular diversas vias que influenciam o fenótipo oncogênico. Com isso, acredita-se que uma maneira efetiva de se inibir KRAS mutante envolverá a inibição combinada de alguns efetores críticos.

Já foi visto em estudos anteriores que a tumorigênese pulmonar pode ser promovida através da ativação do fator de transcrição NF-κB por KRAS mutante, e que esta ativação é dependente da quinase IKKβ (Bassères et al., 2010). Já se sabe que KRAS oncogênica é capaz de promover não só a iniciação tumoral, mas também um fenótipo metastático (Pylayeva-Gupta et al., 2011; Chan; Chen, 2012; Uekita et al., 2014) e que o NF-κB é capaz de promover metástase em diferentes modelos tumorais, através do aumento da expressão de IL-8 e MMPs (Huang et al., 2001; Raychaudhuri; Vogelbaum, 2010; Wu; Zhou, 2010; Lin et al., 2011; Long et al., 2012; Shi et al., 2015). Além disso, vários estudos já demonstraram a relevância de IKKβ na oncogênese, através de estratégias distintas de inibição de IKKβ, provando que a inibição de IKKβ é capaz de reduzir a tumorigênese pulmonar, a proliferação celular e a progressão do tumor para graus histológicos mais avançados (Xia et al., 2012; Bassères et al., 2014). Mas ainda não se conhece a importância de IKKβ na metástase induzida por KRAS, sendo o entendimento da progressão da doença para uma doença metastática de suma importância, pois a metástase é o maior fator limitante

na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão, sendo na grande maioria dos casos a principal causa de óbito desses pacientes.

A partir desses indícios nós postulamos duas hipóteses centrais para o nosso trabalho: (1) IKKβ é capaz de promover a capacidade metastática tumoral induzida por KRAS no pulmão; e (2) a inibição de IKKβ é capaz de reduzir a capacidade invasiva celular e metastática tumoral. Desta forma, primeiramente nós nos propusemos a avaliar se a inibição de IKKβ afeta a migração e invasão em células positivas para mutação em KRAS, A549 e H358 (objetivo específico 1).

Inicialmente, avaliamos, em células pulmonares portadoras de mutação em KRAS, se IKKβ está envolvida na regulação da expressão e atividade de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9), que não só são reguladas pelo NF-kB, mas também estão relacionadas aos processos de migração e invasão envolvidos na metástase. Por exemplo, essas MMPs estão relacionadas ao fenótipo maligno de tumores pulmonares, incluindo tumores mediados pela KRAS oncogênica (Deryugina; Quigley, 2006; Kessenbrock et al., 2010; Li et al., 2015; Khalid et al., 2016). Além disso, a regulação da expressão e atividade dessas MMPs é realizada através de citocinas e fatores de crescimento que ativam vias como STAT-3 e NFкВ (Banerjee; Resat, 2016; Chao et al., 2017). Interessantemente, um estudo demonstrou que um composto do extrato de folhas da espécie Punica granatum é capaz de reduzir a invasão e migração de linhagens celulares de NSCLC através da inibição de MMP-2 e MMP-9 (Li et al., 2016). Ademais, testes com um composto denominado de Timosaponin AIII (TAIII), que é capaz de inibir a ativação de ERK1/2 e a via Src/FAK na linhagem celular A549, demonstrou reduzir os níveis de expressão dessas MMPs, tanto a nível de RNA mensageiro, quanto a nível proteico. TAIII demonstrou efeitos anti-migratórios e antiinvasivos, sugerindo uma relação direta entre esses processos e as MMPs (Jung et al., 2016). Finalmente, a ativação e translocação nuclear de NF-kB, pela via canônica, contribui para a ativação de MMP-2 e MMP-9. A ativação dessas MMPs possuem um papel essencial para invasão e metástase (Karin; Greten, 2005; Bassères; Baldwin, 2006; Chao et al., 2017)

De acordo com a nossa premissa de que a IKKβ afeta a expressão e atividade destas MMPs, a inibição de IKKβ por diferentes abordagens diminuiu a expressão de MMP-9 nas células A549 e H358, e diminuiu a atividade de MMP9 na linhagem H358 (Figuras 4.2; 4.3 e 4.4). Embora não tenhamos observado diminuição na expressão de MMP-2 nas nossas linhagens, observamos uma diminuição significativa na atividade de MMP-2 na linhagem H358 e uma tendência à diminuição da atividade de MMP-2 na linhagem A549 (Figura 4.4). O fato de não conseguirmos observar uma redução significativa na atividade das MMPs após a inibição de IKKβ na linhagem A549 pode estar relacionada a esta linhagem possuir o supressor tumoral p53 normal, enquanto a linhagem H358 apresenta p53 deletado (p53 null), uma vez que já se demonstrou que as células tumorais com perda de p53 são mais sensíveis a inibição de IKKβ (Kawachi et al., 2008; Basséres et al., 2014). Já o fato de não conseguirmos observar a regulação da expressão de MMP-2 por IKKβ pode estar relacionado ao fato de que em NSCLC, a expressão de MMP-2 é principalmente localizada em fibroblastos. Durante a degradação da matriz extracelular pela MMP-2, as células tumorais e fibroblastos são altamente cooperativos um com o outro na secreção dessa MMP (Nawrocki et al., 1997). Esse fato pode indicar que a quantificação da atividade dessa MMP pode ser mais difícil, pois a sua secreção e produção depende de todo o microambiente envolvido. Por outro lado, IKKβ tem um importante papel na regulação da quinase Aurora A, o qual regula a progressão do ciclo celular e manutenção da bipolaridade do fuso, a redução na atividade de IKKβ leva a um aumento na quantidade de Aurora A (Irelan et al., 2007). O knockdown de AURKA é capaz de reduzir a expressão de MMP2 in vitro (Zhang et al, 2011; Zhang et al, 2012), demonstrando que pode haver um aumento da expressão de MMP-2 com a inibição de IKKβ, que pode estar associado a ativação de outas vias que não IKKβ/NF-κB. Mas de qualquer forma, a IKKβ parece regular positivamente a atividade de MMP2 independentemente da regulação da expressão.

Nós adicionamos ao nosso Objetivo Específico 1 o estudo de uma tirosina quinase citoplasmática com um importante papel na sinalização mediada por integrinas denominada de FAK, que está intimamente relacionada ao processo de adesão celular. Fomos avaliar se IKKβ era capaz de regular essa quinase, devido a alguns fatores já descritos em outros trabalhos. FAK é responsável por promover progressão tumoral e metástase através da regulação de efeitos celulares como motilidade, invasão, sobrevivência e proliferação (Lee et al., 2015). Já foi demonstrado que a fosforilação de FAK na Y925 faz com que FAK seja ativado pela via de RAS, e a sinalização de FAK é um requisito para a manutenção de adenocarcinomas dependentes de KRAS (Konstantinidou et al., 2013). Além disso, NF-κB e p53 são fatores de transcrição já bem caracterizados que ativam e reprimem, respectivamente, a transcrição de FAK (Corsi et al., 2006; Cance; Golubovskaya, 2008; Sulzmayer; Jean; Schlaepfer, 2014). Finalmente, FAK é capaz de regular as MMPs através das vias MAPK e PI3K/Akt (Hu et al., 2003; Bera et al., 2013; Merchant et al., 2017), sendo que a atividade de FAK aumenta a expressão de MMP-9 e metástase espontânea em carcinoma de mama (Mitra et al., 2006). Consistente com estes relatos, nós observamos que, tanto a inibição farmacológica, quanto a inibição genética de IKKβ reduziu a expressão de FAK (Figuras 4.2 e 4.3), corroborando a nossa hipótese de que ΙΚΚβ participa da regulação de FAK e sugerindo que IKKβ desempenha um papel importante na promoção do fenótipo invasivo e metastático.

Para avaliar diretamente a contribuição da IKKβ para um fenótipo migratório e invasivo, nós avaliamos se a inibição da IKKβ nas células A549 e H358 era capaz de modular a migração e invasão celular. Nós observamos que a inibição de IKKβ foi capaz de reduzir a migração da linhagem A549 e a capacidade invasiva de ambas as linhagens (**Figura 4.5 e 4.6**). Não foi possível avaliar a capacidade migratória da linhagem H358, pois essa linhagem

não apresentou capacidade migratória, mesmo quando aumentamos o tempo de ensaio ou o número de células plaqueadas. Uma possível explicação para a ausência de migração é que a linhagem H358 pode necessitar de uma sinalização desencadeada por proteínas de matriz extracelular para desencadear sua motilidade, uma vez que a linhagem possui capacidade invasiva, mas não migratória.

De qualquer forma, estes resultados são consistentes com os resultados anteriores mostrando que a IKKβ promove expressão e/ou atividade de MMPs e FAK e são apoiados por estudos que mostram que as vias de RAS e IKKβ promovem a expressão de outros fatores pró-metastáticos. Por exemplo, RAS promove angiogênese tumoral induzindo a secreção de IL-8 (**Sparmann; Bar-Sagi, 2004; Sunaga et al., 2014**), uma citocina que também já foi implicada em promover metástase (**Liu et al., 2010**). A IL-8, não só é um gene alvo do NF-κB (**Stein; Baldwin, 1993**), mas também, em células pulmonares transformadas por KRAS, a expressão de IL-8 depende de IKKβ (**Bassères et al., 2010**).

Embora a avaliação do efeito da inibição da IKKβ sobre a capacidade migratória e invasiva celular seja importante na caracterização da IKKβ como um alvo terapêutico antimetastático, é importante avaliar em um modelo tumoral *in vivo* se a inibição da IKKβ reduz a formação de metástases. Portanto em nosso *Objetivo Especifico 2*, nós fomos avaliar como a inibição de IKKβ afeta a capacidade metastática de células portadoras de mutações em KRAS *in vivo*. Para a realização deste objetivo, utilizamos as células A549 e H358, geneticamente modificadas para expressar constitutivamente a luciferase de vagalume (firefly luciferase) (**Figura 4.8**).

Com ambas as linhagens, obtivemos um resultado inesperado, pois esperávamos formação de mestástases nos animais controle e uma diminuição no número de metástases desenvolvidas nos animais que receberam células com siIKKβ ou siKRAS. Entretanto só observamos formação demetástase em dois animais com inibição de IKKβ (**Figura 4.10B e** 

**4.15**) até o momento. Este resultado é inesperado, não só pelo fato de ocorrer no grupo experimental siIKKβ, mas também pelo local anatômico do tumor, sendo localizado na região da cabeça mais próximo ao maxilar, não possuindo uma delimitação bem definida, uma vez que é reportado na literatura que células inoculadas na veia da cauda, quando invasivas, tendem a formar metástases pulmonares, sendo este ensaio muitas vezes designado de "Lung Seeding Assay".

Embora a IKKβ possa ter efeito superessor tumoral (Page et al., 2017), ela já foi amplamente implicada em promover a oncogênese mediada por KRAS, inclusive a oncogênese pulmonar (Xia et al., 2012; Bassères et al., 2014). Além disso, nossos resultados in vitro apontam para um papel pró-metastático da IKKβ. Como até o momento só observamos o desenvolvimento de macrometástase em 1 animal de cada grupo siIKKβ (um da linhagem A549 e um da linhagem H358), acreditamos que este foi um resultado estocástico sem implicar causalidade entre a perda de IKKβ e a formação de metástases. Isto é reforçado pelo fato de macrometástases não terem sido observadas no grupo controle, que serviriam de referência para as comparações com os grupos experimentais. Estes resultados desanimadores podem se dever ao modelo animal utilizado (camundongos Nude), que embora atímicos, ou seja deficientes em células T eles possuem um aumento compensatório da imunidade inata, particularmente as células Natural Killer (NK) e macrófagos que podem portanto limitar o crescimento do tumor e prevenir metástases (Talmadge et al., 1980; Habu et al., 1981), impedindo que obtenhamos resultados confiáveis. Por outro lado, o aparecimento destes dois animais com metástase indica que não foi a ausência de capacidade metastática das células utilizadas que resultou na ausência de formação de mestástases. Na verdade, a detecção de micrometástases pulmonares nos animais de todos os grupos experimentais, que não foram detectadas por imageamento in vivo (Figura 4.11 e 4.16), sugere que metástases pequenas podem estar sendo formadas nos animais, mas que as mesmas não atingiram o número de células necessárias para detecção (**Figura 4.12**).

Além dessas análises histológicas, para poder quantificar a quantidade de células neoplásicas presentes nos pulmões dos camundongos, seria interessante fazer um estudo imunoistoquímico com o anticorpo anti-Luciferase. Entretanto, o anticorpo que possuímos é um anticorpo policlonal, que apresenta muitas marcações inespecíficas em ensaio de Western Blotting, o que limita a sua utilização na análise imunoistoquímica.

Uma outra forma de resolver este problema é repetir este experimento com animais NOD/SCID (do inglês *nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency*), que apresentam maior imunossupressão, pois são deficientes em células T e B e não possuem o mesmo mecanismo compensatório que os camundongos Nude (**Talmadge et al., 2007**) possibilitando o aparecimento de metástases de forma mais eficiente.

Em conclusão, embora ainda não tenhamos conseguido obter validação *in vivo*, os nossos resultados *in vitro* e outros projetos já realizados no laboratório mostrando que a inibição de IKKβ diminui a população de células iniciadoras de tumor (CITs) (**Rodrigues F. S. Explorando a quinase IKKβ como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene KRAS. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018) apoiam a nossa hipótese de que a IKKβ promove propriedades migratórias e invasivas das células tumorais e, desta forma, contribui para a disseminação metastática.** 

# 6. CONCLUSÕES

Sumarizando todos os resultados obtidos neste trabalho, observamos que:

- a) A inibição farmacológica de IKKβ reduz a expressão de genes relevantes para o contexto do fenótipo metastático, como FAK e MMP-9 em células A549 e H358, sugerindo que IKKβ desempenha um papel importante na manutenção das propriedades desse fenótipo;
- b) A inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduz a expressão dos genes
   FAK e MMP-9 na linhagem A549;
- c) A inibição da expressão de KRAS e IKKβ por interferência de RNA reduz a expressão do gene MMP-9 na linhagem H358;
- d) A inibição genética de KRAS e IKKβ diminui a atividade de MMP-2 e MMP-9 apenas na linhagem H358;
- e) A inibição farmacológica e a inibição da expressão de IKKβ por interferência de RNA reduz a migração de células A549;
- f) Inibição farmacológica de IKKβ modula a invasão das linhagens A549 e H358;
- g) Ocorreu o aparecimento de metástases no ensaio *in vivo* em animal de cada grupo que receberam as células A549 pLUC B4 e H358 pLUC F1 com inibição de IKKβ por interferência de RNA;
- h) Em análises histológicas dos pulmões coletados dos animais foi observado a presença de micrometástases, mas não foi possível a avaliação do papel de IKKβ na formação de micrometástases.

# 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJEI, A. A.; MAUER, A.; BRUZEK, L.; MARKS, R. S.; HILLMAN, S.; GEYER, S.; HANSON, L. J.; WRIGHT, J. J.; ERLICHMAN, C.; KAUFMANN, S. H.; VOKES, E. E. Phase II Study of the Farnesyl Transferase Inhibitor R115777 in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung CancerJournal of Clinical Oncology. v. 21, n. 9, p. 1760-1766, 2003.
- ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 8483–8523, 8 set. 2014. ANDREYEV, H. J. N.; UROSEVIC, N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 5, p. 692–696, 5 set. 2001.
- ARVANITAKIS, M.; VAN LAETHEM, J.-L.; PARMA, J.; DE MAERTELAER, V.; DELHAYE, M.; DEVIÈRE, J. Predictive Factors for Pancreatic Cancer in Patients with Chronic Pancreatitis in Association with K- ras Gene Mutation. **Endoscopy**, v. 36, n. 6, p. 535–542, jun. 2004.
- BALDWIN, A. S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 241–246, 1 fev. 2001.
- BALDWIN, A. S. Series Introduction: The transcription factor NF-κB and human disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 3–6, 1 jan. 2001.
- BANERJEE, K.; RESAT, H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 11, p. 2570–2578, 1 jun. 2016.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. **Trends** in pharmacological sciences, v. 18, n. 2, p. 46–50, fev. 1997.
- BASSÈRES D. S.; BALDWIN, A. S. Nuclear factor-jB and inhibitor of jB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. **Oncogene**, v. 25, p. 6817–6830, 2006.
- BASSERES, D. S.; EBBS, A.; LEVANTINI, E.; BALDWIN, A. S. Requirement of the NF- B Subunit p65/RelA for K-Ras-Induced Lung Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 70, n. 9, p. 3537–3546, 1 maio 2010.
- BASSÈRES, D. S.; EBBS, A.; COGSWELL, P. C.; BALDWIN, A. S. IKK is a therapeutic target in KRAS-induced lung cancer with disrupted p53 activity. **Genes & Cancer**, v. 5, n. 1–2, p. 41, 21 abr. 2014.
- BEG, A. A.; BALTIMORE, D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5288, p. 782–4, 1 nov. 1996.
- BENDELL, J. C.; RODON, J.; BURRIS, H. A.; DE JONGE, M.; VERWEIJ, J.; BIRLE, D.; DEMANSE, D.; DE BUCK, S. S.; RU, Q. C.; PETERS, M.; GOLDBRUNNER, M.; BASELGA, J. Phase I, Dose-Escalation Study of BKM120, an Oral Pan-Class I PI3K Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 3, p. 282–290, 20 jan. 2012.
- BERA, A.; ZHAO, S.; CAO, L.; CHIAO, P. J.; FREEMAN, J. W. Oncogenic K-Ras and Loss of Smad4 Mediate Invasion by Activating an EGFR/NF-κB Axis That Induces Expression of MMP9 and uPA in Human Pancreas Progenitor Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82282, 5 dez. 2013.
- BERGO, M. O.; GAVINO, B. J.; HONG, C.; BEIGNEUX, A. P.; MCMAHON, M.; CASEY, P. J.; YOUNG, S. G. Inactivation of Icmt inhibits transformation by oncogenic K-Ras and B-Raf. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 539–550, 15 fev. 2004.
- BOLAND, G. M.; MERIC-BERNSTAM, F. Clinical next generation sequencing to identify actionable aberrations in a phase I program. **Oncotarget**, v. 6, n. 24, p. 20099–110, 21 ago. 2015.

- BORIACK-SJODIN, P. A.; MARGARIT, S. M.; BAR-SAGI, D.; KURIYAN, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 337–343, 23 jul. 1998.
- BOS, J. L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. Cell, v. 129, n. 5, p. 865–877, 1 jun. 2007.
- BOSSÙ, P.; VANONI, M.; WANKE, V.; CESARONI, M. P.; TROPEA, F.; MELILLO, G.; ASTI, C.; PORZIO, S.; RUGGIERO, P.; DI CIOCCIO, V.; MAURIZI, G.; CIABINI, A.; ALBERGHINA, L. A dominant negative RAS-specific guanine nucleotide exchange factor reverses neoplastic phenotype in K-ras transformed mouse fibroblasts. **Oncogene**, v. 19, n. 17, p. 2147–2154, 15 abr. 2000.
- BOYCE, B. F.; YAO, Z.; XING, L. Functions of nuclear factor κB in bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 367–375, abr. 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRAMI-CHERRIER, K.; GERVASI, N.; ARSENIEVA, D.; WALKIEWICZ, K.; BOUTTERIN, M.-C.; ORTEGA, A.; LEONARD, P. G.; SEANTIER, B.; GASMI, L.; BOUCEBA, T.; KADARE, G.; GIRAULT, J.-A.; AROLD, S. T. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 4, p. 356–370, 18 fev. 2014.
- BRAVO-CORDERO, J. J.; HODGSON, L.; CONDEELIS, J. S. Spatial regulation of tumor cell protrusions by RhoC. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 3, p. 263–7, 2014.
- BROOKS, P. C.; STRÖMBLAD, S.; SANDERS, L. C.; VON SCHALSCHA, T. L.; AIMES, R. T.; STETLER-STEVENSON, W. G.; QUIGLEY, J. P.; CHERESH, D. A. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. Cell, v. 85, n. 5, p. 683–93, 31 maio 1996.
- BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. **Cancer cell**, v. 2, n. 3, p. 243–7, set. 2002.
- BUCHHEIT, C. L.; WEIGEL, K. J.; SCHAFER, Z. T. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 9, p. 632–641, 7 set. 2014.
- BUHRMAN, G.; O'CONNOR, C.; ZERBE, B.; KEARNEY, B. M.; NAPOLEON, R.; KOVRIGINA, E. A.; VAJDA, S.; KOZAKOV, D.; KOVRIGIN, E. L.; MATTOS, C. Analysis of Binding Site Hot Spots on the Surface of Ras GTPase. **Journal of Molecular Biology**, v. 413, n. 4, p. 773–789, 4 nov. 2011.
- BURNETT, J. C.; ROSSI, J. J.; TIEMANN, K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 9, p. 1130–1146, set. 2011.
- BURNS, M. C.; SUN, Q.; DANIELS, R. N.; CAMPER, D.; KENNEDY, J. P.; PHAN, J.; OLEJNICZAK, E. T.; LEE, T.; WATERSON, A. G.; ROSSANESE, O. W.; FESIK, S. W. Approach for targeting Ras with small molecules that activate SOS-mediated nucleotide exchange. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 9, p. 3401–3406, 4 mar. 2014.
- CANCE, W. G.; GOLUBOVSKAYA, V. M. Focal Adhesion Kinase Versus p53: Apoptosis or Survival? **Science Signaling**, v. 1, n. 20, p. pe22-pe22, 20 maio 2008.
- Cancer Facts Figures 2012 | American Cancer Society. Disponível em: <a href="https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2012.html">https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures-2012.html</a>>. Acesso em: 16 maio. 2018.

- CANTRELL, D. A. GTPases and T cell activation. Immunological reviews, v. 192, p. 122–30, abr. 2003.
- CARRIÈRE, C.; YOUNG, A. L.; GUNN, J. R.; LONGNECKER, D. S.; KORC, M. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 3, p. 561–565, 8 maio 2009.
- CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 261–274, 1 mar. 2011.
- CASTELLANO, E.; SANTOS, E. Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but So Different. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 216–231, 1 mar. 2011.
- CHAKRABARTI, M.; JANG, H.; NUSSINOV, R. Comparison of the Conformations of KRAS Isoforms, K-Ras4A and K-Ras4B, Points to Similarities and Significant Differences. **The journal of physical chemistry. B**, v. 120, n. 4, p. 667–79, 4 fev. 2016.
- CHAN, I. T.; KUTOK, J. L.; WILLIAMS, I. R.; COHEN, S.; KELLY, L.; SHIGEMATSU, H.; JOHNSON, L.; AKASHI, K.; TUVESON, D. A.; JACKS, T.; GILLILAND, D. G. Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 528–538, 15 fev. 2004.
- CHAN, P.-C.; CHEN, H.-C. p120RasGAP-Mediated Activation of c-Src Is Critical for Oncogenic Ras to Induce Tumor Invasion. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2405–2415, 1 maio 2012.
- CHANG, E. H.; FURTH, M. E.; SCOLNICK, E. M.; LOWY, D. R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. **Nature**, v. 297, n. 5866, p. 479–483, 10 jun. 1982.
- CHAO, W.; DENG, J.-S.; LI, P.-Y.; LIANG, Y.-C.; HUANG, G.-J. 3,4-Dihydroxybenzalactone Suppresses Human Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells Metastasis via Suppression of Epithelial to Mesenchymal Transition, ROS-Mediated PI3K/AKT/MAPK/MMP and NFκB Signaling Pathways. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 537, 28 mar. 2017.
- CHATURVEDI, M. M.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; AGGARWAL, B. B. NF-κB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene**, v. 30, n. 14, p. 1615–1630, 20 abr. 2011.
- CHIANG, A. C.; MASSAGUÉ, J. Molecular basis of metastasis. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 26, p. 2814–23, 25 dez. 2008.
- CHIEN, Y.; KIM, S.; BUMEISTER, R.; LOO, Y.-M.; KWON, S. W.; JOHNSON, C. L.; BALAKIREVA, M. G.; ROMEO, Y.; KOPELOVICH, L.; GALE, M.; YEAMAN, C.; CAMONIS, J. H.; ZHAO, Y.; WHITE, M. A. RalB GTPase-Mediated Activation of the IkB Family Kinase TBK1 Couples Innate Immune Signaling to Tumor Cell Survival. Cell, v. 127, n. 1, p. 157–170, 6 out. 2006.
- CHOU, J.; SHAHI, P.; WERB, Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment. **Cell Cycle**, v. 12, n. 20, p. 3262–3271, 15 out. 2013.
- CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10689–92, 16 abr. 1999.
- COOPE, H. J.; ATKINSON, P. G. P.; HUHSE, B.; BELICH, M.; JANZEN, J.; HOLMAN, M. J.; KLAUS, G. G. B.; JOHNSTON, L. H.; LEY, S. C. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. **The EMBO journal**, v. 21, n. 20, p. 5375–85, 15 out. 2002.

- COOPER, W. A.; LAM, D. C. L.; O'TOOLE, S. A.; MINNA, J. D. Molecular biology of lung cancer. **Journal of thoracic disease**, v. 5 Suppl 5, n. Suppl 5, p. S479-90, out. 2013.
- COSMIC | Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Disponível em: <a href="https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic">https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic</a>. Acesso em: 10 jul. 2018.
- CORSI, J.-M.; ROUER, E.; GIRAULT, J.-A.; ENSLEN, H. Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 198, 4 ago. 2006.
- COX, A. D.; FESIK, S. W.; KIMMELMAN, A. C.; LUO, J.; DER, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 828–851, 17 nov. 2014.
- DAENEN, L. G. M.; ROODHART, J. M. L.; VAN AMERSFOORT, M.; DEHNAD, M.; ROESSINGH, W.; ULFMAN, L. H.; DERKSEN, P. W. B.; VOEST, E. E. Chemotherapy Enhances Metastasis Formation via VEGFR-1-Expressing Endothelial Cells. **Cancer Research**, v. 71, n. 22, p. 6976–6985, 15 nov. 2011.
- DAMSKY, W. E.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**, v. 33, n. 19, p. 2413–2422, 3 maio 2014.
- DAN, S.; OKAMURA, M.; SEKI, M.; YAMAZAKI, K.; SUGITA, H.; OKUI, M.; MUKAI, Y.; NISHIMURA, H.; ASAKA, R.; NOMURA, K.; ISHIKAWA, Y.; YAMORI, T. Correlating Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor Efficacy with Signaling Pathway Status: In silico and Biological Evaluations. **Cancer Research**, v. 70, n. 12, p. 4982–4994, 15 jun. 2010.
- DEJARDIN, E. The alternative NF-κB pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1161–1179, 30 out. 2006.
- DEJARDIN, E.; DROIN, N. M.; DELHASE, M.; HAAS, E.; CAO, Y.; MAKRIS, C.; LI, Z.-W.; KARIN, M.; WARE, C. F.; GREEN, D. R. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. **Immunity**, v. 17, n. 4, p. 525–35, out. 2002.
- DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; CHEN, Y.; KARIN, M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. **Science** (**New York, N.Y.**), v. 284, n. 5412, p. 309–13, 9 abr. 1999.
- DER, C. J.; COOPER, G. M. Altered gene products are associated with activation of cellular rasK genes in human lung and colon carcinomas. **Cell**, v. 32, n. 1, p. 201–8, jan. 1983.
- DERYUGINA, E. I.; BOURDON, M. A.; LUO, G. X.; REISFELD, R. A.; STRONGIN, A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. **Journal of cell science**, v. 110 (Pt 1, p. 2473–82, out. 1997.
- DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer and Metastasis Reviews, v. 25, n. 1, p. 9–34, mar. 2006.
- DESAI, A.; ADJEI, A. A. FGFR signaling as a target for Lung cancer therapy. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 1, p. 9–20, jun. 2016.
- DIDONATO, J. A.; HAYAKAWA, M.; ROTHWARF, D. M.; ZANDI, E.; KARIN, M. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 548–554, 7 ago. 1997.
- DOLL, R.; PETO, R.; BOREHAM, J.; SUTHERLAND, I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. **BMJ** (Clinical research ed.), v. 328, n. 7455, p. 1519, 26 jun. 2004.

- DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, jan. 2003.
- DRILON, A.; REKHTMAN, N.; LADANYI, M.; PAIK, P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 10, p. e418–e426, out. 2012.
- DURAN, A.; LINARES, J. F.; GALVEZ, A. S.; WIKENHEISER, K.; FLORES, J. M.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J. The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF-κB Mediator in Tumorigenesis. Cancer Cell, v. 13, n. 4, p. 343–354, abr. 2008.
- DURAND, J. K.; BALDWIN, A. S. Targeting IKK and NF-κB for Therapy. In: **Advances in protein chemistry and structural biology**. 107p. 77–115, 2017.
- DUURSMA, A. M.; AGAMI, R. Ras interference as cancer therapy. **Seminars in cancer biology**, v. 13, n. 4, p. 267–73, ago. 2003.
- ERIKSEN, K. T.; HALKJÆR, J.; MELIKER, J. R.; MCELROY, J. A.; SØRENSEN, M.; TJØNNELAND, A.; RAASCHOU-NIELSEN, O. Dietary cadmium intake and risk of prostate cancer: a Danish prospective cohort study. **BMC cancer**, v. 15, p. 177, 26 mar. 2015.
- ESSER, D.; BAUER, B.; WOLTHUIS, R. M. F.; WITTINGHOFER, A.; COOL, R. H.; BAYER, P. Structure Determination of the Ras-Binding Domain of the Ral-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factor Rlf. **Biochemistry**, v. 37, n. 39, p. 13453–13462, 29 set. 1998.
- FANG, H.; DECLERCK, Y. A. Targeting the Tumor Microenvironment: From Understanding Pathways to Effective Clinical Trials. **Cancer Research**, v. 73, n. 16, p. 4965–4977, 15 ago. 2013.
- FERGUSON, K. M.; BERGER, M. B.; MENDROLA, J. M.; CHO, H. S.; LEAHY, D. J.; LEMMON, M. A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. **Molecular cell**, v. 11, n. 2, p. 507–17, fev. 2003.
- FIDLER, I. J. The organ microenvironment and cancer metastasis. **Differentiation**, v. 70, n. 9–10, p. 498–505, dez. 2002.
- FINCO, T. S.; WESTWICK, J. K.; NORRIS, J. L.; BEG, A. A.; DER, C. J.; BALDWIN, A. S. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24113–6, 26 set. 1997.
- FITZMAURICE, C.; NAGHAVI, M. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505, 1 jul. 2015.
- FLEMING, J. B.; SHEN, G.-L.; HOLLOWAY, S. E.; DAVIS, M.; BREKKEN, R. A. Molecular Consequences of Silencing Mutant K-ras in Pancreatic Cancer Cells: Justification for K-ras-Directed Therapy. **Molecular Cancer Research**, v. 3, n. 7, p. 413–423, 1 jul. 2005.
- FORBES, S. A.; BHAMRA, G.; BAMFORD, S.; DAWSON, E.; KOK, C.; CLEMENTS, J.; MENZIES, A.; TEAGUE, J. W.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). In: **Current Protocols in Human Genetics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. Chapter 10p. Unit 10.11.
- FORBES, S. A.; CAMPBELL, P. J. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D805–D811, 28 jan. 2015.
- FRELIN, C.; IMBERT, V.; GRIESSINGER, E.; PEYRON, A.-C.; ROCHET, N.; PHILIP, P.; DAGEVILLE, C.; SIRVENT, A.; HUMMELSBERGER, M.; BÉRARD, E.; DREANO, M.; SIRVENT, N.;

- PEYRON, J.-F. Targeting NF- B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 804–811, 15 jan. 2005.
- FRIDAY, B. B.; ADJEI, A. A. K-ras as a target for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1756, n. 2, p. 127–144, 25 nov. 2005.
- FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 445–457, 1 jul. 2009.
- GARCIA-ROSTAN, G.; ZHAO, H.; CAMP, R. L.; POLLAN, M.; HERRERO, A.; PARDO, J.; WU, R.; CARCANGIU, M. L.; COSTA, J.; TALLINI, G. ras Mutations Are Associated With Aggressive Tumor Phenotypes and Poor Prognosis in Thyroid Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3226–3235, 1 set. 2003.
- GHOSH, S.; KARIN, M. Missing Pieces in the NF-κB Puzzle. Cell, v. 109, n. 2, p. S81–S96, 19 abr. 2002.
- GIAMPIERI, S.; MANNING, C.; HOOPER, S.; JONES, L.; HILL, C. S.; SAHAI, E. Localized and reversible TGFβ signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1287–1296, 18 nov. 2009.
- GILMORE, T. D.; HERSCOVITCH, M. Inhibitors of NF-κB signaling: 785 and counting. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6887–6899, 30 out. 2006.
- GILMORE, T. D.; GERONDAKIS, S. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 7, p. 695–711, 1 jul. 2011.
- GILMORE, T. D. The Rel/NF-κB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6842–6844, 22 nov. 1999.
- GILMORE, T. D.; GARBATI, M. R. Inhibition of NF-κB Signaling as a Strategy in Disease Therapy. In: Current topics in microbiology and immunology. 349p. 245–263, 2010.
- GINSBERG, M. S. Epidemiology of lung cancer. **Seminars in roentgenology**, v. 40, n. 2, p. 83–9, abr. 2005.
- GORFE, A. A.; GRANT, B. J.; MCCAMMON, J. A. Mapping the Nucleotide and Isoform-Dependent Structural and Dynamical Features of Ras Proteins. **Structure**, v. 16, n. 6, p. 885–896, jun. 2008.
- GOUBRAN, H. A.; KOTB, R. R.; STAKIW, J.; EMARA, M. E.; BURNOUF, T. Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 7, p. CGM.S11285, 2 jan. 2014.
- GOVINDAN, R.; WILSON, R. K. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1121–1134, 14 set. 2012.
- GRETEN, F. R.; ECKMANN, L.; GRETEN, T. F.; PARK, J. M.; LI, Z.-W.; EGAN, L. J.; KAGNOFF, M. F.; KARIN, M. IKKβ Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 285–296, 6 ago. 2004.
- GRIDELLI, C.; MAIONE, P.; ROSSI, A. The Potential Role of mTOR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. **The Oncologist**, v. 13, n. 2, p. 139–147, 1 fev. 2008.
- GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, set. 2015.
- GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; REUTER, S.; KANNAPPAN, R.; YADAV, V. R.; RAVINDRAN, J.; HEMA, P. S.; CHATURVEDI, M. M.; NAIR, M.; AGGARWAL, B. B. Modification of cysteine 179 of IkappaBalpha kinase by nimbolide leads to down-regulation of NF-kappaB-regulated cell survival and

- proliferative proteins and sensitization of tumor cells to chemotherapeutic agents. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35406–17, 12 nov. 2010.
- GUPTA, S.; RAMJAUN, A. R.; HAIKO, P.; WANG, Y.; WARNE, P. H.; NICKE, B.; NYE, E.; STAMP, G.; ALITALO, K.; DOWNWARD, J. Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110α Is Required for Ras- Driven Tumorigenesis in Mice. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 957–968, 1 jun. 2007.
- HABU, S.; FUKUI, H.; SHIMAMURA, K.; KASAI, M.; NAGAI, Y.; OKUMURA, K.; TAMAOKI, N. In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 127, n. 1, p. 34–8, jul. 1981.
- HACKER, H.; KARIN, M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. **Science's STKE**, v. 2006, n. 357, p. re13-re13, 10 out. 2006.
- HADLER-OLSEN, E.; WINBERG, J.-O.; UHLIN-HANSEN, L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumor Biology**, v. 34, n. 4, p. 2041–2051, 17 ago. 2013.
- HALL, A. The ras gene family. Oxford surveys on eukaryotic genes, v. 1, p. 111–44, 1984.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HANCOCK, J. F.; CADWALLADER, K.; PATERSON, H.; MARSHALL, C. J. A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. **The EMBO journal**, v. 10, n. 13, p. 4033–9, dez. 1991.
- HARRIS, J.; OLIÈRE, S.; SHARMA, S.; SUN, Q.; LIN, R.; HISCOTT, J.; GRANDVAUX, N. Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 177, n. 4, p. 2527–35, 15 ago. 2006.
- HARVEY, J. J. AN UNIDENTIFIED VIRUS WHICH CAUSES THE RAPID PRODUCTION OF TUMOURS IN MICE. **Nature**, v. 204, p. 1104–5, 12 dez. 1964.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & Development**, v. 26, n. 3, p. 203–234, 1 fev. 2012.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF-κB Signaling. Cell, v. 132, n. 3, p. 344–362, 8 fev. 2008. HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. Genes & development, v. 18, n. 18, p. 2195–224, 15 set. 2004.
- HE, D.; LI, H.; YUSUF, N.; ELMETS, C. A.; LI, J.; MOUNTZ, J. D.; XU, H. IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid-Derived Suppressor Cells. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2281–2288, 1 mar. 2010.
- HIDESHIMA, T.; NERI, P.; TASSONE, P.; YASUI, H.; ISHITSUKA, K.; RAJE, N.; CHAUHAN, D.; PODAR, K.; MITSIADES, C.; DANG, L.; MUNSHI, N.; RICHARDSON, P.; SCHENKEIN, D.; ANDERSON, K. C. MLN120B, a Novel I B Kinase Inhibitor, Blocks Multiple Myeloma Cell Growth In vitro and In vivo. Clinical Cancer Research, v. 12, n. 19, p. 5887–5894, 1 out. 2006.
- HINZ, M.; SCHEIDEREIT, C. The IκB kinase complex in NF-κB regulation and beyond. **EMBO reports**, v. 15, n. 1, p. 46–61, jan. 2014.

- HOBBS, G. A.; DER, C. J.; ROSSMAN, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 7, p. 1287–1292, 1 abr. 2016.
- HU, H.-Y.; SUN, H.; ZOU, D.-B.; SUN, L.; ZHANG, L.; JIA, Y.-L. [Expression of nuclear factor-kappaB in bone marrow cells from patients with acute leukemia and its relationship with P21, MMP-2 and MMP-9.] **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, v. 11, n. 3, p. 243–5, jun. 2003.
- HU, Y.-Y.; ZHENG, M.; ZHANG, R.; LIANG, Y.-M.; HAN, H. Notch Signaling Pathway and Cancer Metastasis. In: **Advances in experimental medicine and biology**. 727p. 186–198, 2012.
- HUANG, H. C.; NGUYEN, T.; PICKETT, C. B. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12475–80, 7 nov. 2000.
- HUANG, S. C. M.; TSAO, S. W.; TSANG, C. M. Interplay of Viral Infection, Host Cell Factors and Tumor Microenvironment in the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma. **Cancers**, v. 10, n. 4, 4 abr. 2018.
- HUBER, M. A.; AZOITEI, N.; BAUMANN, B.; GRÜNERT, S.; SOMMER, A.; PEHAMBERGER, H.; KRAUT, N.; BEUG, H.; WIRTH, T. NF-κB 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, 16 ago. 2004.
- HUNTER, J. E.; LESLIE, J.; PERKINS, N. D. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 1, p. 1–6, 12 jan. 2016.
- IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. A review of human carcinogens. Personal habits and indoor combustions. International Agency for Research on Cancer, 2012.
- IHLE, N. T.; LEMOS, R.; WIPF, P.; YACOUB, A.; MITCHELL, C.; SIWAK, D.; MILLS, G. B.; DENT, P.; KIRKPATRICK, D. L.; POWIS, G. Mutations in the Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Predict for Antitumor Activity of the Inhibitor PX-866 whereas Oncogenic Ras Is a Dominant Predictor for Resistance. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 143–150, 1 jan. 2009.
- INCA CÂNCER Tipo Pulmão. Disponível em: <a href="http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/definicao">http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/definicao</a>. Acesso em: 16 maio. 2018.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC** monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. International Agency for Research on Cancer, 1972.
- IRELAN, J. T.; MURPHY, T. J.; DEJESUS, P. D.; TEO, H.; XU, D.; GOMEZ-FERRERIA, M. A.; ZHOU, Y.; MIRAGLIA, L. J.; RINES, D. R.; VERMA, I. M.; SHARP, D. J.; TERGAONKAR, V.; CHANDA, S. K. A role for I B kinase 2 in bipolar spindle assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 43, p. 16940–16945, 23 out. 2007.
- JACKSON, J. H.; LI, J. W.; BUSS, J. E.; DER, C. J.; COCHRANE, C. G. Polylysine domain of K-ras 4B protein is crucial for malignant transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12730–4, 20 dez. 1994.
- JANES, M. R.; LIU, Y. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 578–589.e17, 25 jan. 2018.
- JANG, T. W.; OAK, C. H.; CHANG, H. K.; SUO, S. J.; JUNG, M. H. EGFR and KRAS mutations in patients with adenocarcinoma of the lung. **The Korean journal of internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 48–54, mar. 2009.

- JANIK, M. E.; LITYŃSKA, A.; VEREECKEN, P. Cell migration—The role of integrin glycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects**, v. 1800, n. 6, p. 545–555, jun. 2010.
- JHA, P. Avoidable global cancer deaths and total deaths from smoking. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 9, p. 655–664, 20 set. 2009.
- JIANG, W. G.; ABLIN, R. J. Cancer metastasis, challenges, progress and the opportunities. **Frontiers in bioscience**, v. 3, p. 391–4, 1 jan. 2011.
- JIANG, Y.; CUI, L.; YIE, T.-A.; ROM, W. N.; CHENG, H.; TCHOU-WONG, K.-M. Inhibition of anchorage-independent growth and lung metastasis of A549 lung carcinoma cells by IκBβ. **Oncogene**, v. 20, n. 18, p. 2254–2263, 26 abr. 2001.
- JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 12 abr. 2009.
- JUNG, O.; LEE, J.; LEE, Y. J.; YUN, J.-M.; SON, Y.-J.; CHO, J. Y.; RYOU, C.; LEE, S. Y. Timosaponin AIII inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and β-catenin signaling pathways. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 16, p. 3963–3967, 15 ago. 2016.
- KARIN, M. How NF-κB is activated: the role of the IκB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867–6874, 22 nov. 1999.
- KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-κB Activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 621–663, 28 abr. 2000.
- KARIN, M.; CAO, Y.; GRETEN, F. R.; LI, Z.-W. NF-κB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 301–310, abr. 2002.
- KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749–759, 20 out. 2005.
- KAWAUCHI, K.; ARAKI, K.; TOBIUME, K.; TANAKA, N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-κB pathway and inhibits cell transformation. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 611–618, 6 maio 2008.
- KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2 abr. 2010.
- KHALID, A.; ASIM JAVAID, M. Matrix Metalloproteinases: New Targets in Cancer Therapy. **Journal of Cancer Science & Therapy**, 2016.
- KIENAST, Y.; VON BAUMGARTEN, L.; FUHRMANN, M.; KLINKERT, W. E. F.; GOLDBRUNNER, R.; HERMS, J.; WINKLER, F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, p. 116–122, 20 jan. 2010.
- KIERAN, M.; BLANK, V.; LOGEAT, F.; VANDEKERCKHOVE, J.; LOTTSPEICH, F.; LE BAIL, O.; URBAN, M. B.; KOURILSKY, P.; BAEUERLE, P. A.; ISRAËL, A. The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. **Cell**, v. 62, n. 5, p. 1007–18, 7 set. 1990.
- KIM, E. S.; KIES, M. S.; FOSSELLA, F. V.; GLISSON, B. S.; ZAKNOEN, S.; STATKEVICH, P.; MUNDEN, R. F.; SUMMEY, C.; PISTERS, K. M. W.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V.; TIGHIOUART, M.; ROGATKO, A.; KHURI, F. R. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel in patients with taxane-refractory/resistant nonsmall cell lung carcinoma. Cancer, v. 104, n. 3, p. 561–569, 1 ago. 2005.

- KIM, T.-K.; GREENBERG, M. E. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. **Nature**, v. 465, n. 7295, p. 182–187, 14 maio 2010.
- KINBARA, K.; GOLDFINGER, L. E.; HANSEN, M.; CHOU, F.-L.; GINSBERG, M. H. Ras GTPases: integrins' friends or foes? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 10, p. 767–778, out. 2003.
- KINGETER, L. M.; SCHAEFER, B. C. Malt1 and cIAP2–Malt1 as effectors of NF-κB activation: Kissing cousins or distant relatives? **Cellular Signalling**, v. 22, n. 1, p. 9–22, jan. 2010.
- KIRSTEN, W. H.; SCHAUF, V.; MCCOY, J. Properties of a murine sarcoma virus. **Bibliotheca** haematologica, n. 36, p. 246–9, 1970.
- KONSTANTINIDOU, G.; RAMADORI, G.; TORTI, F.; KANGASNIEMI, K.; RAMIREZ, R. E.; CAI, Y.; BEHRENS, C.; DELLINGER, M. T.; BREKKEN, R. A.; WISTUBA, I. I.; HEGUY, A.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; SCAGLIONI, P. P. RHOA-FAK Is a Required Signaling Axis for the Maintenance of KRAS-Driven Lung Adenocarcinomas. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 4, p. 444–457, abr. 2013.
- KOTTING, C.; KALLENBACH, A.; SUVEYZDIS, Y.; WITTINGHOFER, A.; GERWERT, K. The GAP arginine finger movement into the catalytic site of Ras increases the activation entropy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 17, p. 6260–6265, 29 abr. 2008.
- KRTOLICA, K.; KRAJNOVIC, M.; USAJ-KNEZEVIC, S.; BABIC, D.; JOVANOVIC, D.; DIMITRIJEVIC, B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 8, p. 1187–94, 28 fev. 2007.
- LAM, W. K.; WHITE, N. W.; CHAN-YEUNG, M. M. Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, v. 8, n. 9, p. 1045–57, set. 2004.
- LEE, B. Y.; TIMPSON, P.; HORVATH, L. G.; DALY, R. J. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 146, p. 132–149, fev. 2015.
- LEMJABBAR-ALAOUI, H.; HASSAN, O. U.; YANG, Y.-W.; BUCHANAN, P. Lung cancer: Biology and treatment options. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 2, p. 189–210, dez. 2015.
- LI, D.-M.; FENG, Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 128, n. 1, p. 7–21, 16 jul. 2011.
- LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 10, p. 1113–1126, 24 out. 2008.
- LI, Q.; WITHOFF, S.; VERMA, I. M. Inflammation-associated cancer: NF-κB is the lynchpin. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 318–325, 1 jun. 2005.
- LI, S.; HUANG, X.; ZHANG, D.; HUANG, Q.; PEI, G.; WANG, L.; JIANG, W.; HU, Q.; TAN, R.; HUA, Z.-C. Requirement of PEA3 for Transcriptional Activation of FAK Gene in Tumor Metastasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79336, 18 nov. 2013.
- LI, X.-X.; LI, R.-J.; ZHAO, L.-J.; LIU, N.-B.; WANG, P. Expression of molecular factors correlated with metastasis in small cell lung cancer and their significance. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 11, p. 14676–84, 2015.

- LI, Y.; YANG, F.; ZHENG, W.; HU, M.; WANG, J.; MA, S.; DENG, Y.; LUO, Y.; YE, T.; YIN, W. Punica granatum (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 227–235, maio 2016.
- LI, Z.; YANG, Z.; PASSANITI, A.; LAPIDUS, R. G.; LIU, X.; CULLEN, K. J.; DAN, H. C. A positive feedback loop involving EGFR/Akt/mTORC1 and IKK/NF-kB regulates head and neck squamous cell carcinoma proliferation. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 31892–906, 31 maio 2016.
- LIN, H.-H.; CHEN, J.-H.; CHOU, F.-P.; WANG, C.-J. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-κB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 237–254, jan. 2011.
- LING, J.; KANG, Y.; ZHAO, R.; XIA, Q.; LEE, D.-F.; CHANG, Z.; LI, J.; PENG, B.; FLEMING, J. B.; WANG, H.; LIU, J.; LEMISCHKA, I. R.; HUNG, M.-C.; CHIAO, P. J. KrasG12D-Induced IKK2/β/NF-κB Activation by IL-1α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 21, n. 1, p. 105–120, 17 jan. 2012.
- LIU, Y.; LI, S. Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in Drosophila. **Development**, v. 136, n. 12, p. 2015–2025, 15 jun. 2009.
- LIU, Y.; YIN, C. miR-134 Functions as a Tumor Suppressor in Cell Proliferation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting KRAS in Renal Cell Carcinoma Cells. **DNA and Cell Biology**, v. 34, n. 6, p. 429–436, jun. 2015.
- LIU, Z.; XU, S.; XIAO, N.; SONG, C.; ZHANG, H.; LI, F. [Overexpression of IL-8 and MMP-9 confer high malignant phenotype in patients with non-small cell lung cancer]. **Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer**, v. 13, n. 8, p. 795–802, ago. 2010.
- LOBELL, R. B.; KOHL, N. E. Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. **Cancer research**, v. 61, n. 24, p. 8758–68, 15 dez. 2001.
- LOBELL, R. B.; KOHL, N. E. Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778,123, a dual inhibitor of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase type-I. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 9, p. 747–58, jul. 2002.
- LOBO, S.; GREENTREE, W. K.; LINDER, M. E.; DESCHENES, R. J. Identification of a Ras Palmitoyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 41268–41273, 25 out. 2002.
- LOCK, R.; KENIFIC, C. M.; LEIDAL, A. M.; SALAS, E.; DEBNATH, J. Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 4, p. 466–479, 1 abr. 2014.
- LOIRAND, G.; SAUZEAU, V.; PACAUD, P. Small G Proteins in the Cardiovascular System: Physiological and Pathological Aspects. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1659–1720, out. 2013.
- LONG, H.; XIE, R.; XIANG, T.; ZHAO, Z.; LIN, S.; LIANG, Z.; CHEN, Z.; ZHU, B. Autocrine CCL5 Signaling Promotes Invasion and Migration of CD133 + Ovarian Cancer Stem-Like Cells via NF-κB-Mediated MMP-9 Upregulation. **STEM CELLS**, v. 30, n. 10, p. 2309–2319, out. 2012.
- LOWENSTEIN, E. J.; DALY, R. J.; BATZER, A. G.; LI, W.; MARGOLIS, B.; LAMMERS, R.; ULLRICH, A.; SKOLNIK, E. Y.; BAR-SAGI, D.; SCHLESSINGER, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 431–42, 7 ago. 1992.

- LUO, J.-L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 10, p. 2625–32, 3 out. 2005.
- LUPPI, F.; LONGO, A. M.; DE BOER, W. I.; RABE, K. F.; HIEMSTRA, P. S. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 56, n. 1, p. 25–33, 1 abr. 2007.
- MACALUSO, M.; RUSSO, G.; CINTI, C.; BAZAN, V.; GEBBIA, N.; RUSSO, A. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 2, p. 125–130, ago. 2002.
- MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13375–8, 29 maio 1998.
- MASCAUX, C.; IANNINO, N.; MARTIN, B.; PAESMANS, M.; BERGHMANS, T.; DUSART, M.; HALLER, A.; LOTHAIRE, P.; MEERT, A.-P.; NOEL, S.; LAFITTE, J.-J.; SCULIER, J.-P. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 1, p. 131–139, 14 jan. 2005.
- MAURER, T.; FANG, G. Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5299–5304, 3 abr. 2012.
- MAY, M. J.; LARSEN, S. E.; SHIM, J. H.; MADGE, L. A.; GHOSH, S. A novel ubiquitin-like domain in IkappaB kinase beta is required for functional activity of the kinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45528–39, 29 out. 2004.
- MCERLEAN, A.; GINSBERG, M. S. Epidemiology of lung cancer. **Seminars in roentgenology**, v. 46, n. 3, p. 173–7, 1 jul. 2011.
- MERCHANT, N.; NAGARAJU, G. P.; RAJITHA, B.; LAMMATA, S.; JELLA, K. K.; BUCHWALD, Z. S.; LAKKA, S. S.; ALI, A. N. Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 8, p. 766–780, 1 ago. 2017.
- MERCURIO, F.; ZHU, H.; MURRAY, B. W.; SHEVCHENKO, A.; BENNETT, B. L.; LI, J.; YOUNG, D. B.; BARBOSA, M.; MANN, M.; MANNING, A.; RAO, A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5339, p. 860–6, 31 out. 1997.
- MEYLAN, E.; DOOLEY, A. L.; FELDSER, D. M.; SHEN, L.; TURK, E.; OUYANG, C.; JACKS, T. Requirement for NF-κB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 462, n. 7269, p. 104–107, 21 nov. 2009.
- MITRA, S. K.; LIM, S.-T.; CHI, A.; SCHLAEPFER, D. D. Intrinsic focal adhesion kinase activity controls orthotopic breast carcinoma metastasis via the regulation of urokinase plasminogen activator expression in a syngeneic tumor model. **Oncogene**, v. 25, n. 32, p. 4429–4440, 20 jul. 2006.
- MIZUMOTO, Y.; KYO, S.; KIYONO, T.; TAKAKURA, M.; NAKAMURA, M.; MAIDA, Y.; MORI, N.; BONO, Y.; SAKURAI, H.; INOUE, M. Activation of NF-κB Is a Novel Target of KRAS -Induced Endometrial Carcinogenesis. Clinical Cancer Research, v. 17, n. 6, p. 1341–1350, 15 mar. 2011. MOORES, S. L.; SCHABER, M. D.; MOSSER, S. D.; RANDS, E.; O'HARA, M. B.; GARSKY, V. M.; MARSHALL, M. S.; POMPLIANO, D. L.; GIBBS, J. B. Sequence dependence of protein isoprenylation. The Journal of biological chemistry, v. 266, n. 22, p. 14603–10, 5 ago. 1991.

- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 15 fev. 2006.
- NAWROCKI, B.; POLETTE, M.; MARCHAND, V.; MONTEAU, M.; GILLERY, P.; TOURNIER, J. M.; BIREMBAUT, P. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses. **International journal of cancer**, v. 72, n. 4, p. 556–64, 7 ago. 1997.
- NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274–284, 1 abr. 2009.
- NUSSINOV, R.; TSAI, C.-J.; JANG, H. Oncogenic Ras Isoforms Signaling Specificity at the Membrane. **Cancer Research**, v. 78, n. 3, p. 593–602, 1 fev. 2018.
- OGISO, H.; ISHITANI, R.; NUREKI, O.; FUKAI, S.; YAMANAKA, M.; KIM, J.-H.; SAITO, K.; SAKAMOTO, A.; INOUE, M.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 775–87, 20 set. 2002.
- PAGE, A.; NAVARRO, M.; SUÁREZ-CABRERA, C.; BRAVO, A.; RAMIREZ, A. Context-Dependent Role of IKKβ in Cancer. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 376, 8 dez. 2017.
- PAIK, P. K.; JOHNSON, M. L.; D'ANGELO, S. P.; SIMA, C. S.; ANG, D.; DOGAN, S.; MILLER, V. A.; LADANYI, M.; KRIS, M. G.; RIELY, G. J. Driver mutations determine survival in smokers and never-smokers with stage IIIB/IV lung adenocarcinomas. **Cancer**, v. 118, n. 23, p. 5840–5847, 1 dez. 2012.
- PAK, C.; MIYAMOTO, S. A New Alpha in Line Between KRAS and NF-κB Activation? **Cancer Discovery**, v. 3, n. 6, p. 613–615, 6 jun. 2013.
- PARKER, J. A.; MATTOS, C. The Ras–Membrane Interface: Isoform-Specific Differences in the Catalytic Domain. **Molecular Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 595–603, abr. 2015.
- PLANCHARD, D.; JOHNSON, B. E. Dabrafenib in patients with BRAFV600E-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 5, p. 642–650, maio 2016.
- POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265–273, 5 abr. 2009.
- PRIOR, I. A.; HANCOCK, J. F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 2, p. 145–153, abr. 2012.
- PRIOR, I. A.; LEWIS, P. D.; MATTOS, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. **Cancer research**, v. 72, n. 10, p. 2457–67, 15 maio 2012.
- PRITCHARD, S. C.; NICOLSON, M. C.; LLORET, C.; MCKAY, J. A.; ROSS, V. G.; KERR, K. M.; MURRAY, G. I.; MCLEOD, H. L. Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their tissue inhibitors in stage II non-small cell lung cancer: implications for MMP inhibition therapy. **Oncology reports**, v. 8, n. 2, p. 421–4, 2001.
- PROFUMO, V.; GANDELLINI, P. MicroRNAs: cobblestones on the road to cancer metastasis. **Critical reviews in oncogenesis**, v. 18, n. 4, p. 341–55, 2013.
- PUIG, P.; URGELL, E.; CAPELLÁ, G.; SANCHO, F. J.; PUJOL, J.; BOADAS, J.; FARRÉ, A.; LLUÍS, F.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; MORA, J. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is

- useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. **International journal of cancer**, v. 85, n. 1, p. 73–7, 1 jan. 2000.
- PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, 13 nov. 2011.
- QUINLAN, M. P.; SETTLEMAN, J. Explaining the preponderance of Kras mutations in human cancer: An isoform-specific function in stem cell expansion. **Cell Cycle**, v. 7, n. 10, p. 1332–1335, 15 maio 2008.
- RAIMONDI, A. R.; VITALE-CROSS, L.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; GUTKIND, J. S.; MOLINOLO, A. Rapid development of salivary gland carcinomas upon conditional expression of K-ras driven by the cytokeratin 5 promoter. **The American journal of pathology**, v. 168, n. 5, p. 1654–65, maio 2006.
- RAYET, B.; GÉLINAS, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6938–6947, 22 nov. 1999.
- REDDY, B. Y.; LIM, P. K.; SILVERIO, K.; PATEL, S. A.; WON, B. W.; RAMESHWAR, P. The Microenvironmental Effect in the Progression, Metastasis, and Dormancy of Breast Cancer: A Model System within Bone Marrow. **International journal of breast cancer**, v. 2012, p. 721659, 2012.
- RESH, M. D. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. **Sub-cellular biochemistry**, v. 37, p. 217–32, 2004.
- REUTHER, J. Y.; REUTHER, G. W.; CORTEZ, D.; PENDERGAST, A. M.; BALDWIN, A. S. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. **Genes & development**, v. 12, n. 7, p. 968–81, 1 abr. 1998.
- RIELY, G. J.; MARKS, J.; PAO, W. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 6, n. 2, p. 201–205, 15 abr. 2009.
- RIELY, G. J.; JOHNSON, M. L.; MEDINA, C.; RIZVI, N. A.; MILLER, V. A.; KRIS, M. G.; PIETANZA, M. C.; AZZOLI, C. G.; KRUG, L. M.; PAO, W.; GINSBERG, M. S. A Phase II Trial of Salirasib in Patients with Lung Adenocarcinomas with KRAS Mutations. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 6, n. 8, p. 1435–1437, ago. 2011.
- RODRIGUES, Felipe Silva. Explorando a quinase IKKβ como um alvo terapêutico para células iniciadoras de tumor pulmonares induzidas pelo oncogene KRAS. 2018. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ROTBLAT, B.; EHRLICH, M.; HAKLAI, R.; KLOOG, Y. The Ras Inhibitor Farnesylthiosalicylic Acid (Salirasib) Disrupts The Spatiotemporal Localization Of Active Ras: A Potential Treatment For Cancer. In: **Methods in enzymology**. 439p. 467–489, 2008.
- ROTHWARF, D. M.; ZANDI, E.; NATOLI, G.; KARIN, M. IKK-γ is an essential regulatory subunit of the IκB kinase complex. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 297–300, 17 set. 1998.
- SAKAMOTO, S.; KYPRIANOU, N. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 2, p. 205–214, abr. 2010.
- SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 2979–2999, 31 out. 2008.
- SAXENA, N.; LAHIRI, S. S.; HAMBARDE, S.; TRIPATHI, R. P. RAS: Target for Cancer Therapy. **Cancer Investigation**, v. 26, n. 9, p. 948–955, 11 jan. 2008.

- SAXENA, N.; LAHIRI, S. S.; HAMBARDE, S.; TRIPATHI, R. P. RAS: Target for Cancer Therapy. **Cancer Investigation**, v. 26, n. 9, p. 948–955, 11 jan. 2008.
- SCHUTZ; T. Z. A.; SCHNEIDENBACH, D.; AUST, G.; TANNAPFEL, A.; STEINERT, M.; WITTEKIND, C. Differential Expression and Activity Status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in Tumor and Stromal Cells of Squamous Cell Carcinomas of the Lung. **Tumor Biology**, v. 23, n. 3, p. 179–184, 2002.
- SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M. R.; KABSCH, W.; WIESMÜLLER, L.; LAUTWEIN, A.; SCHMITZ, F.; WITTINGHOFER, A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5324, p. 333–8, 18 jul. 1997.
- SCHEIDEREIT, C. IκB kinase complexes: gateways to NF-κB activation and transcription. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6685–6705, 30 out. 2006.
- SCHLAEPFER, D. D.; JONES, K. C.; HUNTER, T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 5, p. 2571–85, maio 1998.
- SCHMID, J. A.; BIRBACH, A. IkB kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ /IKK2/IKBKB)—A key molecule in signaling to the transcription factor NF-kB. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 2, p. 157–165, abr. 2008.
- SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921–928, 26 dez. 1986.
- SESHACHARYULU, P.; PONNUSAMY, M. P.; HARIDAS, D.; JAIN, M.; GANTI, A. K.; BATRA, S. K. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 1, p. 15–31, 12 jan. 2012.
- SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241–253, 19 abr. 2010.
- SHI, M.; CAO, M.; SONG, J.; LIU, Q.; LI, H.; MENG, F.; PAN, Z.; BAI, J.; ZHENG, J. PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF-κB/MMP-9 signaling pathway. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 66, 26 dez. 2015.
- SHIELDS, J. M.; PRUITT, K.; MCFALL, A.; SHAUB, A.; DER, C. J. Understanding Ras: 'it ain't over "til it's over". **Trends in cell biology**, v. 10, n. 4, p. 147–54, abr. 2000.
- SHIRASAWA, S.; FURUSE, M.; YOKOYAMA, N.; SASAZUKI, T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. **Science** (**New York, N.Y.**), v. 260, n. 5104, p. 85–8, 2 abr. 1993.
- SHUMAN MOSS, L. A.; JENSEN-TAUBMAN, S.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix Metalloproteinases. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 6, p. 1895–1899, dez. 2012.
- SIL, A. K.; MAEDA, S.; SANO, Y.; ROOP, D. R.; KARIN, M. IkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. **Nature**, v. 428, n. 6983, p. 660–4, 8 abr. 2004.
- SIMON, M. A.; DODSON, G. S.; RUBIN, G. M. An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 169–77, 9 abr. 1993.
- SINGH, H.; LONGO, D. L.; CHABNER, B. A. Improving Prospects for Targeting RAS. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, p. 3650–3659, 1 nov. 2015.

- SLOTTA, C.; STORM, J.; PFISTERER, N.; HENKEL, E.; KLEINWÄCHTER, S.; PIEPER, M.; RUIZ-PERERA, L. M.; GREINER, J. F. W.; KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. IKK1/2 protect human cells from TNF-mediated RIPK1-dependent apoptosis in an NF-κB-independent manner. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 8, p. 1025–1033, ago. 2018.
- SMAKMAN, N.; VEENENDAAL, L. M.; VAN DIEST, P.; BOS, R.; OFFRINGA, R.; BOREL RINKES, I. H. M.; KRANENBURG, O. Dual effect of KrasD12 knockdown on tumorigenesis: increased immune-mediated tumor clearance and abrogation of tumor malignancy. **Oncogene**, v. 24, n. 56, p. 8338–8342, 8 dez. 2005.
- SOSMAN, J. A.; RIBAS, A. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 8, p. 707–714, 23 fev. 2012.
- SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 447–458, nov. 2004.
- SPOERNER, M.; HERRMANN, C.; VETTER, I. R.; KALBITZER, H. R.; WITTINGHOFER, A. Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 4944–4949, 24 abr. 2001.
- STEIN, B.; BALDWIN, A. S. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 11, p. 7191–8, nov. 1993.
- SULZMAIER, F. J.; JEAN, C.; SCHLAEPFER, D. D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 9, p. 598–610, 7 set. 2014.
- SUN, Q.; BURKE, J. P.; PHAN, J.; BURNS, M. C.; OLEJNICZAK, E. T.; WATERSON, A. G.; LEE, T.; ROSSANESE, O. W.; FESIK, S. W. Discovery of Small Molecules that Bind to K-Ras and Inhibit Sos-Mediated Activation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 25, p. 6140–6143, 18 jun. 2012.
- SUNAGA, N.; KAIRA, K.; TOMIZAWA, Y.; SHIMIZU, K.; IMAI, H.; TAKAHASHI, G.; KAKEGAWA, S.; OHTAKI, Y.; NAGASHIMA, T.; KASAHARA, N.; KAWASHIMA, O.; HISADA, T.; SAITO, R.; YAMADA, M. Clinicopathological and prognostic significance of interleukin-8 expression and its relationship to KRAS mutation in lung adenocarcinoma. **British journal of cancer**, v. 110, n. 8, p. 2047–53, 15 abr. 2014.
- SWARTHOUT, J. T.; LOBO, S.; FARH, L.; CROKE, M. R.; GREENTREE, W. K.; DESCHENES, R. J.; LINDER, M. E. DHHC9 and GCP16 Constitute a Human Protein Fatty Acyltransferase with Specificity for H- and N-Ras. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 31141–31148, 2 set. 2005.
- TAKAHASHI, H.; OGATA, H.; NISHIGAKI, R.; BROIDE, D. H.; KARIN, M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. **Cancer cell**, v. 17, n. 1, p. 89–97, 19 jan. 2010.
- TALMADGE, J. E.; MEYERS, K. M.; PRIEUR, D. J.; STARKEY, J. R. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. **Nature**, v. 284, n. 5757, p. 622–4, 17 abr. 1980.
- TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793–804, mar. 2007.

- TAN, Y. K.; WEE, T. C.; KOH, W. P.; WANG, Y. T.; ENG, P.; TAN, W. C.; SEOW, A. Survival among Chinese women with lung cancer in Singapore: a comparison by stage, histology and smoking status. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 40, n. 3, p. 237–46, jun. 2003.
- TUVESON, D. A.; JACKS, T. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. **Cancer cell**, v. 5, n. 4, p. 375–87, abr. 2004.
- UEKITA, T.; FUJII, S.; MIYAZAWA, Y.; IWAKAWA, R.; NARISAWA-SAITO, M.; NAKASHIMA, K.; TSUTA, K.; TSUDA, H.; KIYONO, T.; YOKOTA, J.; SAKAI, R. Oncogenic Ras/ERK Signaling Activates CDCP1 to Promote Tumor Invasion and Metastasis. **Molecular Cancer Research**, v. 12, n. 10, p. 1449–1459, out. 2014.
- VALENTINO, J. D.; ELLIOTT, V. A.; ZAYTSEVA, Y. Y.; RYCHAHOU, P. G.; MUSTAIN, W. C.; WANG, C.; GAO, T.; EVERS, B. M. Novel small interfering RNA cotargeting strategy as treatment for colorectal cancer. **Surgery**, v. 152, n. 2, p. 277–285, ago. 2012.
- VASAN, N.; BOYER, J. L.; HERBST, R. S. A RAS Renaissance: Emerging Targeted Therapies for KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 15, p. 3921–3930, 1 ago. 2014.
- VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299–1304, 9 nov. 2001.
- VITALE-CROSS, L.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; FISHER, G.; MOLINOLO, A. A.; GUTKIND, J. S. Conditional Expression of K- ras in an Epithelial Compartment that Includes the Stem Cells Is Sufficient to Promote Squamous Cell Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 64, n. 24, p. 8804–8807, 15 dez. 2004.
- VOICE, J. K.; KLEMKE, R. L.; LE, A.; JACKSON, J. H. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 24, p. 17164–70, 11 jun. 1999.
- WAHLSTROM, A. M.; CUTTS, B. A.; KARLSSON, C.; ANDERSSON, K. M. E.; LIU, M.; SJOGREN, A.-K. M.; SWOLIN, B.; YOUNG, S. G.; BERGO, M. O. Rce1 deficiency accelerates the development of K-RAS-induced myeloproliferative disease. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 763–768, 15 jan. 2007. WAHLSTROM, A. M.; CUTTS, B. A.; LIU, M.; LINDSKOG, A.; KARLSSON, C.; SJOGREN, A.-K. M.; ANDERSSON, K. M. E.; YOUNG, S. G.; BERGO, M. O. Inactivating Icmt ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1357–1365, 13 maio 2008.
- WALTER, F. M.; RUBIN, G.; BANKHEAD, C.; MORRIS, H. C.; HALL, N.; MILLS, K.; DOBSON, C.; RINTOUL, R. C.; HAMILTON, W.; EMERY, J. Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. S1, p. S6–S13, 3 mar. 2015.
- WANG, S.; WANG, Z. Meta-analysis of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Gene Status between Primary and Corresponding Metastatic Tumours of Non-small Cell Lung Cancer. **Clinical Oncology**, v. 27, n. 1, p. 30–39, jan. 2015.
- WANG, X.; ZHENG, Y.; FAN, Q.; ZHANG, X.; SHI, Y. siRNA blocking the RAS signalling pathway and inhibits the growth of oesophageal squamous cell carcinoma in nude mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 32, n. 8, p. 625–629, dez. 2014.
- WANG, Y.; KAISER, C. E.; FRETT, B.; LI, H. Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapeutics: A Review of Novel Small Molecule Modulators. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5219–5230, 11 jul. 2013.

- WEISS, F. U.; DAUB, H.; ULLRICH, A. Novel mechanisms of RTK signal generation. **Current opinion in genetics & development**, v. 7, n. 1, p. 80–6, fev. 1997.
- WHITE, D. E.; MULLER, W. J. Multifaceted Roles of Integrins in Breast Cancer Metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 12, n. 2–3, p. 135–142, 3 ago. 2007.
- WHO | Cancer. WHO, 2018. Disponível em: <a href="http://www.who.int/cancer/en/">http://www.who.int/cancer/en/</a>. Acesso em: 16 maio. 2018.
- WHYTE, D. B.; KIRSCHMEIER, P.; HOCKENBERRY, T. N.; NUNEZ-OLIVA, I.; JAMES, L.; CATINO, J. J.; BISHOP, W. R.; PAI, J. K. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14459–64, 30 maio 1997.
- WILHELMSEN, K. C.; EGGLETON, K.; TEMIN, H. M. Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene c-rel. **Journal of virology**, v. 52, n. 1, p. 172–82, out. 1984.
- WINER, A.; ADAMS, S.; MIGNATTI, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 1147–1155, jun. 2018.
- WISLEZ, M.; SPENCER, M. L.; IZZO, J. G.; JUROSKE, D. M.; BALHARA, K.; CODY, D. D.; PRICE, R. E.; HITTELMAN, W. N.; WISTUBA, I. I.; KURIE, J. M. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Reverses Alveolar Epithelial Neoplasia Induced by Oncogenic K-ras. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3226–3235, 15 abr. 2005.
- WRIGHT, L. P.; PHILIPS, M. R. Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications CAAX modification and membrane targeting of Ras. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 5, p. 883–891, maio 2006.
- WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF-α/NF-κB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **British Journal** of Cancer, v. 102, n. 4, p. 639–644, 19 fev. 2010.
- XIA, Y.; YEDDULA, N.; LEBLANC, M.; KE, E.; ZHANG, Y.; OLDFIELD, E.; SHAW, R. J.; VERMA, I. M. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 257–265, 12 mar. 2012.
- XU, J.; HEDBERG, C.; DEKKER, F. J.; LI, Q.; HAIGIS, K. M.; HWANG, E.; WALDMANN, H.; SHANNON, K. Inhibiting the palmitoylation/depalmitoylation cycle selectively reduces the growth of hematopoietic cells expressing oncogenic Nras. **Blood**, v. 119, n. 4, p. 1032–1035, 26 jan. 2012.
- XUE, C.; WYCKOFF, J.; LIANG, F.; SIDANI, M.; VIOLINI, S.; TSAI, K.-L.; ZHANG, Z.-Y.; SAHAI, E.; CONDEELIS, J.; SEGALL, J. E. Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression Results in Increased Tumor Cell Motility In vivo Coordinately with Enhanced Intravasation and Metastasis. Cancer Research, v. 66, n. 1, p. 192–197, 1 jan. 2006.
- YANG, C.; ATKINSON, S. P.; VILELLA, F.; LLORET, M.; ARMSTRONG, L.; MANN, D. A.; LAKO, M. Opposing Putative Roles for Canonical and Noncanonical NFκB Signaling on the Survival, Proliferation, and Differentiation Potential of Human Embryonic Stem Cells. **STEM CELLS**, v. 28, n. 11, p. 1970–1980, nov. 2010.
- YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497–5510, 15 set. 2008.
- ZEITOUNI, D.; PYLAYEVA-GUPTA, Y.; DER, C. J.; BRYANT, K. L. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. **Cancers**, v. 8, n. 4, 18 abr. 2016.

- ZENG, L.; LI, J.; ZHANG, Q.; QIAN, C.; WU, W.; LIN, Z.; LIANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, K. Effective Suppression of the Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene in Pancreatic Tumor Cells via Targeted Small Interfering RNA Delivery Using Nanoparticles. **Pancreas**, v. 44, n. 2, p. 250–259, mar. 2015.
- ZHANG, H.; CHEN, X.; CAI, C.; WANG, S.; LIU, B.; ZHOU, L. [Suppression of Aurora-A by RNA interference inhibits laryngeal cancer Hep-2 cell growth]. **Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery**, v. 47, n. 1, p. 58–63, jan. 2012.
- ZHANG, H.; CHEN, X.; LIU, B.; ZHOU, L. Effects of stable knockdown of Aurora kinase A on proliferation, migration, chromosomal instability, and expression of focal adhesion kinase and matrix metalloproteinase-2 in HEp-2 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 357, n. 1–2, p. 95–106, 18 nov. 2011.
- ZHANG, J.; JIA, L.; LIN, W.; YIP, Y. L.; LO, K. W.; LAU, V. M. Y.; ZHU, D.; TSANG, C. M.; ZHOU, Y.; DENG, W.; LUNG, H. L.; LUNG, M. L.; CHEUNG, L. M.; TSAO, S. W. Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1 Upregulates Glucose Transporter 1 Transcription via the mTORC1/NF-κB Signaling Pathways. **Journal of virology**, v. 91, n. 6, 2017.
- ZHANG, Y.; MUKHOPADHYAY, T.; DONEHOWER, L. A.; GEORGES, R. N.; ROTH, J. A. Retroviral Vector-Mediated Transduction of K- ras Antisense RNA into Human Lung Cancer Cells Inhibits Expression of the Malignant Phenotype. **Human Gene Therapy**, v. 4, n. 4, p. 451–460, ago. 1993.
- ZHANG, Y.; YANG, P.; WANG, X.-F. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 3, p. 153–160, mar. 2014.
- ZHAO, J.; GUAN, J.-L. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 35–49, 24 jun. 2009.
- ZHU, K.; YAN, H.; WANG, R.; ZHU, H.; MENG, X.; XU, X.; DOU, X.; CHEN, D. Mutations of KRAS and PIK3CA as independent predictors of distant metastases in colorectal cancer. **Medical Oncology**, v. 31, n. 7, p. 16, 27 jul. 2014.
- ZIEGELBAUER, K.; GANTNER, F.; LUKACS, N. W.; BERLIN, A.; FUCHIKAMI, K.; NIKI, T.; SAKAI, K.; INBE, H.; TAKESHITA, K.; ISHIMORI, M.; KOMURA, H.; MURATA, T.; LOWINGER, T.; BACON, K. B. A selective novel low-molecular-weight inhibitor of I κ B kinase- β (IKK- β) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 178–192, maio 2005.
- ZUBER, J.; TCHERNITSA, O. I.; HINZMANN, B.; SCHMITZ, A.-C.; GRIPS, M.; HELLRIEGEL, M.; SERS, C.; ROSENTHAL, A.; SCHÄFER, R. A genome-wide survey of RAS transformation targets. **Nature Genetics**, v. 24, n. 2, p. 144–152, fev. 2000.

# SÚMULA CURRICULAR

#### 1 - Dados pessoais:

Nome: Vanessa Silva Miranda

Local e data de nascimento: Ribeirão Preto, 14/02/1992

## 2 – Educação:

1. Colégio Oswaldo Cruz, COC, Brasil, 2009. Ensino Médio

- 2. Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba/MG, 2015. Bacharel em Biomedicina
- 3. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, 2018 (em andamento). Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

# 3 – Resumos publicados em anais de eventos:

MIRANDA, V. S.; RODRIGUES, F. S.; CARNEIRO-LOBO, T. C.; SCALABRINI, L. C.; MURPHY, D. J.; BASSÈRES, D. S. Exploring IKKβ as an anti-metastatic therapeutic target in KRAS-induced lung cancer". In: Frontiers in Molecular Oncology", 2018, São Paulo, Brasil. (Oral Prsentation)

MIRANDA, V. S.; CARNEIRO-LOBO, T. C.; BASSERES, D. S. Exploring IKKβ as an anti-metastatic therapeutic target in KRAS-induced lung cancer. Na: 46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Sbbq), 2017, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

MIRANDA, V. S.; TIVERON, R. D. R.; OLIVEIRA, R. V.; PAULINO, T. P.; MAGRIN, R. A. Identificação de Desintegrinas da Peçonha de Bothrops moojeni e Influência no Processo de Adesão de Macrófagos. No: 40 Curso de Inverno em Toxinologia (FCFRP), Ribeirão Preto/SP, 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

MIRANDA, V. S.; TIVERON, R. D. R.; Oliveira, R. V.; PAULINO, T. P.; MAGRIN, R. A. Identificação de Desintegrinas da Peçonha de Bothrops moojeni e Influência no Processo de Adesão de Macrófagos. I Curso de Inverno do Hospital de Câncer de Barretos, Barretos/SP, 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

### 4 - Participação em eventos científicos:

1. Frontiers in Molecular Oncology. 2018

- 2. 46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Exploring IKK $\beta$  as an antimetastatic therapeutic target in KRAS-induced lung cancer. 2017. (Congresso).
- 3. 4° Curso de Inverno em Toxinologia.Identificação de Desintegrinas da Peçonha deBothrops moojeni e Influência no Processo de Adesão de Macrófagos. 2015. (Outra).
- 4. Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular da USP-IQ. 2015. (Outra).
- 5. I Curso de Inverno em Oncologia Molecular.Identificação de Desintegrinas da Peçonha de Bothrops moojeni e Influência no Processo de Adesão de Macrófagos. 2015. (Outra).
- 6. 1° Workshop de Saúde Integrativa. 2014. (Simpósio).
- 7. I Simpósio e Cuso Introdutório à Liga Acadêmica de Saúde Oriental LASO. 2013. (Simpósio).
- 8. I Simpósio e I Curso Introdutório á Liga Acadêmica de Fisiologia Endócrina. 2013. (Simpósio).
- 9. XVI Encontro Nacional de Biomedicina. 2013. (Congresso).
- 10. I Simpósio e Cuso Introdutório à Liga Acadêmica de Hematologia. 2012. (Simpósio).
- 11. IX Encontro Mineiro de Biomedicina. 2012. (Encontro).
- 12. XI Curso Introdutório da Liga de Geriatria e Gerontologia da UFTM. 2012. (Simpósio).
- 13. 2° Curso Introdutório à Liga de Análises Clínicas. 2011. (Simpósio).
- 14. IV Feira de Profissões dos Cursos de Graduação da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Estrutura do curso de Biomedicina. 2011. (Feira).
- 15. Transtornos Mentais em idosos: X Curso Introdutório à Liga de Geriatria e Gerontologia. 2011. (Simpósio).

#### 5 – Outras atividades:

- 1. Bolsista Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2015.
- 2. Organização. XII Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. 2017.
- 3. Coordenadora. XI Encontro Mineiro de Biomedicina. 2014. (Congresso).
- 4. Coordenadora. I Simpósio de Saúde Integrativa e II Curso Introdutório à Liga Acadêmica de Saúde Integrativa. 2014.

### 6 – Ocupação:

Bolsista de Mestrado, FAPESP, Ago/2016 a Jul/2018.