



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA - PPGBQA

Karoline Almeida Lima

**Expressão de PDL1 em Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas com
Mutações na Via KEAP1/NRF2**

Florianópolis
2022

Karoline Almeida Lima

**Expressão de PDL1 em Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas com
Mutações na Via KEAP1/NRF2**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Karoline Almeida

Expressão de PDL1 em Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas com Mutações na Via KEAP1/NRF2 / Karoline Almeida Lima ; orientador, Alfeu Zanotto-Filho, 2022.

68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Câncer de Pulmão. 3. Expressão de PDL1. 4. Mutações na via KEAP1/NRF2. I. Zanotto-Filho, Alfeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. III. Título.

Karoline Almeida Lima

**Expressão de PDL1 em Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas com
Mutações na Via KEAP1/NRF2**

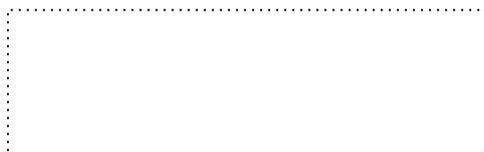
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 16 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha
Universidade Federal de Santa Catarina

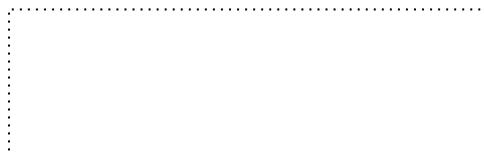
Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho
Orientador

Florianópolis, 2022.

Dedico essa dissertação ao meu amado pai Aginaldo Almeida (*in memoriam*), vítima da pandemia COVID-19 durante a realização desse trabalho, mas o grande responsável por essa conquista. Sua memória se faz presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter chegado até aqui, e aos meus pais Aguinaldo Almeida e Rosa Serpa Almeida que são os principais responsáveis por essa conquista, que investiram na minha educação como prioridade, mesmo que ambos não tenham tido uma e foram a base para que eu pudesse construir o caminho até aqui. Por mais que a pandemia tenha tirado a presença do meu pai desse momento tão especial, toda a minha eterna gratidão a ele, e à minha mãe que nunca mediu esforços para que eu realizasse todos os meus sonhos.

Agradeço também ao meu esposo Morisson Adriano Almeida Lima, por ter sido meu apoio emocional em todos os momentos difíceis durante os anos do mestrado, por ser meu maior incentivador e acreditar em mim em todos os momentos, me ajudando a permanecer quando achei que não conseguiria continuar, por ser meu parceiro e passar diversos finais de semana em experimentos comigo no laboratório e por toda compreensão.

Gratidão também às minhas irmãs Alessandra Almeida e Silvana Almeida, minha sobrinha Alicia Almeida e aos meus cunhados George Penha e Lucas Araújo por todo suporte e apoio.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho por todo o suporte científico e conhecimento compartilhado durante a execução deste trabalho, assim como a todos os meus colegas do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, que fizeram dessa jornada especial e sempre foram dispostos a ensinar e auxiliar. Meus agradecimentos à FAPESC e a CAPES, agências financiadoras deste trabalho tornando a sua execução possível, assim como ao LAMEB e todos os laboratórios parceiros e profissionais que contribuíram para a execução do mesmo.

Agradeço aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial aos meus amigos Claudio Dahne, Melania Santer e Pedro Borges por compartilharem esses anos comigo e tornarem a jornada mais divertida. E aos meus amigos Bruno Pereira e Patrícia Schneider que foram essenciais nesse período.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO

Mutações na via KEAP1/NRF2 ocorrem em cerca de 20-30% dos cânceres de pulmão de células não pequenas e têm sido associadas a um mau prognóstico e resistência a quimioterápicos de primeira linha na doença. Tumores NRF2/KEAP1 mutantes têm se caracterizado como um subtipo molecular de câncer de pulmão, para o qual ainda não se tem uma terapia-alvo disponível. Por outro lado, pacientes com câncer de pulmão com alta expressão de PDL1 foram caracterizados como um subgrupo que responde positivamente a inibidores de checkpoint imunológico (ICI), tais como os anticorpos monoclonais anti-PDL1 e/ou anti-PD1. Neste contexto, uma relação entre a presença de mutações em KEAP1/NRF2 e prognóstico em terapia com ICI foi descrita previamente. Entretanto, não temos estudos abrangentes e funcionais caracterizando a relação entre a expressão de PDL1 e o estado de ativação de NRF2 em tumores pulmonares. Assim, neste estudo, avaliou-se a expressão de PDL1 em tumores com via KEAP1/NRF2 hiperativa e um possível controle dependente de NRF2 da expressão de PDL1 em câncer de pulmão de células não pequenas. Análises *in silico* de uma coorte de pacientes do *The Cancer Genome Atlas* foram utilizadas para avaliar a correlação da expressão de PDL1 e outro gene de resposta a ICI (*CTLA4*), não demonstrando correlação significativa entre a expressão dos marcadores imune com a presença de mutações na via KEAP1/NRF2, expressão de genes alvo, ou de uma assinatura de ativação de NRF2 previamente validada. Também avaliamos o conteúdo proteico de PDL1, NRF2 e TXNRD1, por imuno-histoquímica, em uma coorte de pacientes diagnosticados com câncer de pulmão, demonstrando alta correlação entre a expressão e conteúdo nuclear de NRF2 e os níveis de seu gene alvo TXNRD1, mas nenhuma associação significativa com PDL1. Além disso, determinamos a expressão de mRNA de PDL1 e três genes-alvos de NRF2, *TXNRD1*, *SLC7A11* e *GCLM* por RT-qPCR na linhagem A549 mutante KEAP1 com *knockdown* de *NFE2L2* (NRF2), e em células A549 tratadas com inibidor de NRF2 (ML385). Tanto a inibição farmacológica quanto o *knockdown* de NRF2 não alteraram a expressão de PDL1 em células A549. Embora não associado a expressão de PDL1, a inibição de NRF2 com ML385 inibiu substancialmente o crescimento clonogênico de células KEAP1 mutadas, indicando uma dependência dessa via para a viabilidade celular. Por fim, concluímos que, se a via KEAP1/NRF2 confere resposta diferencial à imunoterapia com ICI em câncer de pulmão de células não pequenas, este processo não parece estar relacionado com a expressão NRF2-dependente de PDL1 nesse tipo tumoral.

Palavras-chave: PDL1; NRF2; KEAP1; câncer de pulmão.

ABSTRACT

Mutations in the KEAP1/NRF2 pathway occur in approximately 20-30% of non-small cell lung cancers and have been associated with a poor prognosis and resistance to first-line chemotherapy in the disease. Mutant NRF2/KEAP1 tumors have been characterized as a molecular subtype of lung cancer, for which target therapy is still not available. On the other hand, lung cancer patients with high expression of PDL1 were characterized as a subgroup that respond positively to immune checkpoint inhibitors (ICI), such as anti-PDL1 and/or anti-PD1 monoclonal antibodies. In this context, a relationship between the presence of mutations in KEAP1/NRF2 and prognosis in ICI therapy has been previously described. However, we lack comprehensive and functional studies characterizing the relationship between PDL1 expression and NRF2 activation status in lung tumors. Thus, in this study, we evaluated the expression of PDL1 in tumors with a hyperactive KEAP1/NRF2 pathway and a possible NRF2-dependent control of PDL1 expression in non-small cell lung cancer. *In silico* analyzes of a cohort of patients from The Cancer Genome Atlas were used to assess the correlation of PDL1 expression and other ICI response gene (*CTLA4*), not demonstrating a significant correlation between the expression of immune markers with the presence of mutations in the KEAP1/NRF2 pathway, target gene expression, or a previously validated NRF2 activation signature. We also evaluated the protein content of PDL1, NRF2 and TXNRD1, by immunohistochemistry, in a cohort of patients diagnosed with lung cancer, demonstrating a high correlation between the expression and nuclear content of NRF2 and the levels of its target gene TXNRD1, but no significant association with PDL1. In addition, we determined the expression of PDL1 mRNA and three NRF2 target genes, *TXNRD1*, *SLC7A11* and *GCLM* by RT-qPCR in the A549 mutant *KEAP1* cell line with *NFE2L2* knockdown (NRF2), and in A549 cells treated with NRF2 inhibitor (ML385). Both pharmacological inhibition and NRF2 knockdown did not alter PDL1 expression in A549 cells. Although not associated with PDL1 expression, inhibition of NRF2 with ML385 substantially inhibited clonogenic growth of mutated *KEAP1* cells, indicating a dependence on this pathway for cell viability. Finally, we conclude that, if the KEAP1/NRF2 pathway confers a differential response to ICI immunotherapy in non-small cell lung cancer, this process does not seem to be related to the NRF2-dependent expression of PDL1 in this tumor type.

Keywords: PDL1; NRF2; KEAP1; lung cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação histológica do Câncer de Pulmão.....	20
Figura 2 – Vias de sinalização mediadas por RTKs.....	21
Figura 3 – Alterações genéticas com relevância em CPCNP.....	22
Figura 4 – Expressão de PDL1 em Células Tumorais.....	27
Figura 5 – Método CPS para obtenção de escore de PDL1	28
Figura 6 – Estrutura da Proteína NRF2.....	29
Figura 7 – Via KEAP1/NRF2 em condições fisiológicas e sob estresse oxidativo	30
Figura 8 – Imuno-histoquímica semiautomatizada	36
Figura 9 – <i>Knockdown</i> NFE2L2 por siRNA.	40
Figura 10 – Desenho experimental da análise de expressão de mRNA por RT-qPCR	41
Figura 11 – Desenho experimental do Ensaio Clonogênico.....	42
Figura 12 – Expressão de PDL1 não está correlacionada com assinatura de NRF2	45
Figura 13 – Imuno-histoquímicas representativas para imunoconteúdo de NRF2, PDL1 e TXNRD1 em CPCNP.....	47
Figura 14 – Expressão de PDL1 não é regulada pela via KEAP1/NRF2.	51
Figura 15 – Inibição de NRF2 afeta a proliferação celular em CPCNP.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento do Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas (TNM) .	24
Tabela 2 – Expressão de PDL1 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em diferentes subtipos histológicos de CPCNP.....	48
Tabela 3 – Expressão de PDL1 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em uma coorte de 86 pacientes	48
Tabela 4 – Expressão de NRF2 por imuno-histoquímica em diferentes subtipos histológicos de CPCNP.....	49
Tabela 5 – Expressão de NRF2 e PDL1 por imuno-histoquímica em uma sub-coorte de 42 amostras de CPCNP	49
Tabela 6 – Expressão de NRF2 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em uma sub-coorte de 42 amostras de CPCNP.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK – Receptor de Tirosina Quinase de Linfoma Anaplásico
ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica
AT2 – Células Epiteliais Alveolares Tipo II
BRAF – Proteína Quinase Serina/Treonina
CD274 – Gene codificante para PDL1
cDNA – DNA Complementar de Primeira Fita
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CHD6 – Proteína 6 de ligação ao DNA da Helicase de Cromodomínio
CPCNP – Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas
CPS – *Combined Positive Score*
CUL3 – Culina 3
DDR2 – Receptor com Domínio Discoidina
EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ERBB2 – Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
FAMED – Faculdade de Medicina
FFPE – Amostras Fixadas em Formalina e Incluídas em Parafina
FGFR1 – Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
GCLM – Gama-Glutamilcisteína sintetase
GLOBOCAN – *Global Cancer Observatory*
HSVP – Hospital São Vicente de Paulo
HU – Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Tiago
H&E – Hematoxilina e Eosina
HRD1 – Ubiquitina Ligase
ICI – Inibidores de *Checkpoint* Imunológico
IHQ – Imuno-histoquímica
INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
KEAP1 – Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch
KRAS – Homólogo do Oncogene Viral do Sarcoma de Rato Kirsten
mRNA – RNA Mensageiro
NRF2 – Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2
PD1 – Proteína de Morte Celular Programada 1
PDL1 – Ligante de Morte Programada 1

PIK3CA – Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato 3-quinase Subunidade Catalítica Alfa

PTEN – Fosfatase Homóloga à Tensina

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNAseq – Sequenciamento de RNA

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RTKs – Receptores de Tirosina Quinases

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Transcrição Reversa

RXR α – Receptor Retinóico X α

SEER – *National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology and End Results Program*

SFB – Soro Fetal Bovino

siRNA – Micro RNA de Interferência

SLC7A11 – Família de Portadores de Solutos 7 Membro 11

sMAF – *Small Maf*

TCGA – Atlas Genômico do Câncer

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR – Receptor de Células T

TMB – Carga Mutacional Tumoral

TME – Microambiente Tumoral

TNM – Classificação do Estágio de Câncer de Pulmão

TXNRD1 – Tiorredoxina Redutase 1

UbcM2 – Enzima Conjugadora de Ubiquitina

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UPF – Universidade de Passo Fundo

β TrCP – Proteína Contendo Repetições de β -transducina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	CÂNCER DE PULMÃO	17
1.2	CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS	19
1.3	ESTADIAMENTO.....	22
1.4	TRATAMENTO	24
1.5	PDL1	25
1.6	NRF2.....	29
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	BIOINFORMÁTICA	34
3.1.1	Pré-processamento dos transcriptomas, análises de correlação da expressão de PDL1 com assinatura de genes-alvos de NRF2.....	34
3.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	35
3.2.1	Obtenção do N amostral.....	35
3.2.2	Imuno-histoquímica PDL1	36
3.2.3	Imuno-histoquímica NRF2.....	37
3.2.4	Imuno-histoquímica TXNRD1.....	38
3.3	CULTIVO CELULAR	39
3.4	<i>KNOCKDOWN</i> NRF2 (SIRNA)	39
3.5	RT-QPCR.....	40
3.6	ENSAIO CLONOGÊNICO.....	42
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS	44
4.1	A EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE PDL1 EM CPCNP NÃO ESTÁ CORRELACIONADA COM A ASSINATURA DE NRF2 E MUTAÇÕES NA VIA KEAP1/NRF2	44
4.2	OS NÍVEIS PROTEICOS DE PDL1 NÃO ESTÃO ASSOCIADOS COM A ATIVAÇÃO DE NRF2 EM CPCNP	46
4.3	A EXPRESSÃO DE PDL1 NÃO É REGULADA PELA VIA KEAP1/NRF2 ..	50

4.4	NRF2 INTERFERE NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE CPCNP.....	51
5	DISCUSSÃO.....	53
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO A – ARTIGOS EM COLABORAÇÃO.....	67

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública, e está entre as principais causas de morte no Brasil (INCA, 2020). No contexto mundial, ocupa a quarta posição em causas de morte prematura na maioria dos países desenvolvidos, e essa posição se dá devido à aderência de hábitos associados à urbanização, como a alimentação processada e o sedentarismo (BRAY *et al.*, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), tanto a incidência quanto a mortalidade por câncer estão aumentando devido ao envelhecimento e crescimento populacional, assim como à alta prevalência de fatores de risco para câncer em países desenvolvidos e em desenvolvimento socioeconômico, como o Brasil.

Porém, câncer é um termo genérico utilizado para intitular um grupo de mais de 200 diferentes tipos de doenças, caracterizadas pela proliferação celular desordenada e que podem afetar diferentes órgãos e sistemas. A origem do câncer se dá a nível celular, a partir de alterações genômicas, como a deleção, amplificação ou mutação gênica. Esse processo é conhecido como iniciação, alterações que ocorrem em genes supressores tumorais, oncogenes ou genes reguladores do ciclo celular e podem dar origem às células clonais com proliferação descontrolada (KASTAN; BARTEK, 2004). Além deste, outros dois processos principais estão envolvidos na origem comum do câncer, sendo eles, a promoção, onde o clone celular mutado se prolifera, e a progressão, quando ocorrem novas alterações no genoma celular combinadas às mudanças no microambiente tumoral e pressão seletiva (BASU, 2018).

A iniciação pode se dar espontaneamente, ou ser induzida por pressões ambientais como, por exemplo, agentes mutagênicos. O dano causado ao DNA interfere no ciclo celular, ativando assim proteínas de *checkpoint* que param o ciclo para que possa ser realizado o mecanismo de reparo necessário. Caso o reparo não seja possível, são ativadas as vias que desencadeiam a apoptose, ou seja, morte celular; contudo, quando os danos são induzidos com uma frequência alta, a replicação do DNA pode ocorrer antes que o reparo aconteça (KASTAN; BARTEK, 2004). Com a constante exposição a agentes promotores, como fatores de crescimento e hormônios, a célula mutada prolifera e a instabilidade genômica e a pressão seletiva do microambiente promovem novos eventos de alterações

genéticas. Neste contexto, a progressão tumoral se torna um processo praticamente irreversível, resultando em células malignas com alto potencial de adaptação, invasão e metastização (BASU, 2018). Sendo a adaptação um conjunto de mecanismos que as células tumorais adquirem para sua sobrevivência e proliferação, como a sustentação da sinalização proliferativa, resistência à morte celular, indução da angiogênese, imortalidade replicativa e evasão de supressores de crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SAHA *et al.*, 2021). Invasão é a capacidade que as células tumorais adquirem de se moverem, penetrarem outros tecidos adjacentes, assim como adentrar aos vasos linfáticos e sanguíneos, onde inicia o processo de cascata metastática (NOVIKOV *et al.*, 2021). A metastização, por sua vez, se refere à capacidade de disseminar células cancerosas de um tumor primário em determinado órgão, para outros órgãos secundários, envolvendo diferentes mecanismos celulares (SUHAIL *et al.*, 2019).

De acordo com a estimativa mundial da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, ocorreram 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo apenas em 2020, culminando em 10 milhões de mortes. Sendo o câncer de mama o mais incidente no mundo, com 2.261.419 novos casos, seguido pelo câncer de pulmão com 2.206.771 casos, representando 11,4% do total, que ocupava até 2018 a primeira posição em câncer mais comumente diagnosticado (SUNG *et al.*, 2021).

1.1 CÂNCER DE PULMÃO

Apesar de ser o segundo mais incidente, o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019). Segundo dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) a estimativa era de 1,8 milhões de mortes pela malignidade, 18% de todas as mortes por câncer no mundo, apenas no ano de 2020 (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, está entre os cinco tipos de cânceres mais incidentes, segundo a estimativa para o triênio 2023-2025 do INCA com 4,6% do total de casos, estimando 32.560 novos casos apenas no ano de 2023 (INCA, 2022); é o terceiro mais recorrente em homens, ficando atrás apenas do câncer de próstata e cólon e reto, e ocupa a quarta posição de recorrência entre as mulheres, ficando atrás dos cânceres de mama, cólon e reto e colo de útero.

Em sua maioria, os pacientes diagnosticados com câncer de pulmão possuem entre 65 e 74 anos (INCA, 2022). Este tipo de câncer possui um alto índice de mortalidade, com uma razão mortalidade:incidência (M/I) de 90%, o que se deve, principalmente, à dificuldade de diagnosticar o câncer em fases iniciais. Como o câncer de pulmão possui uma variedade histológica bastante complexa e mecanismos heterogêneos de carcinogênese, isso dificulta o seu diagnóstico precoce, sendo comum o rastreamento do tumor quando em um estadiamento avançado, já em fase metastática (OUDKERK *et al.*, 2021).

Tanto a incidência, quanto a mortalidade por câncer de pulmão estão fortemente relacionadas ao tabagismo, sendo este o maior fator de risco para desenvolvimento da malignidade, aumentando em cerca de 40 vezes as chances de desenvolver a doença. Além do tabagismo, outros fatores etiológicos ligados ao câncer de pulmão são a predisposição genética e a exposição ambiental, como poluição do ar e micropartículas (HUNG *et al.*, 2008). A incidência deste tipo de câncer diminuiu nos países desenvolvidos nas últimas décadas, em função da intensa campanha de controle do tabagismo. Contudo, a incidência segue alta nos países em desenvolvimento, com um especial aumento entre as mulheres, que passam a ser um significativo grupo de tabagistas nestes países. Curiosamente, a mortalidade é maior nos países em desenvolvimento, em razão do acesso desigual aos cuidados de saúde, contaminação ambiental, atrasos no diagnóstico e tratamento (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019).

A sobrevida mediana dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão é de 22,9% em 5 anos após o diagnóstico. Quanto mais cedo o paciente for diagnosticado, maiores as chances de sobrevida, sendo 61,2% para pacientes diagnosticados na fase inicial, 33,5% para pacientes com linfonodos regionais e apenas 7% para pacientes com comprometimento de órgãos secundários. Infelizmente apenas 19% dos casos de câncer pulmonar são diagnosticados no sítio primário, seguido por 22% com linfonodos regionais, já a maior parte é diagnosticada em graus de metástase, configurando 55% dos casos. O cenário de diagnóstico tardio se deve, principalmente, ao fato dos sintomas comuns à outras doenças, como a tosse acompanhada ou não de sangue, dispnéia, fadiga, dor torácica, perda de peso e ruído respiratório, dificultando o diagnóstico precoce (SEER, 2022). Sendo a hemoptise, tosse com sangue, o sintoma com maior valor

preditivo positivo de 2,4% a 7,5%, no entanto apenas um quinto dos pacientes com câncer de pulmão apresenta o sintoma (ALEXANDER; KIM; CHENG, 2020).

Histopatologicamente, o câncer de pulmão pode ser classificado em dois subgrupos primários, o de células pequenas que representa de 10 a 15% dos casos registrados e o de células não pequenas correspondendo 80 a 85% dos casos (DUMA; SANTANA-DAVILA; MOLINA, 2019).

1.2 CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS

O Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas (CPCNP) é um tumor maligno de origem epitelial que pode crescer em diferentes áreas entre a traqueia e a periferia do pulmão, caracterizado como um crescimento e mutação desordenada das células epiteliais (KUMAR *et al.*, 2013). Existem três subdivisões histológicas principais para o CPCNP, de acordo com a origem das células tumorais (Figura 1): Adenocarcinoma, Carcinoma de Células Escamosas e Carcinoma de Células Grandes; além de, variantes e combinações de subtipos clínicos (NOORELDEEN; BACH, 2021).

O Adenocarcinoma refere-se ao tumor com início nas células epiteliais alveolares tipo II (AT2) localizadas no epitélio das vias aéreas menores e locais com produção de muco, normalmente em áreas externas. Este subtipo cresce mais lentamente e é o mais comum na parcela de 10% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão não fumantes. Além de, ser o mais relatado, responsável por 40% de incidência na população e possuir diferentes subtipos histológicos (HUTCHINSON *et al.*, 2019). Um subgrupo de adenocarcinomas com classificação histológica distinta constitui-se de adenocarcinoma *in situ*, adenocarcinoma invasivo de pulmão e adenocarcinoma minimamente invasivo (TRAVIS; BRAMBILLA; RIELY, 2013).

O Carcinoma de Células Escamosas, chamado também de Epidermóide, representa de 25 a 30% dos casos de CPCNP, e refere-se aos tumores com origem nas células escamosas que revestem o interior das vias aéreas, na região central dos pulmões e perto dos brônquios (CHABNER; LONGO, 2015).

Por fim, o Carcinoma de Células Grandes é um dos subtipos mais raros de CPCNP, responsável por apenas cerca de 10% dos casos, no entanto é um dos mais agressivos, podendo surgir em qualquer área do pulmão e com disseminação

rápida, é um tumor tipicamente pouco diferenciado e composto por grandes células com nucléolos grandes e citoplasma abundante (DUMA; SANTANA-DAVILA; MOLINA, 2019).

Menos comuns, representando juntos uma fatia de 15 a 20% dos casos, temos subtipos histológicos menos incidentes como o Carcinoma Adenoescamoso, Carcinoma Neuroendócrino de Grandes Células, Carcinoma Sarcomatoide Pleomórfico e Tumor Carcinoide (SCHABATH; COTE, 2019).

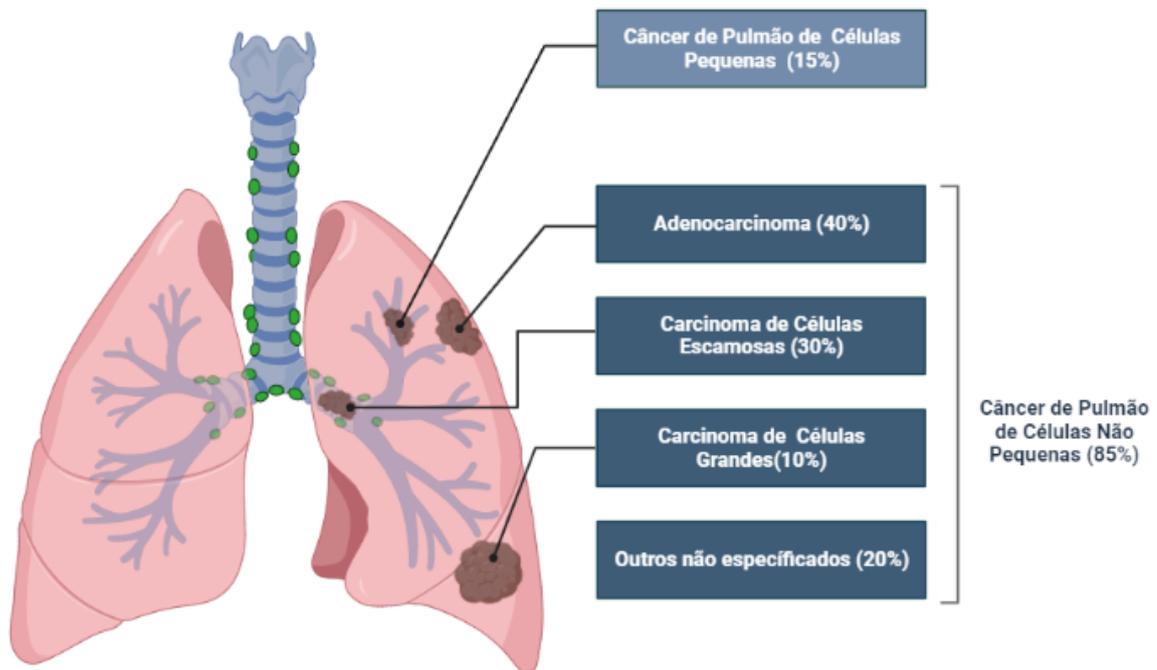


Figura 1 – Classificação histológica do Câncer de Pulmão. Classificação de acordo com os subtipos histológicos de Câncer de Pulmão, e as subdivisões de Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Segundo Schabath (2019), além dos subtipos histológicos, com os avanços em genômica foi possível detectar biomarcadores de CPCNP e alterações genéticas, como mutações, amplificações e rearranjos, que são exploradas em terapias direcionadas, auxiliando na escolha do tratamento e no prognóstico do paciente.

No contexto do CPCNP podemos citar as mutações em *EGFR* e *ERBB2*, Receptores de Tiroquina Quinases (RTKs) que ativam vias centrais para o crescimento, sobrevivência e migração das células tumorais, PI3K-AKT e RAS-MEK-ERK, presentes com frequências de 10 a 35% e 10 a 15% dos casos respectivamente; Mutação em *DDR2*, RTK envolvido na regulação do crescimento, diferenciação e metabolismo celular, com frequência de aproximadamente 4% do

casos; Mutações no gene *KRAS*, um dos genes mais repetidamente mutados em CPCNP, principalmente em adenocarcinomas, frequente em aproximadamente 25% dos casos, e no gene *BRAF*, com frequência de 1 a 3% dos casos, envolvidos na via de sinalização RAS/RAF/ERK para regulação do crescimento, diferenciação e metabolismo celular, assim como promoção da sobrevivência de tumores; Mutações no gene *PTEN*, um gene supressor tumoral que regula negativamente a via PI3K-AKT, ao codificar uma fosfatase lipídica; E, mutação em *PIK3CA*, frequente em 2% dos casos, gene que aumenta a atividade da quinase lipídica e a sinalização constitutiva da via PI3K-AKT (ZHU *et al.*, 2017). É possível observar as vias de sinalização mediadas pelos Receptores de Tirosina Quinases na Figura 2.

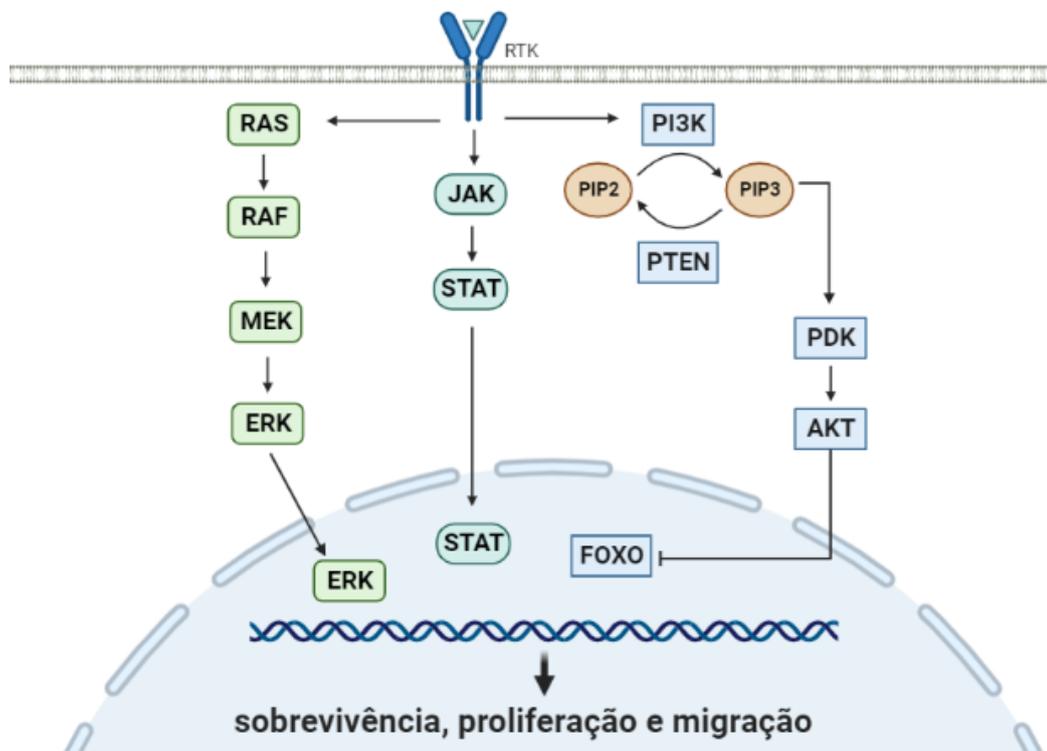


Figura 2 – Vias de sinalização mediadas por RTKs. Vias de sinalização mediadas por receptores tirosina quinases frequentemente afetadas por alterações genéticas em câncer de pulmão de células não pequenas, resultando em sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Além destas, mutações na via do Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2), incluindo o seu gene codificante *NFE2L2*, o seu modulador Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (KEAP1) e a Culina 3 (CUL3) são frequentes no CPCNP, sendo que 26% dos casos desse subtipo histológico apresentam aumento da expressão nuclear de NRF2 (SÁNCHEZ-ORTEGA; CARRERA; GARRIDO, 2021).

De acordo com Zhu e colaboradores (2017), além das mutações, podemos citar o rearranjo de *ALK*, que além de ativar as mesmas vias que *EGFR* e *ERBB2*, ativa a via JAK-STAT3, central para proliferação e crescimento tumoral, frequente em cerca de 3 a 7% dos casos; E a amplificação de *FGFR1*, que culmina na sinalização das vias PI3K-AKT e RAS-MEK-MAPK, envolvidas no crescimento e sobrevivência de células cancerosas. As alterações genéticas relevantes no CPCNP estão demonstradas na Figura 3.

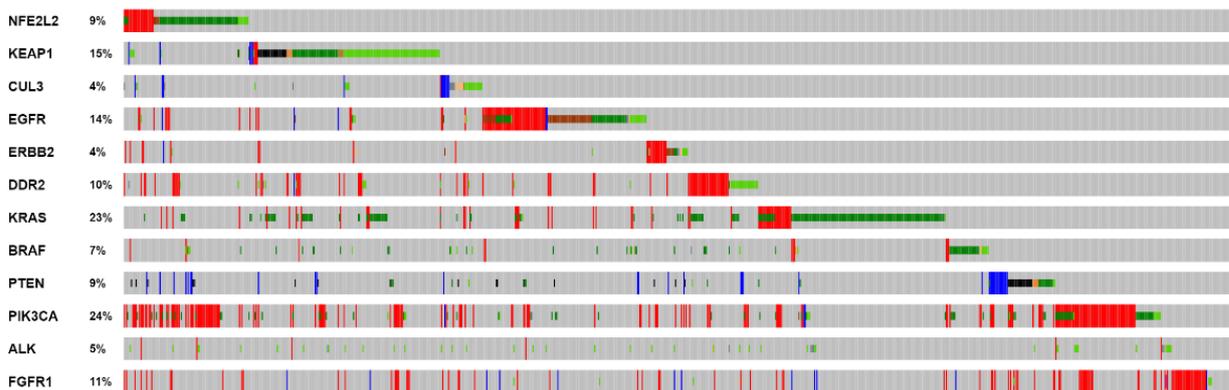


Figura 3 – Alterações genéticas com relevância em CPCNP. Dados de alterações genéticas em genes comumente alterados e com relevância diagnóstica, terapêutica e/ou prognóstica em CPCNP provenientes de 1.145 amostras do TCGA. Em vermelho estão demonstradas as regiões com amplificação, em azul as regiões com deleção, em cinza as regiões sem alteração, e por fim, as fitas menores em preto, laranja, verde, bege e marrom representam as regiões com diferentes tipos de mutação (*inframe*, *missense*, *splice* e *truncating*). Fonte: *The cBioPortal for Cancer Genomics* (2022)

1.3 ESTADIAMENTO

O estágio do tumor no momento do diagnóstico também é muito importante para o prognóstico da doença, e está diretamente relacionado à evolução clínica do paciente com CPCNP, todavia em sua grande maioria, esse tipo tumoral é diagnosticado em estadiamento avançado. O diagnóstico é realizado a partir de exames de imagem, acompanhado de biópsia e devida análise de um médico patologista para confirmação histológica, também requer a definição do estágio tumoral a partir da determinação da extensão do tumor, o que é essencial para a definição da opção de tratamento do paciente (TRAVIS *et al.*, 2010). Entretanto, devido aos avanços recentes em biologia molecular, o diagnóstico tem sido complementado por análise molecular, caracterizando cada tipo histológico com suas alterações moleculares, facilitando o encaminhamento do paciente para terapias direcionadas (IMYANITOV; IYEVLEVA; LEVCHENKO, 2021).

Existem diferentes alternativas de tratamento para o CPCNP, sendo o estadiamento e as características do tumor no momento do diagnóstico as informações decisivas para a escolha da abordagem terapêutica. O prognóstico também é essencial para o desenvolvimento de um plano de tratamento individualizado. Existem três componentes que descrevem a extensão anatômica do tumor, sendo representados por “T” para a extensão do tumor primário, “N” para envolvimento de linfonodos e “M” para doença metastática. Esses três componentes são agrupados em subcategorias referentes aos estágios do tumor, como é possível observar na Tabela 1, indicando pacientes com prognósticos semelhantes (TANOUE, 2020).

A classificação “T” é dividida em T0, T1, T2, T3 e T4, sendo T0 quando não é observado tumor primário no exame de imagem, também o carcinoma *in situ*, contudo este só é diagnosticado após a ressecção tumoral. T1 refere-se aos tumores com tamanho ≤ 3 cm, sendo T1a ≤ 1 cm, T1b >1 e ≤ 2 cm e T1c >2 e ≤ 3 cm. T2 são os tumores com tamanho >3 e ≤ 5 cm, ou tumor de qualquer tamanho que invada a pleura visceral, envolva o brônquio principal, mas não a carina ou demonstre pneumonite e/ou atelectasia obstrutiva que se estenda até o hilo, sendo T2a >3 a 4 cm e T2b >4 a 5 cm. Tumores T3 possuem tamanho >5 a 7 cm, ou são tumores de qualquer tamanho que invadam a parede torácica, pericárdio, nervo frênico ou possuam nódulos satélites no mesmo lobo pulmonar. Por fim, T4 são tumores com tamanho >7 cm, ou tumor de qualquer tamanho que invada a gordura ou estruturas mediastinais, diafragma, envolva a carina ou possua nódulos satélites em diferentes lobos do mesmo lado (DETTERBECK *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2020).

Já a classificação “N” referente aos linfonodos é dividida em N0, N1, N2 e N3. Sendo N0 quando não há a presença de linfonodos, N1 quando há linfonodos peribrônquicos e/ou hilares em um mesmo lado do pulmão, N2 linfonodos mediastinais e/ou subcarinais de um mesmo lado e N3 linfonodos mediastinais e/ou hilares contralaterais, assim como qualquer linfonodo supraclavicular (DETTERBECK *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2020).

A classificação de metástase “M” é igualmente dividida, em M0 e M1, sendo M0 a não presença de metástases distantes e M1 a presença de metástases distantes. M1 é subdividida em M1a metástase regional definida como derrame/nódulos pleurais ou pericárdicos malignos, e como nódulos pulmonares

contralaterais ou bilaterais; M1b doença metastática extratorácica solitária; E, M1c múltiplas metástases extratorácicas, no mesmo órgão ou em diferentes órgãos (DETTERBECK *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2020).

	N0	N1	N2	N3
T1	IA	IIB	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabela 1 – Estadiamento do Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas (TNM). Subconjuntos das categorias T, N e M são agrupados em diferentes estágios, porque esses pacientes compartilham prognóstico semelhante. Fonte: Adaptado de *The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification* (2017)

1.4 TRATAMENTO

De acordo com a 8ª edição da Classificação do Estágio de Câncer de Pulmão (TNM), o padrão de estadiamento de CPCNP publicada em 2017, a opção de tratamento é definida de acordo com os estágios, pacientes IA e IB, ou seja, com doença localizada, são indicados para ressecção cirúrgica, sendo que em IB é levado em consideração a possibilidade de quimioterapia adjuvante, isto é, pós operatória, quando o tamanho do tumor é >4 cm. Pacientes IIA e IIB são encaminhados para ressecção cirúrgica seguida de quimioterapia adjuvante. No entanto, é comum pacientes com câncer de pulmão apresentarem resistência à quimioterapia. Essa terapia é utilizada em diferentes cenários, seja como adjuvante para reduzir os riscos de recidiva tumoral, paliativa para pacientes com metástase ou associada à radioterapia e imunoterapia. Hoje, os quimioterápicos mais amplamente utilizados são os compostos de platina, como a Cisplatina e Carboplatina em associação a outros quimioterápicos citotóxicos como a Vinorelbina, Gemcitabina, Permetrexede, Irinotecano, Paclitaxel e Docetaxel (GRIESINGER *et al.*, 2019).

Pacientes IIIA e IIIB são direcionados para tratamento multimodal, geralmente envolvendo quimioterapia e radioterapia, sendo que em IIIA ainda é considerada a lobectomia, dependendo do caso. Por fim, pacientes com

estadiamento nível IV são indicados para terapias direcionadas de acordo com as mutações detectadas, tendo como principal finalidade o controle da doença, mantendo a qualidade de vida do paciente, ou seja, tratamento paliativo (ZHU *et al.*, 2017).

As terapias-alvo ou terapias direcionadas utilizadas na clínica são por exemplo, Erlotinibe, Gefitinibe, Afatinibe e Osimertinibe para pacientes com mutação em EGFR, esses medicamentos inibem a fosforilação intracelular de EGFR (YONEDA *et al.*, 2019). Dabrafenibe e Trametinibe para pacientes com mutação em BRAF (PLANCHARD *et al.*, 2017). Crizotinibe e Alectinibe para pacientes com translocação em ALK (REMON *et al.*, 2021). E, Sotorasibe aprovado pela ANVISA em 2022 para pacientes com CPCNP KRAS mutados, mutação conhecida há décadas, para qual, até então, não havia sido desenvolvida nenhuma terapia (SKOULIDIS *et al.*, 2021).

Contudo, além do avanço das terapias-alvo, recentemente houve um grande avanço da chamada imunoterapia, principalmente no contexto do câncer de pulmão. Essa terapia faz uso de anticorpos monoclonais, conhecidos como Inibidores do *Checkpoint* Imunológico (ICI), e tem como objetivo reativar o sistema imunológico antitumoral. Destacando-se, a imunoterapia anti PD1 (Proteína de Morte Celular Programada 1) e anti PDL1 (Ligante de Morte Programada 1), uma das imunoterapias mais consagradas e estudadas na atualidade, conhecida como o principal avanço recente no tratamento do câncer, e que vem sendo considerada como um novo padrão de tratamento em primeira linha para pacientes com doença em estágio inicial ou metastática (GUO *et al.*, 2020; RUIZ-CORDERO; DEVINE, 2020).

1.5 PDL1

O sistema de vigilância imunológica é a primeira defesa do organismo contra as células tumorais. A célula cancerosa é reconhecida, ativando uma cascata de sinalização da resposta imune antitumoral, tendo como finalidade a morte celular. Todavia, o tumor explora a regulação do sistema imunológico para que não seja detectado, mecanismo conhecido como evasão imunológica (CHEN; MELLMAN, 2013). Existem diferentes mecanismos de evasão imune, dentre eles, a expressão

seletiva da proteína membrana PDL1 pela célula tumoral (KORNEPATI; VADLAMUDI; CURIEL, 2022; SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).

PDL1 é uma proteína codificada pelo gene *CD274*, expressa na superfície de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, e tem como receptor a proteína PD1 codificada pelo gene *PDCD1*, expressa na superfície de células T ativadas (ISHIDA *et al.*, 1992). Fisiologicamente, essas moléculas têm um importante papel na manutenção da homeostase imune, ou seja, a interação PD1/PDL1 é um *checkpoint* da vigilância imunológica, e atuam como fatores co-inibitórios na regulação do sistema imunológico, diminuindo a proliferação de células T e/ou interrompendo-a para que células saudáveis sejam preservadas da resposta citotóxica, minimizando inflamações crônicas auto-imunes (ILIE *et al.*, 2018; OHAEBULAM *et al.*, 2015).

As células tumorais de diferentes tipos de câncer, como o CPCNP, expressam seletivamente PDL1 em sua superfície, que interage com o receptor inibitório PD1 encontrado em linfócitos T. O PDL1, regula negativamente as atividades citolíticas das células CD4 e CD8 infiltrantes de tumores quando se liga a PD1, inibindo assim a produção de citocinas. Dessa forma, as células cancerosas utilizam essa via de controle para evadir a detecção, transmitindo um sinal inibitório que leva à supressão da via do receptor de células T (TCR), fenômeno conhecido como “exaustão de células T” (CHA *et al.*, 2019; SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018), inibindo o reconhecimento da célula tumoral pelo linfócito T e induzindo tolerância de células T específicas. Conseqüentemente, a resposta do sistema imune antitumoral é inibida, e as células tumorais continuam a proliferar-se livremente (ILIE *et al.*, 2018; PARDOLL, 2012).

Isso fez com que PDL1 se tornasse um alvo promissor para imunoterapia, através da reativação das respostas imunes antitumorais pela inibição do *checkpoint* PD1/PDL1 (KORNEPATI; VADLAMUDI; CURIEL, 2022), pois foi demonstrado que a inibição da interação entre estes potencializou as respostas imunes *in vitro* (HERBST *et al.*, 2016). É possível observar na Figura 4 o mecanismo de ação dos inibidores de *checkpoint* imunológico. A partir de então, foram desenvolvidos imunoterápicos (anticorpos terapêuticos) tanto anti-PD1, como Nivolumabe e Pembrolizumabe, quanto anti-PDL1, como Atezolizumabe e Durvalumabe, que demonstraram resultados excelentes em ensaios clínicos para diferentes tipos de câncer, como pulmão, melanoma, renal, entre outros, através da reativação das

células imunes e eliminação das células tumorais (CORTINOVIS *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2020; SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).

A imunoterapia tem se tornado padrão ouro no tratamento de CPCNP, com resultados encorajadores em termos de taxas de resposta objetiva, tempo de progressão e sobrevida global, além de perfis de toxicidade menores em relação à quimioterapia e radioterapia. Foram realizados diferentes estudos comparando a sobrevida global de pacientes submetidos à imunoterapia em comparação à quimioterapia, onde a primeira demonstrou melhor eficácia em relação à segunda (HELLMANN *et al.*, 2019).

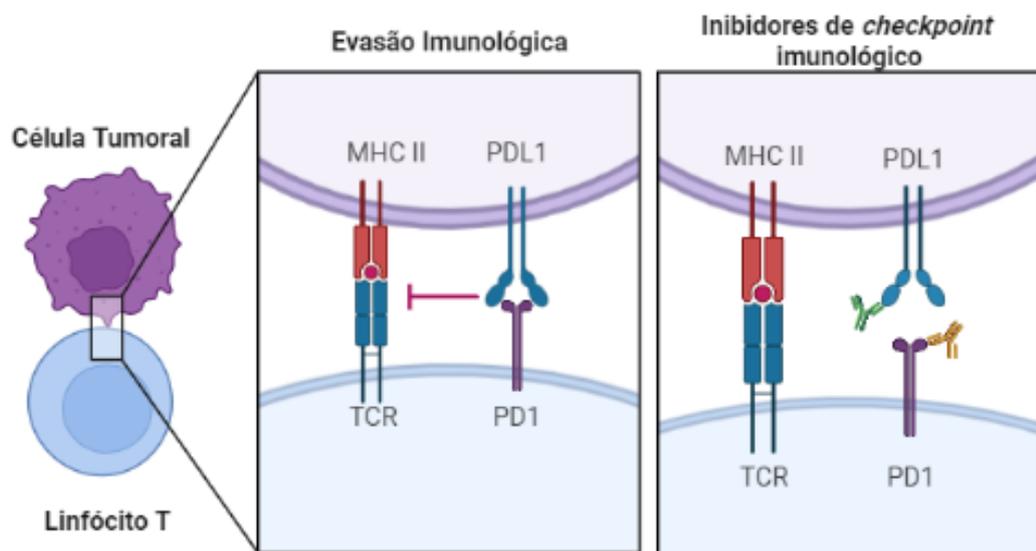


Figura 4 – Expressão de PDL1 em células tumorais. Quando PDL1 é expresso na superfície celular de células tumorais, inibe o sistema apresentador de antígeno, MHC de classe II, ao receptor de células T, pois se liga ao seu receptor PD1 na superfície do Linfócito T, suprimindo a resposta imunológica antitumoral. Contudo, os inibidores de *checkpoint* imunológico se ligam a PD1 ou PDL1 impedindo então a interação ligante:receptor, permitindo o reconhecimento da célula tumoral pelo linfócito e resultando em resposta imune antitumoral. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Estudos demonstraram a regressão tumoral com o bloqueio de PDL1, utilizando alguns anticorpos específicos, como Atezolizumabe (BRAHMER *et al.*, 2012; RITTMAYER *et al.*, 2017). O estudo *Keynote-024*, com o anticorpo Pembrolizumabe, um anticorpo monoclonal de IgG4 anti PD1, investigou o seu uso em primeira linha, associado ou não à quimioterapia em pacientes com câncer de pulmão. Três anos depois, a atualização do *Keynote-024*, fase III, demonstrou que a sobrevida global a longo prazo e sobrevida livre de progressão dos pacientes aumentou em comparação à quimioterapia a base de platina, apresentando taxa de

sobrevida global de 43,7% em 36 meses, em relação aos 24,9% no braço da quimioterapia (RECK *et al.*, 2019). Aumento da sobrevida global dos pacientes tratados com Pembrolizumabe em relação aos tratados com quimioterapia também foi observado no estudo *Keynote-042*, cujos resultados indicam benefício da imunoterapia como primeira linha de tratamento para pacientes com CPCNP localmente avançado, e não apenas em estágio IV, com doença metastática irrissecável (MOK *et al.*, 2019).

Embora aprovados pela ANVISA, um dos pré-requisitos para indicação do uso destes medicamentos é que o escore de marcação positiva em Imuno-histoquímica (IHQ) para PDL1 seja maior que 1% ou 10% no tecido tumoral, dependendo do tipo de neoplasia e imunoterápicos prescrito (DIGGS; HSUEH, 2017; GUO *et al.*, 2020). Por exemplo, o Pembrolizumabe em monoterapia, é indicado para CPCNP com expressão de PDL1 $\geq 1\%$, sem alterações em *EGFR* e *ALK*, pacientes com essas alterações genômicas devem ter recebido tratamento prévio direcionado às mesmas antes de serem tratados com o imunoterápico (MOK *et al.*, 2019).

O método mais consolidado para obtenção de escore de PDL1 é o *Combined Positive Score* (CPS), que identifica a porcentagem de células tumorais e células imunes infiltradas no tumor marcadas positivamente conforme demonstrado na Figura 5, sendo $<1\%$ = sem expressão de PDL1 (negativo), 1-10% baixa expressão de PDL1 (positivo), $> 10\%$ alta expressão de PDL1 (positivo) e $\geq 50\%$ expressão muito alta de PDL1 (positivo), contudo ainda existe divergência entre os patologistas em relação ao método de análise de escore, e comumente patologistas diferentes utilizam metodologias diferentes, dificultando um consenso na comunidade médica (DIGGS e HSUEH, 2017).

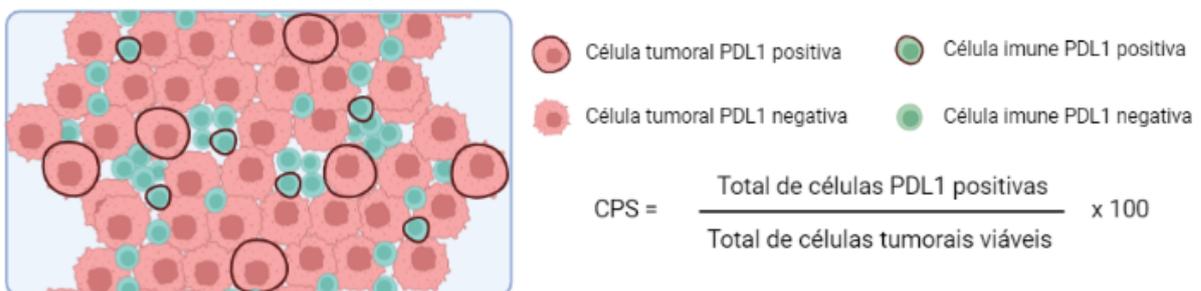


Figura 5 – Método CPS para obtenção de escore de PDL1. O método CPS leva em consideração a soma das células PDL1 positivas, tanto tumorais, quanto infiltradas imunes. Essa soma é dividida pelo número total de células tumorais viáveis, e o resultado é multiplicado por 100, obtendo a porcentagem de expressão de PDL1 na amostra/campo. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

1.6 NRF2

NRF2 é uma proteína de 605 aminoácidos, que contém sete domínios NRF2-ECH altamente conservados, sendo eles Neh1, Neh2, Neh3, Neh4, Neh5, Neh6 e Neh7, representados na Figura 6. Essa proteína codificada pelo gene *NFE2L2* é um fator de transcrição responsável pela ativação transcricional de diferentes genes antioxidantes e de detoxificação de xenobióticos, em resposta ao acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) ou insulto eletrofílico, sendo de relevante importância para a homeostase redox (HE; ANTONUCCI; KARIN, 2020; TONELLI; CHIO; TUVESON, 2018).

Neh1 é um domínio de ligação à Enzima Conjugadora de Ubiquitina (UbcM2), ligada à proliferação celular, essa interação regula a estabilidade do NRF2 (PLAFKER *et al.*, 2010); E, associação à *Small Maf* (sMAF), proteína que atua como fator de transcrição ligando-se ao DNA e interferindo na regulação gênica (OTSUKI; YAMAMOTO, 2020). Na região N-terminal, está localizado o domínio Neh2, de ligação à KEAP1, também envolvido na degradação proteossomal de NRF2. Já o domínio Neh3, de ligação à Proteína 6 de ligação ao DNA da Helicase de Cromodomínio (CHD6) está localizado na região C-terminal, importante para a ativação de transcrição. Neh4 e Neh5 são domínios de transativação independentes, que podem se ligar a ativadores ou repressores, como a Ubiquitina Ligase (HRD1) (SÁNCHEZ-ORTEGA; CARRERA; GARRIDO, 2021). O domínio Neh6, de ligação à Proteína Contendo Repetições de β -transducina (β TrCP) está envolvido na regulação da estabilidade de NRF2. E, o domínio Neh7 interage com o Receptor Retinóico X α (RXR α), um repressor de NRF2 (MENEGON; COLUMBANO; GIORDANO, 2016; WANG *et al.*, 2013).

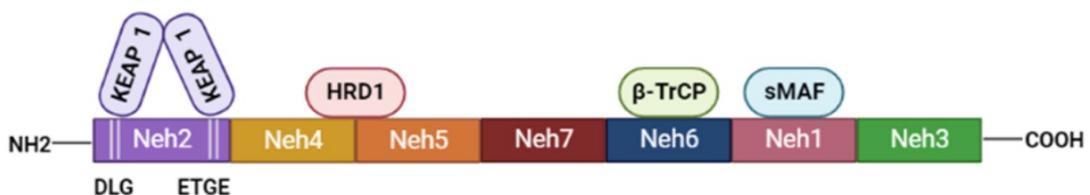


Figura 6 – Estrutura da proteína NRF2. Os 7 domínios de NRF2 altamente conservados são chamados domínios Neh. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

A proteína KEAP1, que interage com o domínio Neh2, é o regulador negativo de NRF2. Essa proteína pertence à família BTB-Kelch e, em condições fisiológicas, liga-se ao NRF2 para sua degradação. Na via canônica, o NRF2 é expresso a nível basal, contudo sua meia vida é curta. No citoplasma, os motivos NRF2 ETGE/DLG ligam-se aos domínios KEAP1 Kelch, essa ligação faz com que a ubiquitina ligase CUL3/RBX1 E3 se junte ao complexo (KEAP1/NRF2/CUL3), no qual CUL3 atua como uma proteína “andaime” (do inglês *scaffold*) que se liga ao domínio BTB de KEAP1, permitindo a formação de um complexo com uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2) (DEBLASI; DENICOLA, 2020). O complexo KEAP1/NRF2/CUL3 tem como alvo a poliubiquitinação e degradação proteossomal do NRF2, demonstrado na Figura 7.

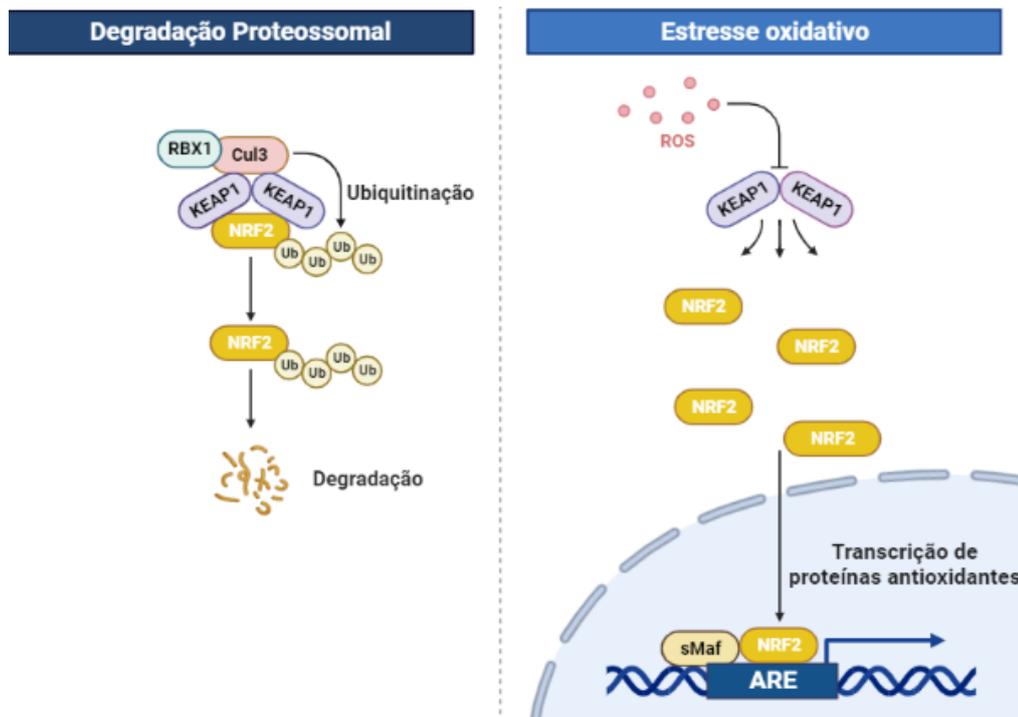


Figura 7 – Via KEAP1/NRF2 em condições fisiológicas e sob estresse oxidativo. Em condições fisiológicas NRF2 é expresso constitutivamente, porém é constantemente degradado pela via ubiquitina-proteossoma de maneira dependente de KEAP1. Quando sob estresse oxidativo KEAP1 sofre mudança conformacional desfazendo o complexo KEAP1/NRF2/CUL3, assim a degradação de NRF2 é interrompida e o mesmo se transloca para o núcleo, atuando como um fator de transcrição de genes antioxidantes e citoprotetores. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Na presença de estresse oxidativo e acúmulo de ROS, KEAP1 sofre oxidorredução e/ou alquilação, em resíduos de cisteína altamente reativos, levando a uma mudança conformacional, que interrompe a ligação Kelch/DLG e faz com que ela se desligue de NRF2. A degradação de NRF2 é interrompida e os seus níveis citoplasmáticos aumentam e, com o acúmulo no citoplasma, acontece a sua

translocação para o núcleo, onde atua efetivamente como fator de transcrição (LIU; PI; ZHANG, 2022), ativando a transcrição de diversos genes alvos, como enzimas metabolizadoras de fármacos, proteínas antiapoptóticas, reguladores do ciclo celular, reguladores de proliferação, e principalmente proteínas antioxidantes, como Tiorredoxina Redutase 1 (TXNRD1) proteína que reduz as tiorredoxinas; Família de Portadores de Solutos 7 Membro 11 (SLC7A11) um transportador de cistina/glutamato; Gama-Glutamilcisteína sintetase (GCLM) a primeira enzima limitante da síntese de glutathione, entre outras. NRF2 possui um mecanismo de regulação por feedback positivo, o que aumenta a transcrição de seus genes alvo e promove uma resposta rápida a qualquer estresse celular, conferindo proteção celular (BADER *et al.*, 2021; DELGOBO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

No contexto do câncer de pulmão, o NRF2 desempenha papéis ambíguos, pró e antitumoral. Em estágios iniciais, NRF2 possui um papel antitumoral, evitando a carcinogênese pré-maligna, danos ao DNA e mutações iniciais do câncer (ROBERTSON *et al.*, 2020). Porém, em estágios mais avançados atua como pró carcinogênico, conferindo fenótipo maligno. As células tumorais apresentam aumento das taxas metabólicas, hipóxia, disfunção mitocondrial e/ou peroxissomal, bem como crescimento independente de ancoragem, e isso faz com que estejam constantemente expostas a altos níveis de ROS, sendo assim mutações ativadoras da via NRF2/KEAP1 podem conferir uma condição vantajosa para a progressão tumoral, devido à ativação constitutiva de NRF2 e superexpressão dos seus genes-alvo citoprotetores (ROBERTSON *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2021).

De acordo com dados do Atlas Genômico do Câncer (TCGA), cerca de 26% dos pacientes com CPCNP apresentam mutações na via KEAP1/NRF2, elevando os níveis de NRF2 nuclear, o que está diretamente ligado a um mau prognóstico devido à alta capacidade metastática desse subgrupo. Mutações com perda de função em *KEAP1* estão presentes em cerca de 17% dos Adenocarcinomas e 12% dos Carcinomas de Células Escamosas. Inversamente, as mutações com ganho de função em *NFE2L2*, que tipicamente acontecem no domínio ETGE/DLG de NRF2, o qual interage com o domínio Kelch em KEAP1, são mais frequentes em Carcinoma de Células Escamosas, representando 15% dos casos, e apenas 3% em Adenocarcinomas (SÁNCHEZ-ORTEGA; CARRERA; GARRIDO, 2021). Assim, mutações em KEAP1 e NRF2 levam a uma consequência em comum: perda da degradação de NRF2 dependente de KEAP1, com acúmulo e translocação nuclear

do NRF2 ativo. Ademais, estudos demonstraram que a sobreposição da perda de função de *KEAP1* com alterações genéticas em *EGFR*, *ALK* e/ou *KRAS* induz resistência às terapias-alvo (DEMPKE; RECK, 2021; HAMMERMAN *et al.*, 2012; KRALL *et al.*, 2017).

Atualmente, o subgrupo de pacientes mutados na via NRF2 não possui diagnóstico molecular ou terapia-alvo específica, sendo submetidos à quimioterapia e radioterapia convencionais. Contudo, é bem estabelecido na literatura que a ativação desse fator de transcrição em tumores mutados em *KEAP1* ou *NFE2L2* confere um fenótipo de resistência aos quimioterápicos, bloqueando, por exemplo, a apoptose mediada pelo estresse do retículo endoplasmático (JEONG *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2016). A hiperativação de NRF2 resulta em resistência à morte celular nas células cancerosas, diminuindo a sensibilidade dos pacientes com CPCNP aos compostos de platina, tipicamente usados na primeira linha em CPCNP, conferindo um maior risco de recidiva após terapia adjuvante com cisplatina (DELGOBO *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2016). Assim, se mostra de grande importância a identificação de uma terapia-alvo eficaz em pacientes *KEAP1/NFE2L2* mutados.

Interessantemente, estudos recentes têm indicado que pacientes com mutações na via KEAP1/NRF2 podem demonstrar benefício com imunoterapia anti-PDL1 em alguns tipos de câncer, como melanoma e câncer de pulmão (BEST *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2018). Contudo, existem divergências na bibliografia, com estudos demonstrando que mutações na mesma via levam à resistência aos imunoterápicos e até mesmo diminuição da sobrevida dos pacientes com tumores mutados tratados com imunoterapia, em relação aos tumores selvagens (CHEN *et al.*, 2020; MARINELLI *et al.*, 2020; SCALERA *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021).

Tendo em vista que os estudos sobre a eficácia dos inibidores de *checkpoint* imunológico no CPCNP mutante KEAP1/NRF2 se mostram conflitantes, e levando em consideração a importância de elucidar essas mutações como preditivas de resposta positiva ou negativa à imunoterapia anti-PD1/anti-PDL1, buscamos no presente trabalho investigar se a regulação da expressão de PDL1 em CPCNP está associada com a ativação da via de sinalização KEAP1/NRF2, com o objetivo de elucidar essa divergência na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se mutações na via KEAP1/NRF2 e hiperativação de NRF2 impactam a expressão de PDL1 em CPCNP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Investigar a associação entre a expressão de PDL1 (*CD274*) e as mutações nos genes *NFE2L2* e *KEAP1* em pacientes com CPCNP;
- II. Correlacionar os níveis da proteína PDL1 com o imunoconteúdo de NRF2 e seu gene alvo *TXNRD1* em amostras tumorais de pacientes com CPCNP;
- III. Avaliar o impacto de depleção ou inibição de NRF2 sobre a expressão de PDL1 (*CD274*) em linhagem celular de CPCNP KEAP1 mutante.

3 METODOLOGIA

Inicialmente, foram realizadas análises bioinformáticas de genoma e transcriptoma de câncer (TCGA), em que foi avaliada a correlação entre a expressão de PDL1 e mutação na via KEAP1/NRF2 em pacientes com CPCNP. Também avaliamos a correlação de expressão das proteínas PDL1, NRF2 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em amostras tumorais de uma coorte de pacientes diagnosticados com CPCNP. Por fim, investigamos *in vitro* a possível regulação de PDL1 por NRF2, a partir da determinação de expressão de mRNA de PDL1 por RT-qPCR na linhagem A549 mutante KEAP1 com *knockdown* e inibidor farmacológico de NRF2.

3.1 BIOINFORMÁTICA

3.1.1 Pré-processamento dos transcriptomas, análises de correlação da expressão de PDL1 com assinatura de genes-alvos de NRF2

Para análise de correlação de *CD274* (PDL1) e assinatura de NRF2 em CPCNP, foi utilizada uma coorte de amostras de Sequenciamento de RNA (RNAseq) de CPCNP de 1.145 pacientes do TCGA. Inicialmente, as matrizes de “*counts*” de transcritos totais de adenocarcinoma e carcinoma escamoso, assim como informação pareada sobre a presença/ausência de mutações nos genes de interesse em cada amostra, foram baixadas com o auxílio do pacote *TCGAbiolinks* (COLAPRICO *et al.*, 2016; HOADLEY *et al.*, 2018). Para a normalização dos dados de transcriptoma, foi utilizado o método TMM (*trimmed mean of M-values*), disponível no pacote EdgeR, o qual elimina os transcritos com baixa expressão, e ajusta fatores para normalização do tamanho das bibliotecas do transcriptoma de cada amostra, de modo a eliminar possíveis diferenças na eficiência/profundidade (“*counts*” totais) de sequenciamento de RNA de cada amostra, permitindo a comparação entre amostras (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010; ROBINSON; OSHLACK, 2010). Os “*counts*” normalizados de cada transcrito foram então transformados em logaritmo das contagens/*count* por milhão ($\log_2(\text{cpm} + 1)$).

Expressão de genes normalizados e dados de mutação dos tumores foram combinados e usados para estimativa da: i) análise de correlação de Pearson entre *CD274* e níveis de mRNA de genes alvo de NRF2; ii) expressão de *CD274* em

mutantes KEAP1 *versus* tumores de pulmão com KEAP1 tipo selvagem no TCGA; iii) expressão de *CD274* em tumores com expressão alta *versus* baixa de assinatura de NRF2. A assinatura de genes alvos transcricionais de NRF2 foi baseada no estudo de Levings e colaboradores (LEVINGS *et al.*, 2018), os quais selecionaram 32 genes, com região promotora ativada por NRF2, cuja alta expressão reflete a superativação de NRF2 em múltiplos tipos tumorais. São eles: *ABCB6*, *ABCC3*, *AKR1C3*, *ANXA10*, *ASF1A*, *DNAJB4*, *EPHX1*, *FECH*, *FTH1*, *GCLC*, *GCLM*, *GSR*, *GSTM3*, *KEAP1*, *MAFG*, *ME1*, *NAMPT*, *NECAB2*, *NQO1*, *PANX2*, *PIR*, *PRDX1*, *SLC3A2*, *SLC7A11*, *SRXN1*, *TKT*, *TLK1*, *TMTC3*, *TRIM16L*, *TXN*, *TXNRD1*, *ZNF746*. Para o cálculo do valor da assinatura de NRF2 para cada amostra tumoral (uma estimativa indireta do grau de ativação de NRF2), foi calculada a média da expressão normalizada log₂ (cpm+1) dos 32 genes da assinatura, de acordo com o validado por Levings e colaboradores (LEVINGS *et al.*, 2018).

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.2.1 Obtenção do N amostral

Para esse trabalho, foram utilizadas amostras de tumores pulmonares a partir de biorrepositório no Laboratório da Faculdade de Medicina (FAMED), da Universidade de Passo Fundo (UPF), provenientes de 86 pacientes com neoplasia pulmonar primária do tipo histológico CPCNP atendidos no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) em Passo Fundo – RS. As amostras tumorais coletadas (lobectomias e/ou biópsias) foram devidamente fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFPE), e previamente caracterizadas histologicamente por método Hematoxilina e Eosina (H&E) ou IHQ para p63, TTF1, CK5/6 e CK7 nos casos inconclusivos por H&E. As amostras foram entregues para a equipe executora desta pesquisa já em blocos de parafina. Os protocolos de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Coleta e Armazenagem foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e CEP-HSVP de Passo Fundo via Plataforma Brasil (CAAE 83271317.1.0000.5347). Na ocasião da assinatura do TCLE os pacientes autorizaram o uso das amostras tumorais para estudos futuros mediante aprovação do novo estudo pelo Comitê de Ética. Assim, o projeto do presente estudo foi submetido e aprovado pelo CEPSH-UFSC via Plataforma Brasil (CAAE

47699320.0.0000.0121) para autorização das análises de IHQ executadas neste projeto.

3.2.2 Imuno-histoquímica PDL1

A imunomarcagem e quantificação do escore de PDL1 foram realizadas de acordo com GUO *et al.* (2020) e DIGGS e HSUEH (2017), conforme preconizado na clínica para uso do marcador por imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo monoclonal anti-PDL1 recombinante 28-8 Ab205921 (Abcam), em plataforma semiautomatizada Ventana Benchmark XT (Roche), de acordo com as recomendações dos fabricantes, no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Tiago (HU-UFSC).

Inicialmente, foram realizados cortes de 3 µm de espessura nos blocos de parafina provenientes dos pacientes com CPCNP para confecção das lâminas. Essas lâminas foram inseridas no carrossel da plataforma semiautomatizada, e após as etapas automatizadas de desparafinação, bloqueio da peroxidase e reativação antigênica, foi pipetado manualmente 100µL do anticorpo primário anti-PDL1 em uma diluição de 1:400 em cada lâmina e seguiu-se a incubação automatizada. Após, se deram as etapas de incubação com os anticorpos de amplificação do sinal, seguido de anticorpo secundário e cromógeno com o *kit* de detecção *UltraView™* DAB – Amplificação (Roche), conforme demonstrado na Figura 8. Por fim, as lâminas devidamente marcadas passaram por processo de contra coloração com hematoxilina. Foi empregado em cada lâmina uma amostra de tecido de tonsila, com expressão conhecida de PDL1, como controle positivo.

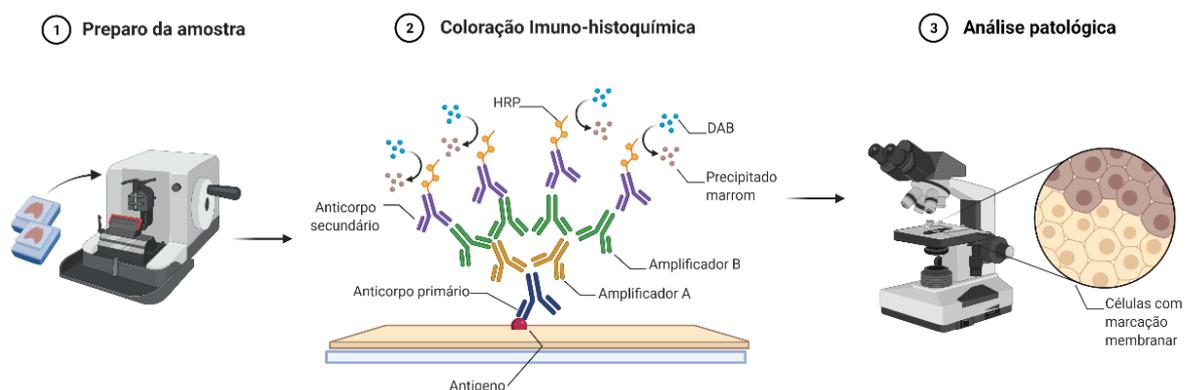


Figura 8 – Imuno-histoquímica semiautomatizada. Esquema do processamento de amostra para imuno-histoquímica semiautomatizada. Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Posteriormente, foi realizada a digitalização das lâminas em aumento de 40x no Axio Scan (Zeiss), considerando 20 *slices* por lâmina e intervalos de 15 e 20µm. As lâminas foram analisadas independentemente por uma médica patologista (Dra. Daniella Serafin Couto Vieira), e conferidas por mais dois pesquisadores de acordo com o método CPS (DE RUITER *et al.*, 2020), para interpretação do imunoescore da expressão de PDL1. Essa metodologia de classificação da proporção tumoral (% de pelo menos 100 células tumorais viáveis que demonstram coloração de membrana parcial ou completa), identifica a porcentagem de células tumorais e células imunes infiltradas no tumor marcadas positivamente (DIGGS e HSUEH, 2017).

Neste trabalho, foram considerados os seguintes imunoescores de expressão da proteína PDL1: <1% = negativo, 1-10% = positivo (baixa expressão), 11-49% = positivo (alta expressão) e ≥ 50% positivo (expressão muito alta). Para cada amostra foram analisados 5 campos, em cada campo foi realizada a contagem do número total de células tumorais e infiltrado imune marcados positivamente para PDL1, esse valor foi dividido pelo número total de células tumorais viáveis do campo e multiplicado por cem. A média dos 5 campos configurou a porcentagem de expressão da amostra.

3.2.3 Imuno-histoquímica NRF2

Para NRF2, cortes de 5 µm de espessura foram realizados nos blocos de parafina para confecção de lâminas histológicas, estas foram previamente tratadas com silano para maior aderência da amostra. Para desparafinação as lâminas foram incubadas a 50°C por 40 min e posteriormente a 60°C por 10 min. Em seguida, o processo de hidratação da amostra se deu por três banhos de xileno com duração de 7 min cada, banho em gradiente de etanol (100, 95 e 70%) 7 min em cada concentração e, por fim, três banhos de água destilada de 7min cada. A recuperação do antígeno foi realizada fervendo os cortes em tampão EDTA (pH 8,0) por 40 min seguidos de resfriamento por 20 min. Então, as proteínas foram bloqueadas com soro de cabra 10% e avidina/biotina (Vector Laboratories), e posteriormente as lâminas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-NRF2 Ab31163 (Abcam), diluído em solução de bloqueio, em uma câmara umidificada a 4°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água H1009 (Sigma). A incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, *kit Vector Impress* (Vector Laboratories), se deu em seguida por 1h.

Então, as lâminas foram coradas por 5 min com DAB (diaminobenzidina), contracoradas com hematoxilina, lavadas com água e montadas usando *Permount Mounting Medium*. Posteriormente, cinco campos por lâminas foram fotografados em um *Motic Digital Slide Scanning System* com ampliação de 100X. E, a intensidade de marcação para NRF2 nuclear foi pontuada por 3 pesquisadores independentemente usando uma escala de 4 graus: negativo (0), fraco (1+), moderado (2+) e forte (3+). A porcentagem de células tumorais coradas foi pontuada da seguinte forma: sem células positivas (0), 1–5% (1), 6–25% (2), 26–75% (3) e 76–100% (4). Por fim, foram calculadas as médias dos cinco campos, e os escores ordinais para intensidade e fração de células tumorais coradas foram multiplicados, obtendo-se valores na faixa de 0 a 12. Amostras com pontuação ≥ 6 foram consideradas como alta expressão nuclear de NRF2.

3.2.4 Imuno-histoquímica TXNRD1

Levando em consideração os nossos dados de bioinformática e achados anteriores do nosso grupo de pesquisa, os quais demonstraram que a TXNRD1 se correlaciona com a assinatura de genes alvos de NRF2, e se sobrepõe a alterações na via KEAP1/NRF2 em pacientes com CPCNP, mas não a outras mutações comuns nesse tipo de câncer (DELGOBO *et al.*, 2021), decidimos utilizá-la como gene alvo de NRF2 a fim de comparação com PDL1.

Cortes de 5 μm foram desparafinizados e hidratados, seguindo o protocolo para IHQ de NRF2 descrito anteriormente. Para a recuperação de epítomos foi utilizado Tris-EDTA pH 9,0 (Tris 10mM/EDTA 1mM) combinado com 20min de fervura a 95°C. A permeabilização do tecido foi realizada com 0,2% Triton-X100 em PBS por 10 min. O bloqueio das proteínas foi realizado com soro de cabra 10% contendo BSA 1% em TBS-T durante 40 min à temperatura ambiente, seguida de três lavagens de 2 min cada com tampão TBS-T. A imunomarcagem se deu pela utilização do anticorpo monoclonal anti-TXNRD1 Ab124954 (Abcam), em uma diluição de 1:150. A incubação com o anticorpo primário durou 16h em câmara umidificada a 4°C, seguida de três lavagens de 5 min em TBS-T e a inibição da atividade da peroxidase endógena foi efetuada com H₂O₂ 0,3% em metanol por 15 min. As amostras foram novamente submetidas à 3 lavagens de 5 min com TBS-T e incubadas com anticorpo anti-IgG HRP conjugado Ab6721 (Abcam) em uma diluição de 1:150 por 40 min à temperatura ambiente.

Para coloração foi utilizado o cromógeno DAB *Substrate Kit* Ab64238 (Abcam) de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina por 3 min, e por fim, foram montadas com Entellan (Merck). O controle negativo correspondente para cada amostra foi conduzido pelo mesmo protocolo com a omissão do anticorpo primário.

Por fim, cinco campos por amostra foram fotografados em 200X no microscópio BX41 (Olympus). A intensidade da coloração e a porcentagem de células com expressão de TXNRD1 foram pontuadas usando o mesmo método aplicado e descrito acima para NRF2. Então, dividimos a pontuação em baixa expressão: 0-8, e alta expressão: 9-12.

3.3 CULTIVO CELULAR

Linhagem celular humana A549 proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC) foi cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (D5796, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e *Antibiotic Antimycotic* 1x A5955 (Sigma-Aldrich) em incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram tratadas com inibidor de NRF2, ML385 (SML1833-5MG, Sigma-Aldrich), com 60% de confluência.

3.4 KNOCKDOWN NRF2 (siRNA)

Em placas de 12 poços foram plaqueadas $1 \cdot 10^5$ células/poço e a transfecção foi realizada em 24h com 70% de confluência. O silenciamento do gene *NFE2L2* foi feito através de micro RNAs de interferência (siRNA) direcionados a *NFE2L2* sc-37030 (Santa Cruz) em concentração final de 100 nM, conforme demonstrado na Figura 9. Foi empregado *Silencer Negative Control* (AM4611, ThermoFischer) 100 nM como controle negativo. As transfecções foram realizadas utilizando DMEM sem SFB e antibióticos, e Lipofectamina *RNAiMAX Reagent* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A avaliação do *knockdown* de *NFE2L2* por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Transcrição Reversa (RT-qPCR) foi feita 72h após a transfecção.

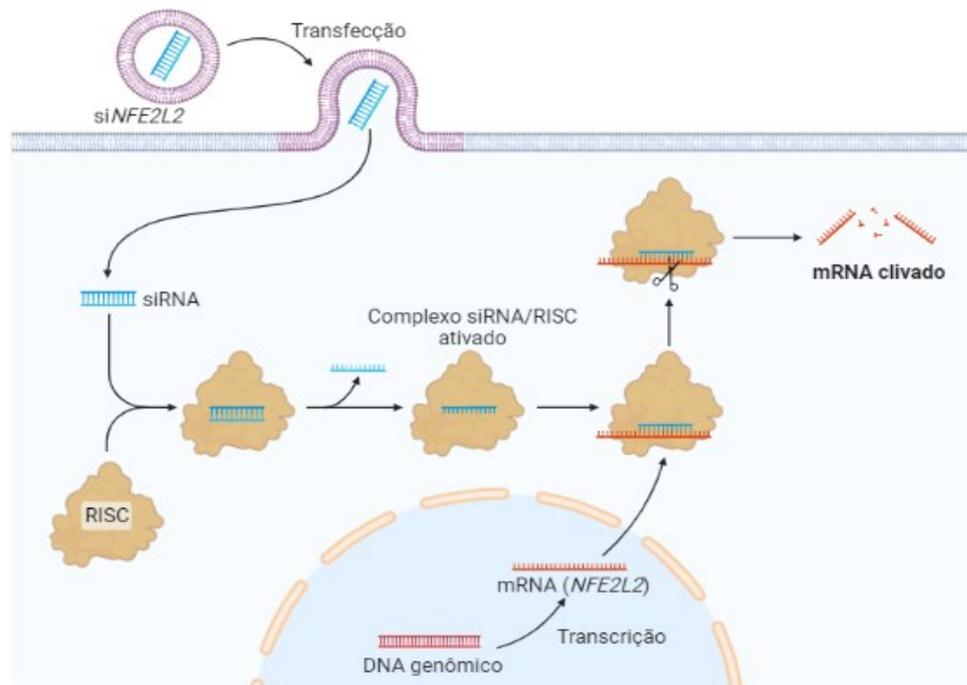


Figura 9 – knockdown *NFE2L2* por siRNA. Silenciadores de gene siRNA tendo como alvo *NFE2L2* são transfectados para dentro da célula utilizando lipofectamina, dentro da célula o siRNA se liga ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), então o siRNA é desenrolado e o complexo siRNA/RISC é ativado. O complexo ativado associa-se ao mRNA alvo, ou seja, o transcrito de *NFE2L2*, e essa associação cliva o mRNA alvo, silenciando temporariamente a sua expressão. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

3.5 RT-qPCR

O RNA mensageiro total (mRNA) das células A549, silenciadas para NRF2 e seus respectivos controles foi extraído usando TRIzol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. 1000ng de mRNA foram utilizados para sintetizar DNA complementar de primeira fita (cDNA) usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFischer) em termociclador *SimpliAmp* (ThermoFischer). As reações de amplificação e quantificação foram realizadas com a plataforma PCR em Tempo Real HT 7900 (ThermoFischer), conforme ilustrado na Figura 10. Cada reação consistiu em 5 µl de *PowerUp SYBR Green Master Mix* (ThermoFischer), 100 nM de primers *forward* e *reverse*, água livre de nuclease e 1 µL de cDNA. As condições de ciclagem foram as seguintes: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 72°C por 1 min. Os níveis relativos de transcrição foram calculados usando o método $\Delta\Delta CT$ e normalizados para os genes

constitutivos *GAPDH*. Foram analisados o gene *CD274* (gene codificante da proteína PDL1), e três genes alvos de NRF2: *TXNRD1*, *SLC7A11* e *GCLM*.

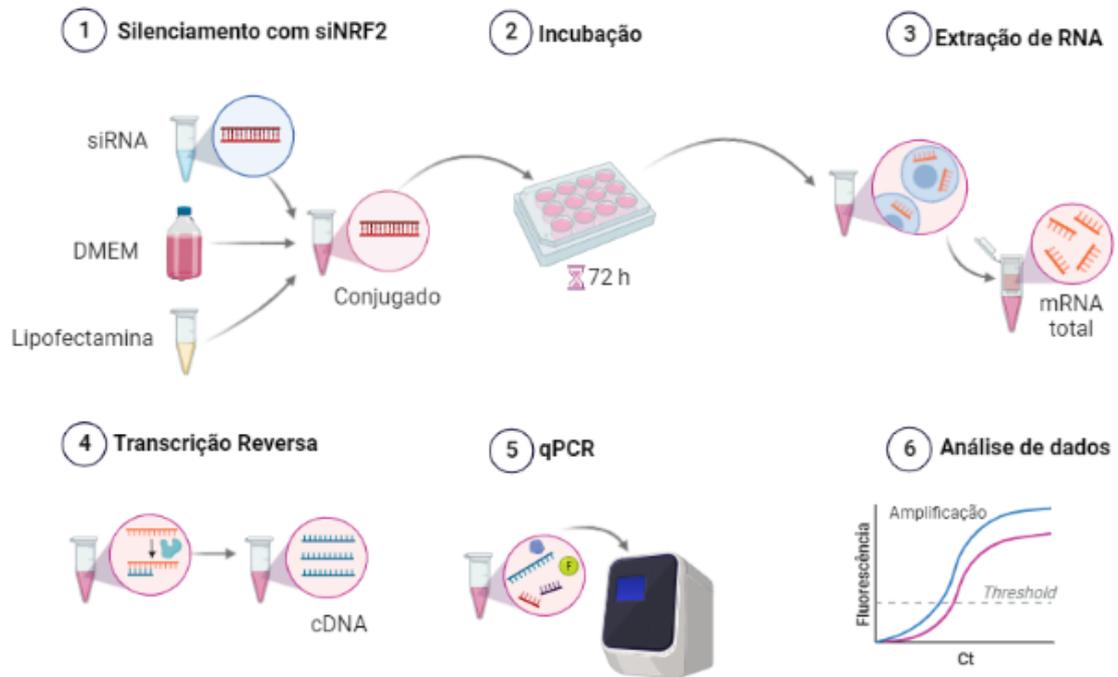


Figura 10 – Desenho experimental da análise de expressão de mRNA por RT-qPCR. A linhagem A549 foi dividida em grupo controle, tratada com siNegativo, e grupo silenciado com siNFE2L2 por 72h. Após o tempo de incubação as amostras foram coletadas e seguiu-se o processo de extração de RNA, transcrição reversa e por fim amplificação de genes alvos por qPCR. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Os primers utilizados foram desenhados pela ferramenta *Primer-Blast*:

CD274 (PDL1) (Fwd: 5'-TGCCGACTACAAGCGAATTACTG-3'/Rev: 5'-CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG-3'), *TXNRD1* (Fwd: 5'-GTTACTTGGGCATCCCTGGTGA-3'/Rev: 5'-CGCACTCCAAAGCGACATAGGA-3'), *SCL7A11* (Fwd: 5'-TCCTGCTTTGGCTCCATGAACG-3'/Rev: 5'-AGAGGAGTGTGCTTGCGGACAT-3'), *GCLM* (Fwd: 5'-TCTTGCCTCCTGCTGTGTGATG-3'/Rev: 5'-TTGGAACTTGCTTCAGAAAGCAG-3'), *GAPDH* (Fwd: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3'/Rev: 5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3').

3.6 ENSAIO CLONOGÊNICO

Em placas de 12 poços, foram plaqueadas $3 \cdot 10^2$ células/poço (A549 cultivada em DMEM com 10% de SFB e *Antibiotic Antimycotic* 1x), após 96h as células foram tratadas duas vezes com inibidor de NRF2 ML385 7,5 μ M, com intervalo de 96h entre cada tratamento, o desenho experimental está demonstrado na Figura 11. Ao fim do segundo tratamento (12 dias) as colônias foram fixadas e coradas. Cada poço foi lavado com PBS 1x, corado e fixado com *Cell Stain* (20294, Merck) durante 15 min. Posteriormente as placas foram submersas três vezes em H₂O para retirada do corante e deixadas para secar em temperatura ambiente. A contagem das colônias foi realizada em estereomicroscópio, considerando como colônia agrupamentos com mais de 50 células.

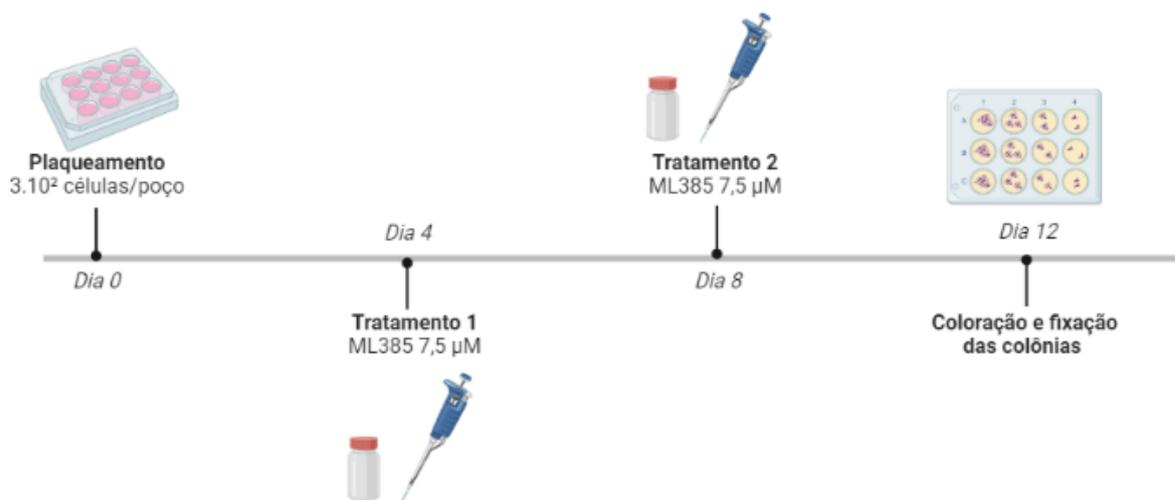


Figura 11 – Desenho experimental do Ensaio Clonogênico. Também conhecido como Ensaio de Formação de Colônias, este é um ensaio com longa duração de sobrevivência celular *in vitro*, que avalia a capacidade de células individuais sobreviverem e se reproduzirem para formar colônias. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estática foi realizada pelo *software GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, California, USA). Todos os resultados *in vitro* foram representados como a média \pm Desvio Padrão (DP) de dois a três experimentos independentes, cada um realizado em duplicata ou triplicata. A significância estatística entre dois grupos foi comparada com os testes Mann-Whitney ou Teste t bicaudal não-pareado, para dados não-paramétricos e paramétricos, respectivamente. Teste Exato de Fisher (2

grupos) ou Chi-quadrado (>2 grupos) foram usados para comparar as proporções entre os grupos. O teste de correlação por regressão de Pearson foi usado para estabelecer a relação direta ou inversa entre 2 variáveis. Os valores de p foram anotados como segue: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 A EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE PDL1 EM CPCNP NÃO ESTÁ CORRELACIONADA COM A ASSINATURA DE NRF2 E MUTAÇÕES NA VIA KEAP1/NRF2

Inicialmente, analisamos a correlação da expressão de PDL1 (gene *CD274*) com a expressão da assinatura de NRF2 em uma coorte de dados de 1.145 pacientes com CPCNP do TCGA, subdivididos nos tipos histológicos LUAD (*lung adenocarcinoma*) e LUSC (*lung squamous cell carcinoma*), nomenclatura usada pelo TCGA. Usando correlações de Pearson, observou-se que o gene de PDL1 não apresentou uma correlação significativa com a assinatura de NRF2 (Figura 12A; Pearson $r = -0.03$ e 0.08). Tendo em vista achados anteriores demonstrando que a expressão de *TXNRD1*, um alvo clássico de NRF2, se associa fortemente com a presença de mutações na via KEAP1/NRF2 em CPCNP, e não com outras alterações genéticas comuns nesse tipo de câncer (*EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA*, *TP53*) (DELGOBO *et al.*, 2021) optamos pela utilização de *TXNRD1* como gene preditor da expressão de NRF2 afim de comparação com PDL1 nesse trabalho. Contudo, não foi possível observar correlação significativa entre as expressões de *TXNRD1* e *CD274* em nenhum dos subtipos histológicos (Figura 12A; Pearson $r = 0.06$ e 0.33).

Por outro lado, a expressão de *TXNRD1* apresentou uma alta correlação positiva com os escores de assinatura de NRF2, em ambos os tipos histológicos de CPCNP (Figura 12B; Pearson $r = 0.80$ e 0.87). Como controle, a relação entre a assinatura de NRF2 e outro gene tipicamente associado com a resposta a imunoterapia, o *CTLA4* (Proteína Associada a Linfócitos T Citotóxicos 4) foi testada, e nenhuma associação significativa foi observada (Figura 12C; Pearson $r = 0.15$ e 0.18). Então, selecionamos apenas os tumores mutantes *KEAP1* da coorte do TCGA e analisamos a expressão de *TXNRD1* e *CD274*, observamos que os tumores com mutação em *KEAP1* tinham uma expressão de *TXNRD1* significativamente mais elevada ($p < 0,0001$) do que os tumores não mutados, já a expressão de *CD274* não demonstrou diferença entre os tumores mutados e selvagens (Figura 12D).

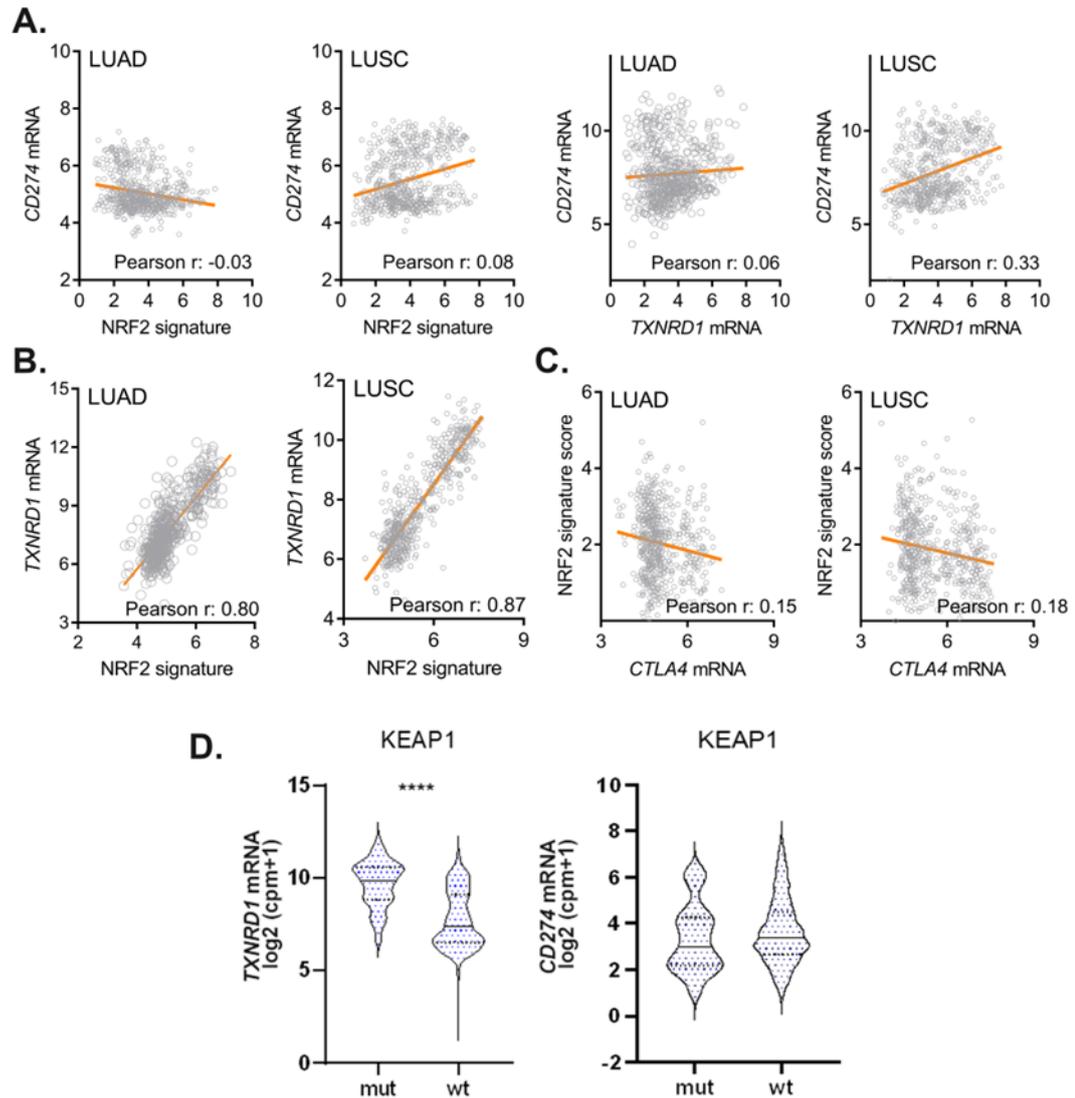


Figura 12 – Expressão de PDL1 não está correlacionada com assinatura de NRF2. Gráfico de pontos de correlação de Pearson em tumores CPCNP (*LUAD* e *LUSC*) de amostras do TCGA representando a correlação entre: **(A)** mRNA de *CD274* com escore de assinatura de NRF2 e expressão de *TXNRD1*; **(B)** mRNA de *TXNRD1* com escore de assinatura de NRF2; **(C)** mRNA de *CTLA4* e assinatura de NRF2. **(D)** Expressão de *TXNRD1* e *CD274* (PDL1) em tumores *LUAD* e *LUSC* do TCGA agrupados de acordo com a mutação em *KEAP1* (mut) versus amostras com *KEAP1* selvagem (wt) (Teste de Mann-Whitney; bilateral; $p < 0,0001$). Fonte: Elaborada pela autora (2022)

4.2 O IMUNOCONTEÚDO DE PDL1 NÃO ESTÁ ASSOCIADO COM A ATIVAÇÃO DE NRF2 EM CPCNP

Dado os resultados de correlação entre NRF2, TXNRD1 e PDL1 em nível transcricional apresentados Figura 12, decidimos analisar se a relação entre PDL1 e NRF2 poderia se dar em nível pós-traducional, através da avaliação dos níveis das proteínas PDL1, NRF2 e TXNRD1 em amostras tumorais de uma coorte de pacientes com CPCNP. Foram analisadas 86 amostras tumorais de CPCNP, todas coletadas previamente a qualquer protocolo farmacológico ou radioterapia. A coorte de 86 amostras submetidas à IHQ para PDL1 consistia de 62 casos diagnosticados com Adenocarcinoma (72,1%) e 24 casos identificados com Carcinoma de Células Escamosas (27,9%). Na Figura 13 estão demonstradas imagens das análises imuno-histoquímicas para NRF2, TXNRD1 e PDL1, identificando os diferentes níveis de expressão do conteúdo proteico nas amostras representativas. Nota-se também, a presença marcadamente nuclear de NRF2 nas amostras positivas (Figura 13A), o que indica estabilização da proteína e translocação nuclear típicas do seu mecanismo conhecido de ativação. Para TXNRD1, o perfil é mais citoplasmático (Figura 13B), e para PDL1 o perfil de marcação é membranar, como esperado (Figura 13C).

Em relação a expressão do biomarcador para imunoterapia em CPCNP, observou-se que 47,7% (41/86) foram negativos para PDL1 (CPS <1%), enquanto a positividade de expressão do biomarcador (CPS 1 a 100%) se deu em 52,3% (45/86) das amostras. Dentre os resultados positivos, 22/86 amostras (25,6%) demonstraram baixa expressão (CPS 1-10%), 17/86 casos (19,8%) apresentaram alta expressão (CPS 11-49%), e apenas 6/86 amostras (7,0%) obtiveram escore de expressão muito alta de PDL1 (CPS ≥50%). O padrão de marcação associado a estes escores estão apresentados na Figura 13C.

Quando divididos em subtipos histológicos, pudemos observar que 48,4% (30/62) dos Adenocarcinomas eram negativos para expressão de PDL1, 25,8% (16/62) dos casos demonstraram baixa expressão, 21,0% (13/62) dos pacientes tinham alta expressão do biomarcador, enquanto apenas 4,8% (3/62) obtiveram escore ≥50% (Tabela 2). Já no subtipo Escamoso, 45,8% (11/24) das amostras não apresentaram positividade de expressão, 25,0% (6/24) foram classificadas com baixa expressão de PDL1, 16,7% (4/24) indicaram expressão alta, seguidas de

12.5% (3/24) com expressão de PDL1 $\geq 50\%$ (Tabela 2). Pelo teste de Chi-quadrado, não observamos nenhuma associação entre os escores para PDL1 e o subtipo histológico de CPCNP (Tabela 2). Note que as amostras dos CPS 11-49% e $\geq 50\%$ foram agrupadas para atender a um requisito estatístico do teste Chi-quadrado: número esperado de eventos maior que 5 em cada grupo comparado.

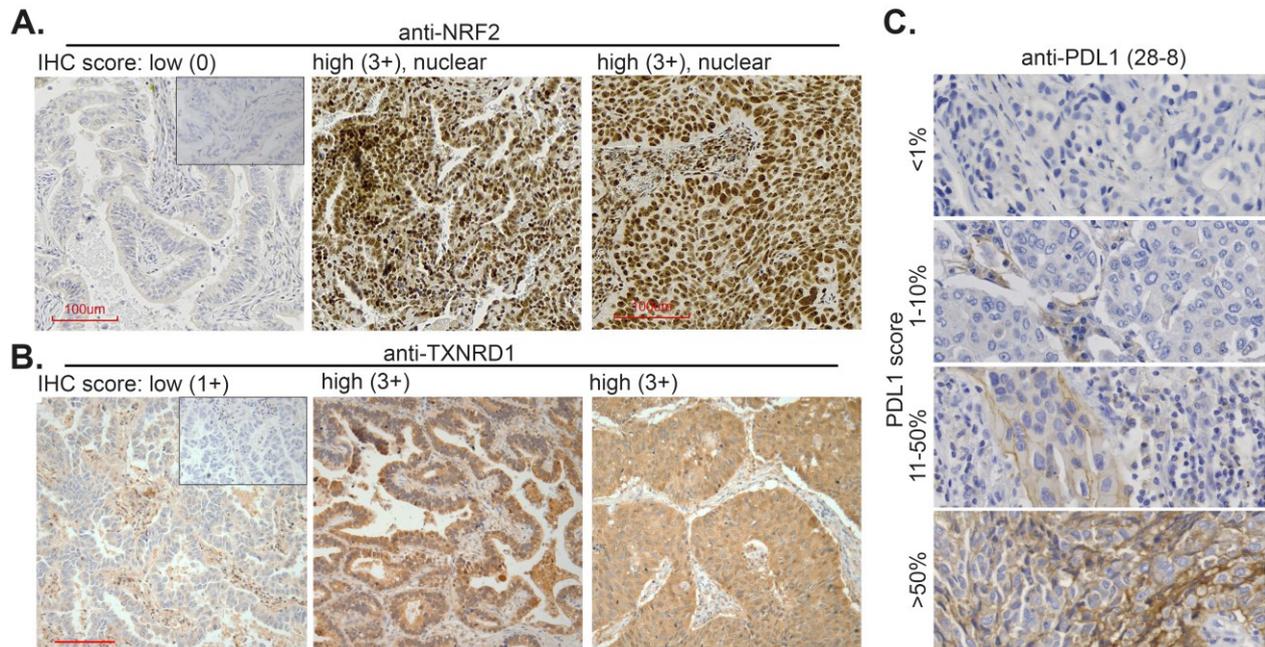


Figura 13 – Imuno-histoquímicas representativas para imunoconteúdo de NRF2, PDL1 e TXNRD1 em CPCNP. IHQ representativas em amostras de CPCNP pra (A) NRF2; (B) TXNRD1 e (C) PDL1. Os “insertos” nas primeiras imagens de (A) e (B) se referem aos controles negativos da IHQ para NRF2 e TXNRD1, respectivamente. As segundas imagens apresentam uma amostra de Adenocarcinoma, e as terceiras apresentam uma amostra de Carcinoma Escamoso, ambos com alta positividade de marcação (objetiva de 10X). Em (C) as imagens mostram os diferentes CPS, e seus respectivos perfis de marcação (objetiva de 40X). Fonte: Elaborada pela autora (2022)

As mesmas amostras foram submetidas à IHQ para TXNRD1. Observou-se que 70,9% (61/86) amostras possuíam baixo imunoconteúdo de TXNRD1, enquanto 29,1% (25/86) dos casos apresentaram conteúdo proteico alto da proteína redox. Quando observadas em relação ao subtipo histológico, obtivemos 74,2% (46/62) de amostras com baixa e 25,8% (16/62) com alta expressão de TXNRD1 em Adenocarcinoma, e 62,5% (15/24) com baixa e 37,5% (9/24) com alta expressão de TXNRD1 em Carcinoma de Células Escamosas. Não houve associação significativa entre os escores de TXNRD1 e o subtipo histológico de CPCNP, de acordo com o teste de Fisher (Tabela 2).

	Adenocarcinoma (n=62)	Carcinoma de Células Escamosas (n=24)
PDL1 <1	30 (48,4%)	11 (45,8%)
PDL1 1-10	16 (25,8%)	6 (25,0%)
PDL1 11-49	13 (21,0%)	4 (16,7%)
PDL1 ≥50	3 (4,8%)	3 (12,5%)
TXNRD1 baixa	46 (74,2%)	15 (62,5%)
TXNRD1 alta	16 (25,8%)	9 (37,5%)

Tabela 2 – Expressão de PDL1 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em diferentes subtipos histológicos de CPCNP. Porcentagem de pacientes com diferentes escores de expressão de PDL1 e TXNRD1 em relação aos subtipos histológicos de CPCNP. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Quando correlacionamos as amostras com baixo escore de IHQ para TXNRD1 (n=61) com os níveis de CPS para PDL1, observamos que 45,9% (28/61) delas eram negativas para o biomarcador, 21,3% (13/61) também tinham baixa expressão de PDL1, 26,2% (16/61) tinham alta expressão seguidas de 6,6% (4/61) com alta expressão. Já nas amostras com alta expressão de TXNRD1 (n=25) foi possível identificar 52,0% (13/25) de casos negativos para expressão do ligante de morte programada, 36,0% (9/25) com baixa expressão, 4,0% (1/25) com alta expressão, e 8% (2/25) com escore de PDL1 ≥50% em IHQ. A análise estatística de Chi-quadrado não indicou relação significativa entre os escores de PDL1 com TXNRD1 por IHQ nos pacientes com CPCNP (Tabela 3).

	TXNRD1 baixa (n=61)	TXNRD1 alta (n=25)
PDL1 <1	28 (45,9%)	13 (52,0%)
PDL1 1-10	13 (21,3%)	9 (36,0%)
PDL1 11-49	16 (26,2%)	1 (4,0%)
PDL1 ≥50	4 (6,6%)	2 (8,0%)

Tabela 3 – Expressão de PDL1 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em uma coorte de 86 pacientes. Porcentagem de pacientes com diferentes escores de expressão de PDL1 em relação aos pacientes com alta e baixa expressão de TXNRD1. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Das amostras de CPCNP, aproximadamente 50% (42/86) foram submetidas à IHQ para NRF2. O critério de escolha foi a quantidade de material remanescente nos blocos de parafina, e uma diferença significativa nos escores de TXNRD1. Destas, obtivemos 20 (47,6%) com escores altos, e 22 (52,4%) com escores baixos de TXNRD1 na IHQ. Na análise de NRF2 por IHQ, 57,1% (24/42) dos tumores apresentaram baixo conteúdo de NRF2, e 42,9% (18/42) dos casos obtiveram escore de alta expressão. Em relação aos subtipos histológicos obtivemos 30 casos

de Adenocarcinoma sendo 60,0% (18/30) deles com baixa e 40,0% (12/30) com alto conteúdo proteico de NRF2 (Tabela 4). Nos Carcinomas de Células Escamosas, das 12 amostras, 50% (6/12) apresentaram níveis altos ou baixos de NRF2 em IHQ (Tabela 4). No teste de Fisher, não foi observada uma associação significativa entre alta ou baixa expressão de NRF2 e os subtipos de câncer de pulmão.

	Adenocarcinoma (n=30)	Carcinoma de Células Escamosas (n=12)
NRF2 baixa	18 (60,0%)	6 (50,0%)
NRF2 alta	12 (40,0%)	6 (50,0%)

Tabela 4 – Expressão de NRF2 por imuno-histoquímica em diferentes subtipos histológicos de CPCNP. Porcentagem de pacientes com diferentes escores de expressão de NRF2 em relação aos subtipos histológicos de CPCNP. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Das amostras submetidas à IHQ para NRF2, observamos que 50% (21/42) eram negativas para expressão do biomarcador, 26,2% (11/42) tinham baixa expressão (CPS 1-10%), 9,5 % (4/42) e 14,2% (6/42) tinham alta e muito alta expressão de PDL1, respectivamente. Nas amostras com baixa marcação de NRF2, 12,5% (3/24) tinham alta expressão, e 20,8 % (5/24) apresentaram escore muito alto de PDL1, 11/24 (45,8%) foram negativas para a expressão do biomarcador e apenas 5/24 (20,8%) também apresentaram baixa expressão. Por outro lado, das amostras com alto NRF2, 55,6% (10/18) foram negativas para o biomarcador, 33,3% (6/18) obtiveram escore de baixa expressão, e somente 5,6% (1/18) e 5,6% (1/18) apresentaram escores de PDL1 alto e muito alto, respectivamente (Tabela 5). Novamente, não foi observada diferença estatística significativa de associação entre PDL1 e NRF2 em IHQ no teste de Chi-quadrado.

	NRF2 baixa (n=24)	NRF2 alta (n=18)
PDL1 <1	11 (45,8%)	10 (55,6%)
PDL1 1-10	5 (20,8%)	6 (33,3%)
PDL1 11-49	3 (12,5%)	1 (5,55%)
PDL1 ≥50	5 (20,8%)	1 (5,55%)

Tabela 5 – Expressão de NRF2 e PDL1 por imuno-histoquímica em uma sub-coorte de 42 amostras de CPCNP. Porcentagem de pacientes com diferentes escores de expressão de PDL1 em relação aos pacientes com alta e baixa expressão de NRF2. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Como controle da relação entre NRF2 e seu alvo TXNRD1, ao correlacionar os escores de expressão de TXNRD1 com NRF2, observamos uma associação

bastante significativa ($p < 0,0001$) no teste de Fisher, onde 95,5% das amostras com baixa expressão de TXNRD1 também obtiveram baixo escore de NRF2, e 85,0% dos casos com alto escore de TXNRD1 também indicavam alto escore de NRF2 por IHQ (Tabela 6).

	TXNRD1 baixa (n=22)	TXNRD1 alta (n=20)
NRF2 baixa	21 (95,5%)	3 (15,0%)
NRF2 alta	1 (4,5%)	17 (85,0%)

Tabela 6 – Expressão de NRF2 e TXNRD1 por imuno-histoquímica em uma sub-coorte de 42 amostras de CPCNP. Porcentagem de pacientes com diferentes escores de expressão de NRF2 em relação aos pacientes com alta e baixa expressão de TXNRD1. Fonte: Elaborada pela autora (2022)

4.3 A EXPRESSÃO DE PDL1 NÃO É REGULADA PELA VIA KEAP1/NRF2

Para investigar a suposta regulação de PDL1 pela via KEAP1/NRF2, utilizamos a linhagem celular A549 de CPCNP com mutação conhecida em KEAP1, essa linhagem apresenta NRF2 constitutivamente ativo. A partir de RT-qPCR determinamos a expressão de mRNA de *CD274* (PDL1) e três genes alvos regulados por NRF2, *TXNRD1*, *SLC7A11* e *GCLM* em dois diferentes cenários, com hiperativação de NRF2 (A549 selvagem) e com depleção de NRF2 com *knockdown* por siRNA (Figura 14). Como esperado, o grupo *knockdown NFE2L2* apresentou uma diminuição significativa da expressão de mRNA dos genes *TXNRD1*, *SLC7A11* e *GCLM* ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (siNeg) (Figura 14A-C). Já a expressão de mRNA de PDL1 não apresentou alteração significativa entre os dois grupos (Figura 14D). Também, realizamos a inibição farmacológica de NRF2 com o inibidor ML385 15 μ M e analisamos por RT-qPCR a expressão de PDL1, contudo, novamente não observamos alteração na expressão entre os grupos silenciado e controle (Figura 14E).

Esses resultados indicam que mutações de hiperativação, ou depleção na via KEAP1/NRF2, não são capazes de alterar a expressão de PDL1, tanto a nível de transcrito, quanto a nível de proteína, sugerindo que não há regulação direta do biomarcador por essa via.

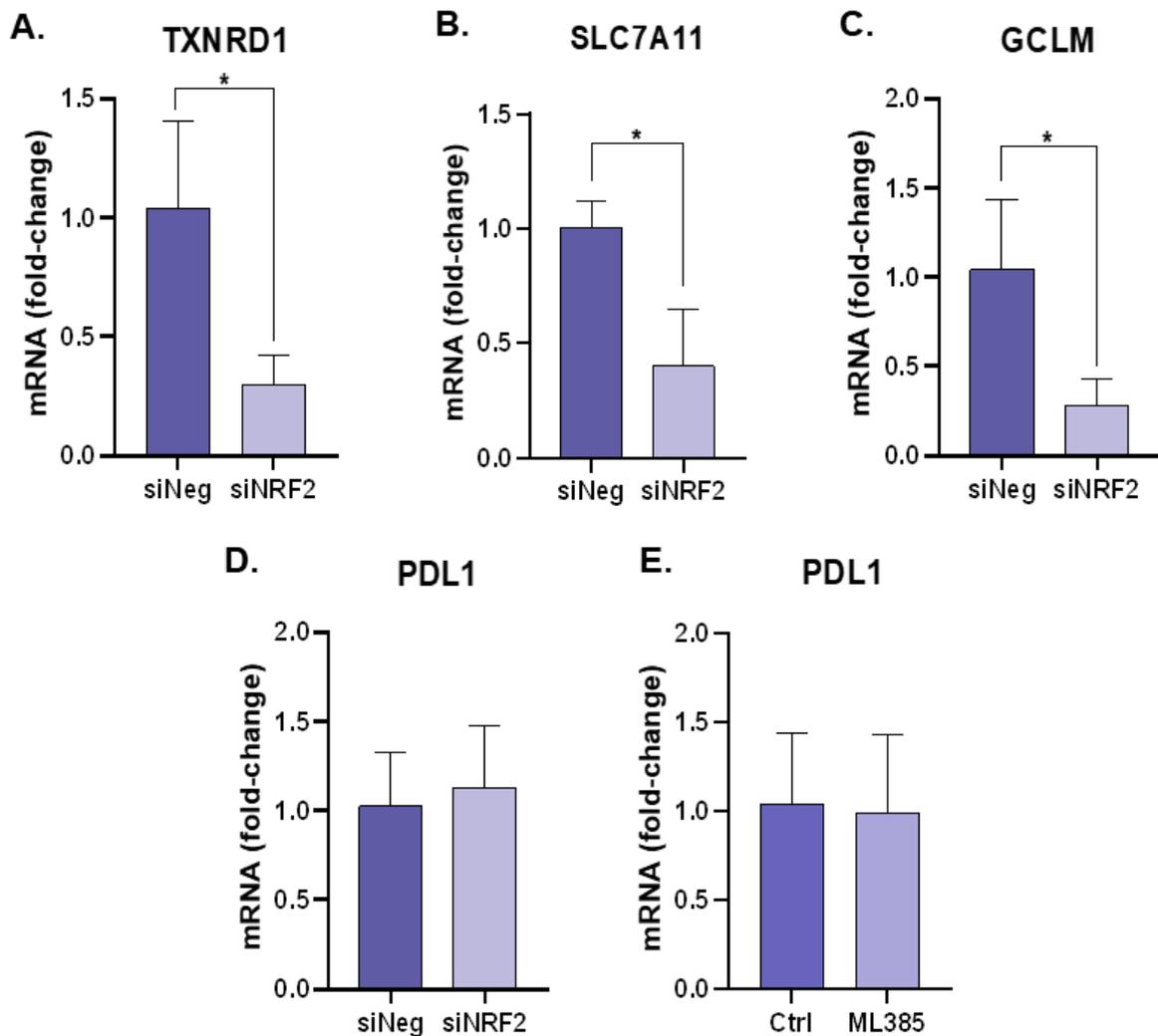


Figura 14 – Expressão de PDL1 não é regulada pela via KEAP1/NRF2. RT-qPCR da linhagem celular de câncer de pulmão A549 silenciada para NRF2 (*NFE2L2*) versus controle negativo (A) Expressão relativa de mRNA de TXNRD1 (B) Expressão relativa de mRNA de SLC7A11 (C) Expressão relativa de mRNA de GCLM (D) Expressão relativa de mRNA de PDL1 (E) RT-qPCR da linhagem celular de câncer de pulmão A549 com inibição farmacológica de NRF2 por ML385 versus controle negativo para expressão de mRNA de PDL1 (Teste t não pareado; bicaudal; $p < 0,05$). Fonte: Elaborada pela autora (2022)

4.4 NRF2 INTERFERE NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE CPCNP

Através de ensaio clonogênico com linhagem celular A549 tratadas com o inibidor de NRF2 ML385 e grupo controle, pudemos observar que a inibição de NRF2 afetou significativamente a formação de colônias a longo prazo, com uma diminuição significativa do número de colônias ao fim dos 12 dias ($p < 0,05$) em

comparação com o grupo controle (Figura 15). Esses resultados demonstram que NRF2, embora não associado a regulação da expressão do gene codificante para PDL1, se mostra uma via importante na proliferação das células tumorais pulmonares mutantes em KEAP1.

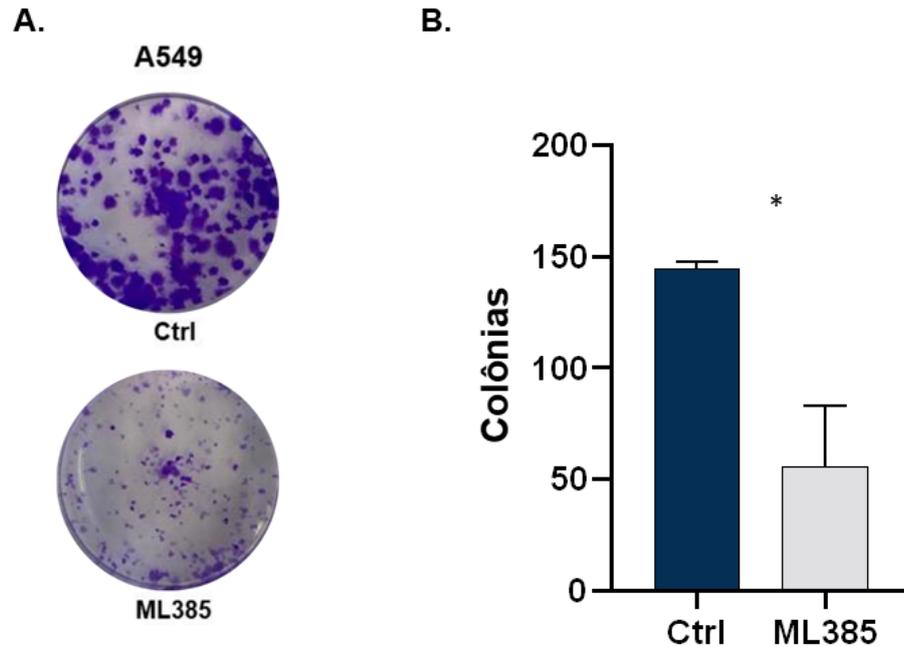


Figura 15 – Inibição de NRF2 afeta a proliferação celular em CPCNP. Formação de colônias em ensaio clonogênico com linhagem celular A549 tratadas com inibidor farmacológico de NRF2 *versus* controle negativo. **(A)** Imagem representativa da formação de colônias em poço controle e poço tratado com ML385 15 μ M **(B)** Quantificação total de colônias após tratamento com ML385 15 μ M em comparação ao controle. (Teste t não pareado; bicaudal; $p < 0,05$). Fonte: Elaborada pela autora (2022)

5 DISCUSSÃO

O Câncer de Pulmão está entre as principais causas de morte por câncer, e se mostra uma doença de difícil tratamento, principalmente devido à grande resistência aos quimioterápicos e diagnóstico tardio. Neste contexto, muito tem sido investido em alternativas de tratamento farmacológico e busca de biomarcadores diagnósticos e preditivos de resposta para esse tipo tumoral. Por se tratar de um tumor heterogêneo em nível histológico e molecular, a análise das alterações genéticas desse tipo de tumor tem sido de grande valia na busca de alternativas terapêuticas e diagnósticas precisas para a malignidade. Diversos “*drivers*” oncogênicos e proteínas de evasão imune foram estabelecidos como alvos farmacológicos na clínica como EGFR, ALK, KRAS e PDL1 (REMON *et al.*, 2021; RUIZ-CORDERO; DEVINE, 2020; SKOULIDIS *et al.*, 2021; YONEDA *et al.*, 2019). Destacando-se o último, por se tratar de um biomarcador preditivo de resposta terapêutica positiva à imunoterapia, uma alternativa de tratamento para diferentes tipos de tumores que se mostrou promissora, considerada pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) o maior avanço recente no tratamento de câncer. A imunoterapia destaca-se ainda, principalmente em Câncer de Pulmão, com o uso de anticorpos monoclonais anti-PDL1 e/ou anti-PD1 reestabelecendo a resposta imune antitumoral (ALEXANDER; KIM; CHENG, 2020).

Imunoterapias anti-PD1 e anti-PDL1 começaram a ser aprovadas pela FDA para CPCNP a partir de 2015, e desde então se destacaram em um cenário que há décadas tinha como padrão de tratamento apenas a quimioterapia, mesmo com todas as suas limitações, sem inovações nas primeiras linhas de tratamento. Em 2017 a imunoterapia com Pembrolizumabe foi aprovada em primeira linha de tratamento para câncer de pulmão pela ANVISA, combinada a compostos de platina ou como monoterapia (GANDHI *et al.*, 2018). Outros medicamentos com o mesmo objetivo foram sendo aprovados para diferentes estágios, como o Atezolizumabe, a primeira imunoterapia aprovada em 2021 para pacientes com câncer de pulmão inicial e no tratamento adjuvante de CPCNP (FELIP *et al.*, 2021) e Cemiplimabe aprovado pela ANVISA para o tratamento do câncer de pulmão avançado em 2022 (SEZER *et al.*, 2021). Além do câncer de pulmão, muitos outros tipos tumorais como por exemplo o melanoma, carcinoma renal e câncer de mama também se beneficiam de imunoterapia anti-PD1/anti-PDL1. Contudo, os mecanismos que

levam a expressão desse biomarcador nas células tumorais ainda são pouco explicados, assim como a resistência de um subgrupo de pacientes a esse tratamento. Por isso, muito tem sido investido na busca da compreensão dos mecanismos celulares que levam a expressão membranar de PDL1 na célula tumoral resultando na evasão imunológica, com o objetivo de restaurar a sensibilidade desses pacientes à imunoterapia.

Aproximadamente um quarto dos pacientes com CPCNP apresentam mutações na via KEAP1/NRF2, demonstrando ser uma via de relevância singular tanto em Adenocarcinoma quanto em Carcinoma de Células Escamosas, sendo que mutações em KEAP1 estão mais presentes em Adenocarcinoma e mutações em NRF2 estão presentes com maior frequência em Carcinoma de Células Escamosas. Além disso, mutações na via KEAP1/NRF2 são fortemente associadas à resistência a quimioterapia, por se tratar de uma via redox, as células mutadas acabam resistindo ao estresse oxidativo gerado pelos quimioterápicos, e mutações KEAP1/NRF2 são reconhecidamente associadas a um mau prognóstico para pacientes com CPCNP, tornando ainda mais importante a investigação dessa via no contexto do câncer (DEMPKE; RECK, 2021; HAMMERMAN *et al.*, 2012; KRALL *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016).

No presente estudo, buscamos avaliar a correlação da expressão de PDL1 com a expressão de NRF2 e seus genes alvos, tal como se há uma regulação da expressão de PDL1 pela via KEAP1/NRF2, na busca de elucidar os mecanismos de expressão do biomarcador nas células tumorais de câncer de pulmão e compreender se existe de fato um mecanismo dependente de NRF2 na regulação da expressão da proteína imunológica.

Nossos achados contanto, sugerem não haver correlação da expressão de PDL1 com assinatura gênica de NRF2, corroborando o trabalho de Singh e colaboradores (2021), no qual a assinatura de ativação de NRF2 não demonstrou associação à coloração de PDL1 em células tumorais e infiltrados imune em duas bases de dados: i) OAK um estudo de fase 3 realizado em 194 centros de oncologia em 31 países (RITTMEYER *et al.*, 2017); ii) *IMpower131* um estudo randomizado de fase 3 com 1.021 pacientes acometidos por CPCNP (JOTTE *et al.*, 2020). Ao realizar uma análise bioinformática, com uma coorte de 1.145 pacientes do TCGA, não observamos no presente estudo correlação da expressão de PDL1 com a expressão de assinatura gênica de NRF2. Esses dados *in silico* foram corroborados por nossos

achados em uma coorte de 86 pacientes com câncer de pulmão, dos quais amostras tumorais foram submetidas à imuno-histoquímica para PDL1, NRF2 e TXNRD1. Nossos dados demonstraram que a marcação imuno-histoquímica de TXNRD1 é fortemente correlacionada com os níveis e translocação nuclear de NRF2 ($p < 0,0001$), tal qual demonstra a literatura prévia, e também apoiado pelos nossos resultados de correlação de Pearson da expressão de TXNRD1 com assinatura de NRF2 na coorte do TCGA. Porém, o imunoconteúdo de PDL1 não se comportou da mesma forma na coorte de pacientes, não apresentando correlação significativa com NRF2 ou TXNRD1. Estes resultados sugerem que a expressão de PDL1 não está correlacionada com a expressão de NRF2 e seus genes alvos.

Já, Zhu e colaboradores (2018) observaram correlação entre o conteúdo proteico de PDL1 e NRF2 por IHQ em amostras de melanoma, onde 18 (100%) das amostras com alta expressão de PDL1 apresentaram expressão de NRF2, mas em apenas 23 (69,7%) das 33 amostras com baixa expressão de PDL1 também apresentaram coloração para o fator de transcrição. Ainda, o grupo de Xu (2020) observou correlação da expressão de PDL1 com mutantes *NFE2L2* em Carcinoma de Células Escamosas e com mutantes *KEAP1* em Adenocarcinoma em uma coorte de 3.457 pacientes chineses. O que se mostra controverso aos nossos resultados e ao trabalho de Bagaev *et al.* (2021) que, demonstrou um enriquecimento de mutação em *KEAP1* em microambiente tumoral (TME) do tipo imunossuprimido, indicando que tumores *KEAP1/NRF2* mutados são frios imunologicamente, ou seja, com diminuição da presença de células imunes, o que além de não indicar aumento da expressão de proteínas imunológicas como PDL1, não prediz resultados positivos com imunoterapia. Dado corroborado pela análise *pan-cancer* de Chen e colaboradores (2020), na qual as alterações em *KEAP1* foram associadas a infiltrados imunológicos substancialmente mais baixos em adenocarcinoma de pulmão. Além destes, Singh e colaboradores (2021) também se mostram controversos aos achados dos grupos de Xu (2020) e Zhu (2018), pois em seu estudo, além de não identificar correlação da proteína imunológica com o fator de transcrição ou mutações na via *KEAP1/NRF2*, demonstram que a expressão de assinatura de células dendríticas foi significativamente reduzida em tumores com pontuação/escores de assinatura NRF2 alta, sugerindo novamente um microambiente imune frio em tumores com alta expressão de NRF2.

Mutações na via KEAP1/NRF2 estão relacionadas à superexpressão de diversas proteínas redox em tecidos tumorais (LEVINGS *et al.*, 2018), como observado nos nossos controles experimentais com assinaturas gênicas de alvos antioxidantes de NRF2, e conteúdo de TXNRD1 nos tumores com alta marcação histológica de NRF2. Xu *et al.* (2020) e Zhu *et al.* (2018) associaram positivamente a expressão de PDL1 com NRF2 em CPCNP e melanoma, respectivamente. Entretanto, ao investigar o possível papel da via KEAP1/NRF2 na regulação da expressão de PDL1 através de linhagem celular com *knockdown* de *NFE2L2*, não encontramos uma expressão de PDL1 dependente de NRF2, pelo menos, em células crescendo em ambiente de cultivo *in vitro*. Usamos a linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549, uma linhagem tradicional em estudos de CPCNP iniciada em 1972 (GIARD *et al.*, 1973) com mutação em KEAP1 e expressão exacerbada de NRF2 nuclear. Nossos resultados indicaram que não existe uma regulação direta da expressão de PDL1 pela via KEAP1/NRF2, dado que a depleção de NRF2 em A549, com siRNA, causou uma diminuição expressiva de mRNA dos genes-alvo de NRF2, como SLC7A11, TXNRD1 e GCLM, confirmando a eficiência do silenciamento, sem afetar a expressão do mRNA de PDL1. Ainda, o inibidor farmacológico de NRF2, ML385, também não alterou a expressão de PDL1 por RT-qPCR na linhagem A549. Isso indica que, tanto a nível farmacológico como gênico, a inibição de NRF2 não altera a expressão de PDL1 em CPCNP.

Corroborando nossos achados *in vitro*, através de análise da coorte de dados do TCGA de tumores com mutações em *KEAP1*, pudemos observar que os tumores KEAP1 mutados tinham alta expressão de TXNRD1, expressivamente maior do que os tumores selvagens, contudo, a expressão de PDL1 não mostrou diferença significativa entre os tumores mutados e não mutados, apoiando que não há envolvimento da via KEAP1/NRF2 na regulação da expressão do biomarcador.

Xu *et al.* (2020) demonstra ainda que, mutações na via KEAP1/NRF2 estão correlacionadas com alta carga mutacional tumoral (TMB) e eficácia de imunoterapia. Um apontamento feito pelo grupo para justificar o benefício na sobrevida dos pacientes mutados submetidos à imunoterapia se dá pela correlação da mutação com TMB, pois TMB é um marcador preditivo de resposta positiva ao tratamento com ICI em CPCNP, contudo Marinelli *et al.* (2020) argumenta com base em seus resultados que mesmo associados à alta TMB, tumores KEAP1 mutados não apresentam resposta à imunoterapia, sugerindo que mutantes KEAP1 são

erroneamente caracterizados como imunoresponsivos devido à alta TMB, porém não demonstram responder como esperado à terapia. Os dados de Zhang *et al.* (2020) apoiam essa linha, demonstrando em uma coorte de 1.661 pacientes com diferentes tipos de câncer que mutações em *KEAP1* estavam significativamente associadas a TMB, todavia ao analisar a resposta dos pacientes *KEAP1/NFE2L2* mutados à imunoterapia, estes possuíam uma sobrevida global inferior aos pacientes não-mutados para a via NRF2.

Chen e colaboradores (2020) demonstram em uma análise *pan-cancer*, que pacientes com tumores mutados para *KEAP1* possuem sobrevida global pós imunoterapia duas vezes menor que os pacientes com tumores selvagens, onde os tumores não mutados apresentaram sobrevida média de 20 meses após tratamento com ICI, enquanto os *KEAP1* mutados apresentaram uma sobrevida média de 10 meses apenas. Ademais, Singh e colaboradores (2021) apresentam dados demonstrando que pacientes com carcinoma de células escamosas de pulmão com baixa assinatura de NRF2 sobrevivem mais ao receber tratamento anti-PDL1, ao passo que pacientes com adenocarcinoma de pulmão com alta expressão da assinatura de ativação de NRF2 (*KEAP1/NRF2* mutados) foram associados a menor sobrevida após imunoterapia. E ainda, um estudo de fase 3 em pacientes com CPCNP em estágio avançado indicou que tumores mutantes *KEAP1* tinham sobrevida média inferior aos tumores não mutados após tratamentos com imunoterápicos (RIZVI *et al.*, 2019).

Estes resultados se contrapõem ao grupo de Xu (2020), que demonstra aumento da sobrevida dos pacientes com mutações *KEAP1/NRF2* submetidos à imunoterapia, porém esse resultado é obtido a partir de uma comparação de pacientes com mutações nessa via submetidos a imunoterapia em relação a pacientes mutados submetidos a outros tratamentos, como a quimioterapia. Todavia, sabe-se que tumores com ativação de NRF2 são quimiorresistentes (JEONG *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2016), sendo assim, possivelmente esse resultado se deve a comparação com um outro tipo de tratamento que possui resposta inferior à imunoterapia, já reconhecido na literatura. De fato, a imunoterapia com ICI se mostra superior à quimioterapia em diversos contextos de estudos clínicos em CPCNP. Para minimizar vieses de interpretação, o desenho de estudo ideal, neste caso, seria a comparação dos pacientes mutados e não mutados em *KEAP1/NFE2L2* submetidos à imunoterapia. Scalera e colaboradores (2021) demonstraram que

pacientes *KEAP1* mutados tiveram uma sobrevida mais curta após imunoterapia, já a comutação *KEAP1* e *TP53* apresentou um prognóstico intermediário, enquanto a sobrevida mais longa foi observada nos pacientes com ambos os genes no tipo-selvagem. Também, Best e colaboradores (2018) demonstraram resposta ao tratamento com ICI apenas em modelo de camundongos comutados em *KEAP1* e *PTEN*, o que levanta a importância de analisar se os resultados positivos de imunoterapia em mutantes *KEAP1* não poderiam estar associados a outras mutações que ocorrem concomitantemente à *KEAP1/NRF2*, não devendo-se de fato a alterações nessa via por si só.

Ainda, Krall e colaboradores (2017) demonstram que a perda de *KEAP1* resulta em resistência a quimioterápicos e terapias direcionadas com inibidores de *RTK/MAPK*, indicando a importância da consideração do *status* mutacional de *KEAP1/NRF2* no câncer de pulmão para tomada de decisões terapêuticas. Isso também sugere a necessidade de estudos direcionados a essa via, na busca de inibidores de *NRF2* clinicamente eficazes, e combinações destes com os demais tratamentos em uso, tendo como objetivo a reativação da sensibilidade aos tratamentos já existentes e um prognóstico melhor para os pacientes de CPCNP. Apesar da descoberta de diferentes moléculas que demonstram eficácia na inibição de *NRF2*, como o ML385, descrito em 2016 (SINGH *et al.*, 2016), estas ainda não se encontram em estudos na clínica. Embora nosso estudo sugira que provavelmente a via *NRF2* não dita a expressão de *PDL1*, a inibição de *NRF2* com ML385 em linhagem celular A549 diminui a capacidade de formação de colônias a longo prazo, colocando a inibição do *NRF2* em cena como possível mecanismo terapêutico contra CPCNP com mutações na via.

Está claro, que apesar de não regular a expressão de *PDL1*, *NRF2* está no epicentro de uma rede regulatória complexa de um subtipo molecular de CPCNP, e sua inibição como terapêutica no câncer, embora promissora, precisa ser cuidadosamente estudada devido ao papel paradoxal que essa proteína exerce no contexto do câncer.

6 CONCLUSÃO

Nós analisamos uma coorte de dados de 1.145 pacientes e 86 amostras tumorais de CPCNP, e a partir dos nossos resultados foi possível observar que a expressão de PDL1 não se mostra correlacionada com a expressão de assinatura gênica de NRF2 ou mutações em *NFE2L2/KEAP1*. Assim como não foi identificada regulação direta da expressão de PDL1 pela via KEAP1/NRF2 em células tumorais de adenocarcinoma de pulmão. Apesar das discordâncias de trabalhos anteriores, a partir dos dados obtidos no presente estudo, e após extensa revisão da literatura disponível, nosso estudo corrobora que tumores pulmonares com mutações na via KEAP1/NRF2 não apresentam expressão alterada de PDL1 em relação aos outros subtipos tumorais de CPCNP e, assim, mutações em KEAP1/NRF2 não devem predizer escolha ou definir um melhor prognóstico na terapia com ICI. Portanto, a análise de PDL1 e outros marcadores imunes, assim como variáveis de instabilidade genômica, permanecem como melhores preditores de resposta e seleção de pacientes para terapia com ICI. Porém, ainda assim, a via KEAP1/NRF2 se mostra como importante potencial alvo terapêutico no câncer de pulmão, no qual precisa ser cuidadosamente estudada para desenvolvimento de inibidores seguros, buscando alternativas de tratamento para esse grupo de pacientes que se mostram desafiadores.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.; KIM, S. Y.; CHENG, H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. **Lung**, v. 198, n. 6, p. 897–907, 11 dez. 2020.
- BADER, S. *et al.* Activation of anti-oxidant Keap1/Nrf2 pathway modulates efficacy of dihydroartemisinin-based monotherapy and combinatory therapy with ionizing radiation. **Free radical biology & medicine**, v. 168, p. 44–54, 20 maio 2021.
- BAGAEV, A. *et al.* Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy. **Cancer Cell**, v. 39, n. 6, p. 845- 865.e7, jun. 2021.
- BARTA, J. A.; POWELL, C. A.; WISNIVESKY, J. P. Global Epidemiology of Lung Cancer. **Annals of Global Health**, v. 85, n. 1, 22 jan. 2019.
- BASU, A. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 970, 23 mar. 2018.
- BEST, S. A. *et al.* Synergy between the KEAP1/NRF2 and PI3K Pathways Drives Non-Small-Cell Lung Cancer with an Altered Immune Microenvironment. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 935- 943.e4, 3 abr. 2018.
- BRAHMER, J. R. *et al.* Safety and Activity of Anti–PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2455–2465, 28 jun. 2012.
- CHA, J. H. *et al.* Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. **Molecular Cell**, v. 76, n. 3, p. 359–370, 7 nov. 2019.
- CHABNER, B. A.; LONGO D. L. **Manual de Oncologia de Harrison**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2015.
- CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, jul. 2013.
- CHEN, X. *et al.* Pan-cancer analysis of KEAP1 mutations as biomarkers for immunotherapy outcomes. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 4, p. 141–141, fev. 2020.
- COLAPRICO, A. *et al.* TCGAblinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 8, p. e71–e71, 5 maio 2016.
- CORTINOVIS, D. L. *et al.* Focus on nivolumab in NSCLC. **Frontiers in Medicine**, v. 3, n. DEC, p. 67, 2016.
- DE RUITER, E. J. *et al.* Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Modern Pathology** 2020 34:6, v. 34, n. 6, p. 1125–1132, 5 ago. 2020.

DEBLASI, J. M.; DENICOLA, G. M. Dissecting the Crosstalk between NRF2 Signaling and Metabolic Processes in Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 3023, 17 out. 2020.

DELGOBO, M. *et al.* Thioredoxin reductase-1 levels are associated with NRF2 pathway activation and tumor recurrence in non-small cell lung cancer. **Free radical biology & medicine**, v. 177, p. 58–71, 1 dez. 2021.

DEMPKE, W. C. M.; RECK, M. KEAP1/NRF2 (NFE2L2) mutations in NSCLC – Fuel for a superresistant phenotype? **Lung Cancer**, v. 159, p. 10–17, set. 2021.

DETTERBECK, F. C. *et al.* The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. **Chest**, v. 151, n. 1, p. 193–203, jan. 2017.

DIGGS, L. P.; HSUEH, E. C. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. **Biomarker Research**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 15 mar. 2017.

DUMA, N.; SANTANA-DAVILA, R.; MOLINA, J. R. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 8, p. 1623–1640, ago. 2019.

FELIP, E. *et al.* Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 398, n. 10308, p. 1344–1357, out. 2021.

GANDHI, L. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 22, p. 2078–2092, 31 maio 2018.

GIARD, D. J. *et al.* In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors². **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1417–1423, nov. 1973.

GRIESINGER F. *et al.* Efficacy and safety of first-line carboplatin-versus cisplatin-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. **Lung Cancer**, v. 135, p. 196–204, set. 2019.

GUO, H. *et al.* Comparison of three scoring methods using the FDA-approved 22C3 immunohistochemistry assay to evaluate PD-L1 expression in breast cancer and their association with clinicopathologic factors. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 69, 23 dez. 2020.

HAMMERMAN, P. S. *et al.* Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. **Nature** **2012 489:7417**, v. 489, n. 7417, p. 519–525, 9 set. 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HE, F.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 4, p. 405, 17 jun. 2020.

HELLMANN, M. D. *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 21, p. 2020–2031, 21 nov. 2019.

HELLYER, J. A. *et al.* Clinical Implications of KEAP1-NFE2L2 Mutations in NSCLC. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 16, n. 3, p. 395–403, 1 mar. 2021.

HERBST, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1540–1550, 9 abr. 2016.

HOADLEY, K. A. *et al.* Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 291–304.e6, abr. 2018.

HUNG, R. J. *et al.* A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 633–637, abr. 2008.

HUTCHINSON, B. D. *et al.* Spectrum of Lung Adenocarcinoma. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 40, n. 3, p. 255–264, jun. 2019.

HWANG, J. K. *et al.* Validation of the Eighth Edition TNM Lung Cancer Staging System. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 4, p. 649–654, abr. 2020.

ILIE, M. *et al.* Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Biological Principles and Future Opportunities. **Current Molecular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 527–540, 15 mar. 2018.

IMYANITOV, E. N.; IYEVLEVA, A. G.; LEVCHENKO, E. N. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 157, 1 jan. 2021.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em: 28 nov. 2022.

ISHIDA, Y. *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, nov. 1992.

JEONG, Y. *et al.* Role of KEAP1/NFE2L2 mutations in the chemotherapeutic response of patients with non–small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 1, p. 274–281, 1 jan. 2020.

JOTTE, R. *et al.* Atezolizumab in Combination with Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results from a Randomized Phase III Trial. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 8, p. 1351–1360, ago. 2020.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 17 nov. 2004.

KORNEPATI, A. V. R.; VADLAMUDI, R. K.; CURIEL, T. J. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 3, p. 174–189, 14 mar. 2022.

KRALL, E. B. *et al.* KEAP1 loss modulates sensitivity to kinase targeted therapy in lung cancer. **eLife**, v. 6, 1 fev. 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins – Patologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013.

LEVINGS, D. C. *et al.* A distinct class of antioxidant response elements is consistently activated in tumors with NRF2 mutations. **Redox Biology**, v. 19, p. 235–249, out. 2018.

LIU, S.; PI, J.; ZHANG, Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. **Redox Biology**, v. 54, p. 102389, 1 ago. 2022.

MARINELLI, D. *et al.* KEAP1-driven co-mutations in lung adenocarcinoma unresponsive to immunotherapy despite high tumor mutational burden. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 12, p. 1746–1754, 1 dez. 2020.

MENEGON, S.; COLUMBANO, A.; GIORDANO, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 7, p. 578–593, 1 jul. 2016.

MOK, T. S. K. *et al.* Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 393, n. 10183, p. 1819–1830, maio 2019.

NOORELDEEN, R.; BACH, H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8661, 12 ago. 2021.

NOVIKOV, N. M. *et al.* Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 1, p. 102–114, 5 jan. 2021.

OHAEBULAM, K. C. *et al.* Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 24–33, 1 jan. 2015.

OTSUKI, A.; YAMAMOTO, M. Cis-element architecture of Nrf2-sMaf heterodimer binding sites and its relation to diseases. **Archives of Pharmacological Research**, v. 43, n. 3, p. 275–285, 1 mar. 2020.

LOUDKERK, M. *et al.* Lung cancer LDCT screening and mortality reduction — evidence, pitfalls and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 135–151, 12 mar. 2021.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252–264, 22 abr. 2012.

PLAFKER, K. S. *et al.* The ubiquitin-conjugating enzyme UbcM2 can regulate the stability and activity of the antioxidant transcription factor Nrf2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 23064–23074, 23 jul. 2010.

PLANCHARD, D. *et al.* Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. **The Lancet. Oncology**, v. 18, n. 10, p. 1307–1316, 1 out. 2017.

RECK, M. *et al.* Updated analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 7, p. 537–546, 2019.

REMON, J. *et al.* Current treatment and future challenges in ROS1- and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 95, 1 abr. 2021.

RITTMAYER, A. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 255–265, jan. 2017.

RIZVI, N. *et al.* OA04.07 Mutations Associated with Sensitivity or Resistance to Immunotherapy in mNSCLC: Analysis from the MYSTIC Trial. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 14, n. 10, p. S217, out. 2019.

ROBERTSON, H. *et al.* NRF2 and the Ambiguous Consequences of Its Activation during Initiation and the Subsequent Stages of Tumourigenesis. **Cancers 2020, Vol. 12, Page 3609**, v. 12, n. 12, p. 3609, 2 dez. 2020.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010.

RUIZ-CORDERO, R.; DEVINE, W. P. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. **Surgical Pathology Clinics**, v. 13, n. 1, p. 17–33, mar. 2020.

SAHA, T. *et al.* Invasion and Metastasis as a Central Hallmark of Breast Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 16, p. 3498, 8 ago. 2021.

SÁNCHEZ-ORTEGA, M.; CARRERA, A. C.; GARRIDO, A. Role of NRF2 in Lung Cancer. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1879, 24 jul. 2021.

SCALERA, S. *et al.* KEAP1 and TP53 Frame Genomic, Evolutionary, and Immunologic Subtypes of Lung Adenocarcinoma With Different Sensitivity to Immunotherapy. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 16, n. 12, p. 2065–2077, 1 dez. 2021.

SCHABATH, M. B.; COTE, M. L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 28, n. 10, p. 1563–1579, 1 out. 2019.

SEZER, A. *et al.* Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. **The Lancet**, v. 397, n. 10274, p. 592–604, fev. 2021.

SINGH, A. *et al.* Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 11, p. 3214–3225, 18 nov. 2016.

SINGH, A. *et al.* NRF2 Activation Promotes Aggressive Lung Cancer and Associates with Poor Clinical Outcomes. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 3, p. 877–888, 1 fev. 2021.

SKOULIDIS, F. *et al.* Overall survival and exploratory subgroup analyses from the phase 2 CodeBreak 100 trial evaluating sotorasib in pretreated *KRAS* p.G12C mutated non-small cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 15_suppl, p. 9003–9003, 20 maio 2021.

SUHAIL, Y. *et al.* Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, v. 9, n. 2, p. 109–127, ago. 2019.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 434–452, mar. 2018.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TANOUE, L. T. Lung Cancer Staging. **Clinics in Chest Medicine**, v. 41, n. 2, p. 161–174, jun. 2020.

TIAN, Y. *et al.* Modification of platinum sensitivity by KEAP1/NRF2 signals in non-small cell lung cancer. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 6 set. 2016.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727, 12 dez. 2018.

TRAVIS, W. D. *et al.* Pathologic Diagnosis of Advanced Lung Cancer Based on Small Biopsies and Cytology: A Paradigm Shift. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 4, p. 411–414, abr. 2010.

TRAVIS, W. D.; BRAMBILLA, E.; RIELY, G. J. New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 8, p. 992–1001, 10 mar. 2013.

WANG, H. *et al.* RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 3097–3108, 15 maio 2013.

XU, X. *et al.* NFE2L2/KEAP1 Mutations Correlate with Higher Tumor Mutational Burden Value/PD-L1 Expression and Potentiate Improved Clinical Outcome with Immunotherapy. **The Oncologist**, v. 25, n. 6, p. e955, jun. 2020.

YONEDA, K. *et al.* Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with \geq EGFR \geq -mutations. **Journal of UOEH**, v. 41, n. 2, p. 153–163, 1 jun. 2019.

ZHANG, C. *et al.* KEAP1-NFE2L2–Mutant NSCLC and Immune Checkpoint Inhibitors: A Large Database Analysis. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 6, p. e85–e86, jun. 2020.

ZHANG, D. *et al.* A Novel Nrf2 Pathway Inhibitor Sensitizes Keap1-Mutant Lung Cancer Cells to Chemotherapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 20, n. 9, p. 1692–1701, 1 set. 2021.

ZHU, B. *et al.* Targeting the upstream transcriptional activator of PD-L1 as an alternative strategy in melanoma therapy. **Oncogene 2018 37:36**, v. 37, n. 36, p. 4941–4954, 22 maio 2018.

ZHU, Q.-G. *et al.* Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 57680–57692, 22 ago. 2017.

ANEXO A – Artigos em Colaboração

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.020>

Free Radical Biology and Medicine 177 (2021) 58–71



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Thioredoxin reductase-1 levels are associated with NRF2 pathway activation and tumor recurrence in non-small cell lung cancer

Marina Delgobo^a, Rosângela Mayer Gonçalves^{a,8}, Marco Antônio Delazeri^b, Marcelo Falchetti^a, Alessandro Zandoná^b, Raquel Nascimento das Neves^a, Karoline Almeida^a, Adriane Cristina Fagundes^a, Daniel Pens Gelain^c, João Isidro Fracasso^d, Guilherme Baroni de Macêdo^d, Leonardo Priori^d, Nicklas Bassani^e, Alexander James Roy Bishop^{c,†}, Cassiano Mateus Forcelini^b, José Cláudio Fonseca Moreira^{c,1}, Alfeu Zanotto-Filho^{a,1,*}

^a Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil

^b Universidade de Puzos Fundo (UPF), Faculdade de Medicina, Puzos Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-003, Brazil

^d Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), Puzos Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^e Grodby Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

[†] Department of Cell Systems and Anatomy, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

⁸ Laboratório de Biotecnologia Terciária, Diretoria de Metrologia Aplicada em Ciências da Vida, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Lung cancer
NRF2
Thioredoxin reductase
Recurrence
Disease-free survival

ABSTRACT

Activating mutations in the KEAP1/NRF2 pathway characterize a subset of non-small cell lung cancer (NSCLC) associated with chemoresistance and poor prognosis. We herein evaluated the relationship between 64 oxidative stress-related genes and overall survival data from 35 lung cancer datasets. Thioredoxin reductase-1 (TXNRD1) stood out as the most significant predictor of poor outcome. In a cohort of NSCLC patients, high TXNRD1 protein levels correlated with shorter disease-free survival and distal metastasis-free survival post-surgery, including a subset of individuals treated with platinum-based adjuvant chemotherapy. Bioinformatics analysis revealed that NSCLC tumors harboring genetic alterations in the NRF2 pathway (KEAP1, NFE2L2 and CUL3 mutations, and NFE2L2 amplification) overexpress TXNRD1, while no association with EGFR, KRAS, TP53 and FIK3CA mutations was found. In addition, nuclear accumulation of NRF2 overlapped with upregulated TXNRD1 protein in NSCLC tumors. Functional cell assays and gene dependency analysis revealed that NRF2, but not TXNRD1, has a pivotal role in KEAP1 mutant cells' survival. KEAP1 mutants overexpress TXNRD1 and are less susceptible to the cytotoxic effects of the TXNRD1 inhibitor auranofin when compared to wild-type cell lines. Inhibition of NRF2 with siRNA or ML-385, and glutathione depletion with buthionine-sulfoximine, sensitized KEAP1 mutant A549 cells to auranofin. NRF2 knockdown and GSH depletion also augmented cisplatin cytotoxicity in A549 cells, whereas auranofin had no effect. In summary, these findings suggest that TXNRD1 is not a key determinant of malignant phenotypes in KEAP1 mutant cells, although this protein can be a surrogate marker of NRF2 pathway activation, predicting tumor recurrence and possibly other aggressive phenotypes associated with NRF2 hyperactivation in NSCLC.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.106347>

Contents lists available at ScienceDirect

Computers in Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/combiomed

Omics-based identification of an NRF2-related auranofin resistance signature in cancer: Insights into drug repurposing

Marcelo Falchetti^a, Marina Delgobo^a, Helena Zancanaro^a, Karoline Almeida^a,
Raquel Nascimento das Neves^{a,c}, Barbara dos Santos^a, Natália Marcéli Stefanés^b,
Alexander Bishop^{c,d}, Maria Cláudia Santos-Silva^b, Alfeu Zanotto-Filho^{a,*}

^a Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer (LabCancer), Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil

^b Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil

^c Greehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

^d Department of Cell Systems and Anatomy, University of Texas Health at San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Auranofin
Sensitivity
Gene signature
NRF2 pathway
KEAP1 mutation
Pan-cancer

ABSTRACT

Auranofin is a thioredoxin reductase-1 inhibitor originally approved for the treatment of rheumatoid arthritis. Recently, auranofin has been repurposed as an anticancer drug, with pharmacological activity reported in multiple cancer types. In this study, we characterized transcriptional and genetic alterations associated with auranofin response in cancer. By integrating data from an auranofin cytotoxicity screen with transcriptome profiling of lung cancer cell lines, we identified an auranofin resistance signature comprising 29 genes, most of which are classical targets of the transcription factor NRF2, such as genes involved in glutathione metabolism (*GCLC*, *GSR*, *SLC7A11*) and thioredoxin system (*TXN*, *TXNRD1*). Pan-cancer analysis revealed that mutations in NRF2 pathway genes, namely *KEAP1* and *NFE2L2*, are strongly associated with overexpression of the auranofin resistance gene set. By clustering cancer types based on auranofin resistance signature expression, hepatocellular carcinoma, and a subset of non-small cell lung cancer, head-neck squamous cell carcinoma, and esophageal cancer carrying *NFE2L2/KEAP1* mutations were predicted resistant, whereas leukemia, lymphoma, and multiple myeloma were predicted sensitive to auranofin. Cell viability assays in a panel of 20 cancer cell lines confirmed the augmented sensitivity of hematological cancers to auranofin; an effect associated with dependence upon glutathione and decreased expression of NRF2 target genes involved in GSH synthesis and recycling (*GCLC*, *GCLM* and *GSR*) in these cancer types. In summary, the omics-based identification of sensitive/resistant cancers and genetic alterations associated with these phenotypes may guide an appropriate repurposing of auranofin in cancer therapy.