



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Marina Delgobo

Tiorredoxina redutase-1 como possível biomarcador e alvo terapêutico no câncer de pulmão de células não pequenas: uma análise pré-clínica e clínica da ativação da via NRF2 e recorrência tumoral

Florianópolis

2023

Marina Delgobo

Tiorredoxina redutase-1 como possível biomarcador e alvo terapêutico no câncer de pulmão de células não pequenas: uma análise pré-clínica e clínica da ativação da via NRF2 e recorrência tumoral

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho.

Florianópolis

2023

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

Delgobo, Marina

Tiorredoxina redutase-1 como possível biomarcador e alvo terapêutico no câncer de pulmão de células não pequenas: uma análise pré-clínica e clínica da ativação da via NRF2 e recorrência tumoral / Marina Delgobo ; orientador, Alfeu Zanotto-Filho, 2023.

111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Câncer de Pulmão. 3. via NRF2/KEAP1. 4. Tiorredoxina redutase-1. 5. Recorrência tumoral. I. Zanotto-Filho, Alfeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Marina Delgobo

**Tiorredoxina redutase-1 como possível biomarcador e alvo terapêutico no
câncer de pulmão de células não pequenas: uma análise pré-clínica e clínica
da ativação da via NRF2 e recorrência tumoral**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 28 de Abril de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dra. Regina de Sordi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Farina
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dra. Elizandra Braganhol
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

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

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho

Florianópolis, 2023

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Bernadeth e Luiz
e ao meu irmão, Murilo.

AGRADECIMENTOS

Com a proximidade da defesa do meu doutorado, tenho refletido muito sobre essa etapa final e tudo que envolveu essa jornada de seis anos, entre mestrado e doutorado. Confesso que a despedida à Universidade Federal de Santa Catarina, aos colegas de laboratório, à farmacologia e aos Professores está sendo mais difícil do que eu imaginava. Aqui, vivi os melhores e os piores momentos da minha vida, especialmente porque realizar o doutorado durante a pandemia foi um grande desafio. Mesmo assim, aqui em Florianópolis, encontrei minha verdadeira casa e meu lar, conheci meus melhores amigos e me identifiquei quase que por completo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao LabCancer, especialmente aos meus amigos e colegas de laboratório, Rosângela e Jonathan, nós ingressamos juntos no laboratório, bem como, fomos os primeiros alunos do lab! Marcelo, passamos por muitos momentos juntos, e além de um bom amigo, foi essencial para esse trabalho com suas *skills* em bioinformática! Raquel, Karol e Helena, vocês chegaram alguns anos depois mas logo já nos tornamos grandes amigas. Enfim, cada um de vocês foram importantes na minha vida profissional e pessoal. Também agradeço aos meus amigos do PPGFMC, em especial, ao Ericks, Filipe e Marcella. E aos meus amigos de Florianópolis, que fizeram parte dessa jornada incrível.

E, é claro, o LabCancer não seria o mesmo sem o grande fundador deste laboratório, Professor Alfeu! Ele me aceitou no lab no ano de 2017, mesmo sem experiência com pesquisa, me deu alguns puxões de orelha, mas também me deu os melhores conselhos e ensinamentos. Prof. Alfeu, muito obrigada por tudo nesses seis anos. Ser orientada por um cientista como você me fez acreditar na ciência, na minha capacidade e que o nosso trabalho estava no caminho certo. Me fez apaixonar pelo sistema antioxidante e cada descoberta/evolução deste trabalho. Foi desafiador, foi lindo, por muitas vezes achei que eu não conseguiria, mas consegui. Agradeço também aos professores da Farmacologia, em especial, gostaria de agradecer aos Professores Jamil, Pádua e Beth, por todos os conselhos, conversas, risadas e ensinamentos.

Agradeço aos Professores que aceitaram e compuseram a banca da defesa de doutorado. Todos, de certa forma, fizeram parte de etapas do meu doutorado. A Prof. Regina me indicou o Prof. Alfeu, no final de 2016, então eu o conheci graças a ela, ademais, fez parte da minha banca de qualificação de doutorado. O Prof. Farina, me

ajudou nos experimentos de ferroptose, sendo sempre muito prestativo, cedendo-me reagentes e inibidores para os meus experimentos. A Prof. Elizandra, foi avaliadora na minha primeira apresentação como Palestrante Convidada do 54^a Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). Aos membros suplentes, o Prof. Edroaldo sempre foi muito solícito e a Rosângela, me ensinou e me ajudou desde o início da minha carreira científica, participou de muitos experimentos, inclusive, durante o período da pandemia, no meio de todas as dificuldades e limitações que tínhamos.

Gostaria de agradecer à minha amada família, em especial aos meus pais, Bernadeth e Luiz, e ao meu irmão Murilo. Eles sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando meus estudos, me dando força para continuar em cada passo que eu dava e sempre buscando proporcionar o melhor para mim. Murilo, nos aproximamos cada vez mais nesses anos e eu fico muito feliz com isso, obrigada por todos os conselhos valiosos e ajuda nos momentos em que eu mais precisei, bem como, toda troca científica.

Também gostaria de agradecer ao meu namorado Victor, que acompanhou de perto todo o processo de defesa da minha dissertação, publicação do artigo do mestrado e início do doutorado. Ele esteve ao meu lado nos melhores e piores momentos dessa jornada, mas sempre me incentivando, me acolhendo e sendo extremamente carinhoso. Você é, sem dúvida, uma das peças fundamentais desta história, obrigada por tudo.

Por fim, não posso deixar de agradecer às agências de fomento CAPES e CNPq, que foram essenciais para a realização da minha pós-graduação. Agradeço também à UFSC, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, ao LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia), em que realizei muitas das análises deste trabalho. E, agradeço também as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e não foram mencionadas.

Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and, above all, confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something, and that this thing, at whatever cost, must be attained.

(SKŁODOWSKA-CURIE, Marie, 1929)

RESUMO

As mutações de ativação na via KEAP1/NRF2 caracterizam um subconjunto de carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) associado a quimiorresistência e mau prognóstico. Nesta tese, avaliamos a relação entre 64 genes relacionados ao estresse oxidativo e dados de sobrevida global de 35 coortes de câncer de pulmão. Dentre estes, a tiorredoxina redutase-1 (TXNRD1) se destacou como o preditor mais significativo de menor sobrevida global. Em uma coorte hospitalar de 65 pacientes com CPCNP, observou-se que os níveis elevados da proteína TXNRD1 em imunohistoquímica (IHC) se correlacionaram com menores tempos de sobrevida livre de doença e sobrevida livre de metástase distal após a cirurgia, um padrão também foi observado em um subgrupo de indivíduos tratados com quimioterapia adjuvante à base de compostos de platina. Análises de bioinformática revelaram que os tumores CPCNP com alterações genéticas na via NRF2 (mutações em *KEAP1*, *NFE2L2* e *CUL3*, e amplificação *NFE2L2*) superexpressam *TXNRD1*, enquanto nenhuma associação entre a expressão de *TXNRD1* e mutações em *EGFR*, *KRAS*, *TP53* e *PIK3CA* foi encontrada. De fato, por IHC, observou-se que o acúmulo nuclear de NRF2 está associado a altos níveis de TXNRD1 em CPCNP. Ensaios funcionais em linhagens celulares e análise de dependência revelaram que NRF2, mas não TXNRD1, tem um papel central na sobrevivência das células mutantes *KEAP1*. Mutantes *KEAP1* superexpressam *TXNRD1* e são menos suscetíveis aos efeitos citotóxicos do inibidor de TXNRD1 auranofina quando comparados com linhagens celulares não-mutadas em *KEAP1*. A inibição de NRF2 com siRNA ou ML-385, e a depleção de glutathiona (GSH) com butionina-sulfoximina, sensibilizou células A549 de CPCNP (mutantes *KEAP1*) para auranofina. O *knockdown* de NRF2 e a depleção de GSH aumentaram a citotoxicidade da cisplatina em células A549, enquanto a auranofina não teve efeito sobre a toxicidade do quimioterápico *in vitro*. Em resumo, esses achados sugerem que TXNRD1 não é um determinante chave de fenótipos malignos em células mutantes *KEAP1*, embora esta proteína possa ser um marcador indireto da ativação da via de NRF2, prevendo a recorrência do tumor e possivelmente outros fenótipos agressivos associados à hiperativação de NRF2 em CPCNP.

Palavras-chave: Câncer de pulmão; NRF2; tiorredoxina redutase-1; recorrência tumoral; sobrevida livre de doença.

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 *PIK3CA* 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 (GSH) 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.

Keywords: Lung cancer; NRF2; thioredoxin reductase; recurrence; disease-free survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características do Câncer.....	17
Figura 2: Classificação Histológica do Câncer de Pulmão.....	20
Figura 3: Vias de Sinalização – Do Gene <i>TP53</i> aos Receptores de Tirosina Quinases (RTKs).....	22
Figura 4: Mutações Relevantes no Câncer de Pulmão.....	25
Figura 5: Mecanismos de Defesa Antioxidante TXN e GSH	29
Figura 6: Via KEAP1/NRF2 Sob Condições Basais e Condições de Estresse Oxidativo.....	31
Figura 7: Alta Assinatura de NRF2 Confere uma Taxa de Menor Sobrevida em Pacientes com LUAD.....	33
Figura 8: Validação do Protocolo de IHC para Coloração de TXNRD1 em Tecidos de Câncer de Pulmão (FFPE) e Linhagem Celular A549.....	47
Figura 9: <i>Screening</i> de Genes Relacionados ao Estresse Oxidativo Associados a um Prognóstico Ruim em Câncer de Pulmão.....	55
Figura 10: Níveis de Proteína TXNRD1 e <i>Endpoints</i> de Sobrevivência em uma Coorte de CPCNP.....	59
Figura 11: Superexpressão de <i>TXNRD1</i> em Tumores Pulmonares com Mutações Ativadoras da Via NRF2.....	64
Figura 12: Análises IHC de NRF2 Associadas com a Proteína TXNRD1 em Amostras de CPCNP.....	66
Figura 13: Avaliação <i>in vitro</i> do Impacto de TXNRD1 na Sobrevida de Células com Via NRF2 Hiperativa.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicamentos Utilizados como Tratamento de Primeira Escolha no CPCNP.....	35
Tabela 2: Características Clínicas da Nossa Coorte de Pacientes com CPCNP.....	57
Tabela 3: Características Clinicopatológicas de pacientes com CPCNP de acordo com os escores de IHC de TXNRD1 em tumores pulmonares.....	60
Tabela 4: Análise Univariável de Fatores Basais Associados a DFS, DMFS e OS em Pacientes com CPCNP.....	61
Tabela 5: Análise Multivariada de Fatores Basais Associados a DFS, DMFS e OS em Pacientes com CPCNP.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Diferentes Mutações e suas Consequências.....	26
Quadro 2: Agentes Terapêuticos Alvo em Diferentes Vias de Sinalização e Mutações Genéticas em CPCNP.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Serina/Treonina Quinase
ARE – Elemento de Resposta Antioxidante
ATCC – *American Type Culture Collection*
AUR – Auranofina
BRAF – B-Raf Proto-Oncogene
BSO – L-Butionina Sulfoximina
CDDP – Cisplatina
CPCNP – Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas
CUL3 – Culina 3
DAB – 3,3-Dimaminobenzidina
DFS – *Disease-free Survival* (Sobrevida Livre de Doença)
DMBA – 7,12-dimetilbenzantraceno
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle*
DMFS – *Distant Metastasis-free Survival* (Sobrevida Livre de Metástase)
DMSO – Dimetilsulfóxido
EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
FFPE – Amostras de Tecido Pulmonar Fixadas em Formalina e Embebidas em Parafina
H&E – Hemanoxilina & Eosina
IHC – Imunohistoquímica
KEAP1 – Proteína 1 Associada a ECH do Tipo Kelch
KRAS – Gene Homólogo do Oncogene Viral do Sarcoma de Rato Kirsten
LUAD – *Lung Adenocarcinoma* (Adenocarcinoma de Pulmão)
LUSC – *Lung Squamous Cell Carcinoma* (Carcinoma de Células Escamosas)
MET – MET Proto-Oncogene
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo
NAC – N-acetilcisteína
NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
NFE2L2 – *NFE2 like bZIP transcription factor 2*
NF-kB – Fator Nuclear Kappa B
NRF2 – Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2

OS – *Overall Survival* (Sobrevida Global)

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

PTEN – Gene Homólogo de Fosfatase e Tensina

QT – Quimioterapia

SASP – Fenótipo Secretor Associado ao Estado Senescente

SFB – Soro Fetal Bovino

STING – Estimulador da Resposta do Interferon CGAMP Interator 1

STK11 – Gene Supressor Tumoral Serina/Treonina Quinase 11

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNM – Estadiamento tumoral

TXN – Tiorredoxina

TXNRD1 – Tiorredoxina Redutase-1

TXNRD2 – Tiorredoxina Redutase-2

WT – *Wild-type* (Alelo Selvagem)

xCT – Antiportador Aniônico de L-cistina/L-glutamato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer.....	15
1.2 Câncer de Pulmão.....	18
1.2.1 Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas	19
1.2.2 Mutações em CPCNP	21
1.3 Biologia Redox e os Sistemas Glutathione, Tiorredoxina e NRF2	27
1.3.1 Estresse Oxidativo e o Tecido Pulmonar: Porque é importante entendermos essa relação?	31
1.4 Farmacologia das Neoplasias Pulmonares	34
1.5 Fármacos que atuam no Sistema Redox: Possíveis Estratégias de Tratamento para Pacientes com CPCNP e demais Tipos de Câncer	37
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 HIPÓTESE	41
4 OBJETIVOS.....	42
4.1 GERAL	42
4.2 ESPECÍFICO.....	42
5 MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1 Valor Prognóstico dos Genes Antioxidantes no Câncer de Pulmão	43
5.2 Coorte de Pacientes com Câncer de Pulmão.....	44
5.3 Desfechos <i>Endpoints</i> de Sobrevida e Análise de Dados	45
5.4 Imunohistoquímica (IHC).....	45
5.5 Análises de Bioinformática	48
5.6 Cultivo Celular	50
5.7 Ensaio de Viabilidade Celular.....	51
5.8 RNA de Interferência (siRNA)	51
5.9 Ensaio Clonogênico	52
5.10 <i>Western Blot</i>	52
5.11 Ensaio de GSH.....	53
5.12 Análise Estatística	53
6 RESULTADOS.....	54
6.1 A Expressão da Tiorredoxina Redutase-1 Correlaciona-se com a Baixa Sobrevida no Câncer de Pulmão: Comparação com um Conjunto de Genes Relacionados ao	

Estresse Oxidativo	54
6.2 Níveis Elevados de Tiorredoxina Redutase-1 Predizem a Recorrência de Câncer De Pulmão: Resultados de uma Coorte de Pacientes com CPCNP	56
6.3 TXNRD1 é Regulada Positivamente em Tumores que Abrigam Mutações KEAP1/NRF2 e se Correlaciona com a Expressão do <i>Regulon</i> NRF2	62
6.4 Resistência à Inibição de TXNRD1 Mediada por NRF2/GSH e o Papel Fundamental de NRF2 na Sobrevivência de Células de Câncer de Pulmão Mutantes de <i>KEAP1</i>	67
7 DISCUSSÃO	71
8 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE – A	95
ANEXO A – ARTIGO	106
ANEXO B – ARTIGOS EM COLABORAÇÃO	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2020) trazem que o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, ocorrendo quase 10 milhões de mortes no ano de 2020. Cerca de 70% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda, sendo ocasionadas principalmente devido ao alto índice de massa corpórea relacionado ao sedentarismo e ao uso de álcool e tabaco (AGUADÉ-GORGORIÓ; SOLÉ, 2018; BRAY *et al.*, 2014). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Brasil deverá registrar cerca de 704 mil novos casos de câncer para cada ano de 2023 a 2025, com destaque para as regiões sul e sudeste, que concentram cerca de 70% da incidência. Sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente no país, com 220 mil novos casos estimados. Considerando-se todos os demais tipos de cânceres, os mais frequentes na população brasileira são o câncer de mama (73.610 casos), próstata (71.730 casos), cólon e reto (45.630 casos), pulmão (32.560 casos) e estômago (21.480 casos) (INCA, 2023).

A formação do câncer não é um processo simples, recentemente Nassour e colaboradores, 2023, comentaram sobre sua complexidade e trazem que é um processo de várias etapas que requer muitas alterações e mudanças em toda a célula. Caracterizada pela proliferação celular desordenada e que pode afetar diferentes órgãos e sistemas, sua origem se dá a nível celular, a partir de alterações genômicas, como deleção, amplificação ou mutação gênica. Praticamente há 10 anos atrás, Kastan e Bartek (2004), definiram que as alterações que ocorrem em genes supressores tumorais, oncogenes ou genes reguladores do ciclo celular podem dar origem às células clonais com proliferação descontrolada, designando o termo iniciação. E, esta iniciação pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por fatores ambientais com agentes mutagênicos, por exemplo.

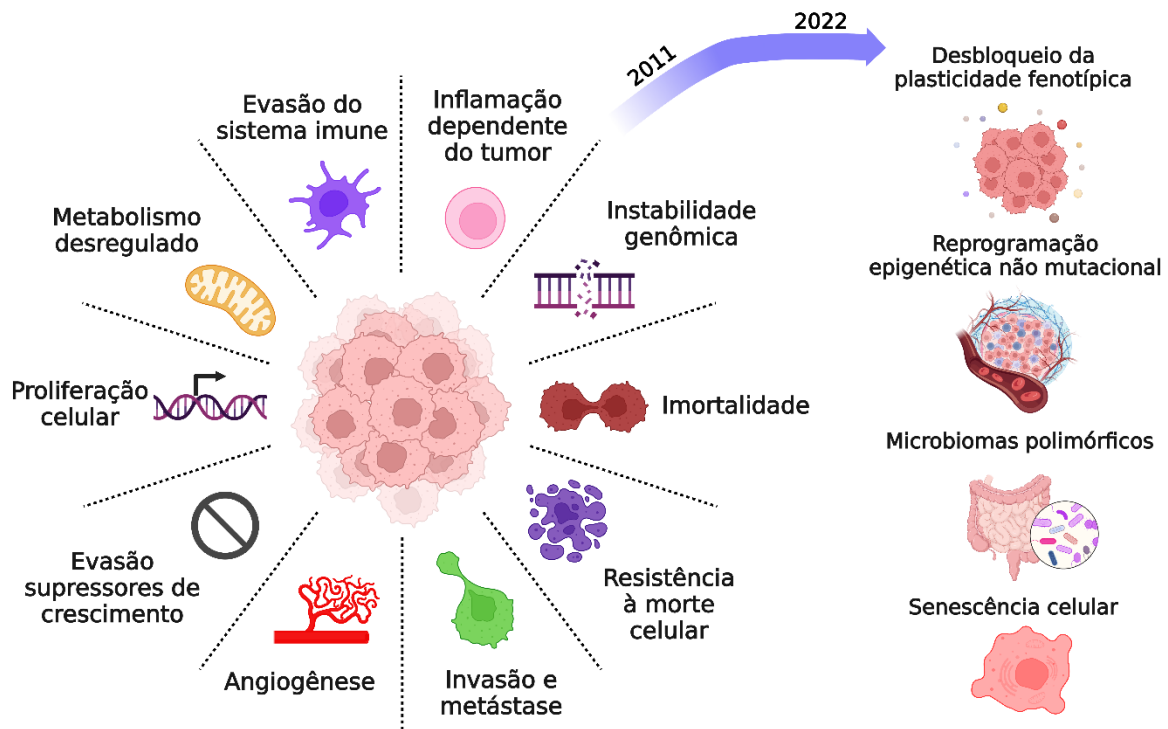
O dano causado ao DNA interfere no ciclo celular, ativando assim proteínas de *checkpoint* que param o ciclo para que possa ser realizado o mecanismo de reparo necessário (KASTAN *et al.*, 2004). Caso não haja o reparo, são ativadas vias que desencadeiam a apoptose, porém, quando esses danos são induzidos com maior frequência, a replicação do DNA pode ocorrer antes que o reparo aconteça. Com a constante exposição a agentes promotores, como fatores de crescimento e fatores

hormonais, a célula mutada prolifera, levando a instabilidade genômica e a pressão seletiva do microambiente, promovendo novas alterações genéticas (STRICKLER *et al.*, 1994). Ademais, dois processos principais também 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).

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). A adaptação ocorre devido a um conjunto de mecanismos que as células tumorais adquirem para sua sobrevivência e proliferação (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; SAHA *et al.*, 2021). Já a invasão se dá pela capacidade que as células cancerosas adquirem de se moverem, penetrarem em outros tecidos circundantes, adentrando nos vasos linfáticos e sanguíneos, iniciando o processo de metástase (NOVIKOV *et al.*, 2021). E a metástase é a capacidade de disseminar células malignas de um tumor primário em determinado órgão para outros órgãos secundários, envolvendo diferentes mecanismos celulares (SUHAIL *et al.*, 2019).

Um ponto fundamental para compreender essa doença são os “*Hallmarks of Cancer*”. Os quais são caracterizados por um conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células durante o processo de transformação neoplásica, propostos por Hanahan e Weinberg em 2000. Em 2011, os mesmos pesquisadores (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011) realizaram uma atualização e outras quatro características foram adicionadas. Essas capacidades são consideradas como “marcas” principais do câncer e incluem a reprogramação do metabolismo celular e a evasão do sistema imune, além de outras características que refletem nos mecanismos moleculares e celulares pelos quais as características funcionais são adquiridas. Mais recentemente, em 2022 (HANAHAHAN, 2022) o autor propôs outras quatro novas características funcionais e habilitantes, as quais podem ser incorporadas como componentes centrais dos *Hallmarks* ao longo do tempo. Essas novas características incluem desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular (Figura 1).

Figura 1 – Características do Câncer



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Inspirado no trabalho do autor Hanahan (2022), essa figura demonstra a adição de *Hallmarks* já estabelecidos em 2011 para o ano de 2022. À esquerda, temos as características atuais que compreendem as capacidades adquiridas do câncer, as quais são a evasão do sistema imune, metabolismo desregulado, proliferação celular, evasão dos supressores de crescimento, angiogênese, invasão e metástase, resistência à morte celular, imortalidade, instabilidade genômica e inflamação dependente do tumor. À direita, temos as quatro características recentemente implementadas, que envolvem o desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes.

Sucintamente, o desbloqueio da plasticidade fenotípica se refere ao processo que permite que as células normalmente diferenciadas sejam capazes de recuperar a capacidade de mudar sua morfologia e função, o que pode ajudar as células cancerosas a evadir a diferenciação terminal (HANAHAHAN, 2022). Já a reprogramação epigenética não mutacional descreve mudanças na expressão gênica que são puramente reguladas por fatores epigenéticos, em vez de mutações genéticas. Essas mudanças podem contribuir para a aquisição de capacidades funcionais pelos tumores malignos. Os microbiomas polimórficos são microbiotas residentes em diferentes tecidos ou neoplasias que podem contribuir ou interferir na aquisição de capacidades funcionais pelas células cancerosas, isso acontece por meio da produção de toxinas bacterianas que danificam o DNA. Os microbiomas também são capazes de produzir fatores imunomoduladores e moléculas que mimetizam sinais

proliferativos, podendo ocorrer em diferentes tecidos, além do cólon (HANAHAHAN, 2022). Por último, a senescência celular é uma forma de parada proliferativa irreversível que provavelmente evoluiu como um mecanismo protetor para manter a homeostase do tecido. Embora seja vista como um mecanismo de proteção contra o câncer, há evidências de que as células senescentes podem promover a progressão do câncer por meio do fenótipo secretor associado ao estado senescente (SASP) (HANAHAHAN, 2022; KHALIL; DIAB-ASSAF; LEMAITRE, 2023).

1.2 Câncer de Pulmão

É o terceiro câncer mais incidente e o primeiro com maior mortalidade no mundo em ambos os sexos (OMS, 2023). Aproximadamente 85% de todos os cânceres de pulmão são classificados como câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP), sendo responsável por mais de 1,8 milhões de mortes por ano no mundo (BRAY *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços nas modalidades de tratamento, como terapias direcionadas e inibidores do ponto de controle imunológico, a taxa de sobrevida em 5 anos entre pacientes com câncer de pulmão é de apenas 18% (FITZMAURICE *et al.*, 2017). Embora o prognóstico do CPCNP seja melhor na doença em estágio inicial, 30% a 55% dos pacientes com CPCNP ressecável (paciente sem metástase e com tumor pequeno) desenvolvem recorrência locorregional (quando o tumor volta ao mesmo local de origem) ou distal (quando o tumor envolve os linfonodos ou tecidos próximos do tumor original) após a cirurgia e/ou quimioterapia adjuvante (URAMOTO; TANAKA, 2014). Portanto, a identificação de marcadores prognósticos e assinaturas gênicas para pacientes com CPCNP em estágio inicial pode potencialmente aumentar as taxas de sobrevida, indicando aqueles que precisam de um tratamento mais intenso para minimizar a recorrência da doença.

Este tipo de câncer ocorre após uma série de alterações histopatológicas progressivas no epitélio brônquico, sendo classificado em 2 tipos histológicos, o câncer de pulmão de pequenas células (CPPC), afetando cerca de 10 – 15% dos casos, com metástase generalizada, sendo mais comum em fumantes ativos, e o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). Este, por sua vez, é dividido em 3 subtipos histológicos, sendo 40% dos casos adenocarcinoma (LUAD), 25 – 30% carcinoma de células escamosas (LUSC) e 10 – 15% carcinoma indiferenciado de

células grandes. Por possuir sinais e sintomas que são comuns à outras enfermidades menos letais, tais como: tosse crônica, tosse com sangue, “chiado no peito”, dispnéia e perda de peso, há baixas chances de um diagnóstico precoce, com uma estimativa de que apenas 5 – 15% dos casos sejam detectados na fase assintomática da doença (BARATA *et al.*, 2017). O diagnóstico é realizado por meio de exames de imagem, como raios-X e tomografia computadorizada do tórax, e biópsia por broncoscopia ou agulha fina para diagnóstico por histologia e citologia da amostra (GRIDELLI *et al.*, 2008; RAPP *et al.*, 1988; RAMALINGAM; BELANI, 2008; ZHIHUA *et al.*, 2016).

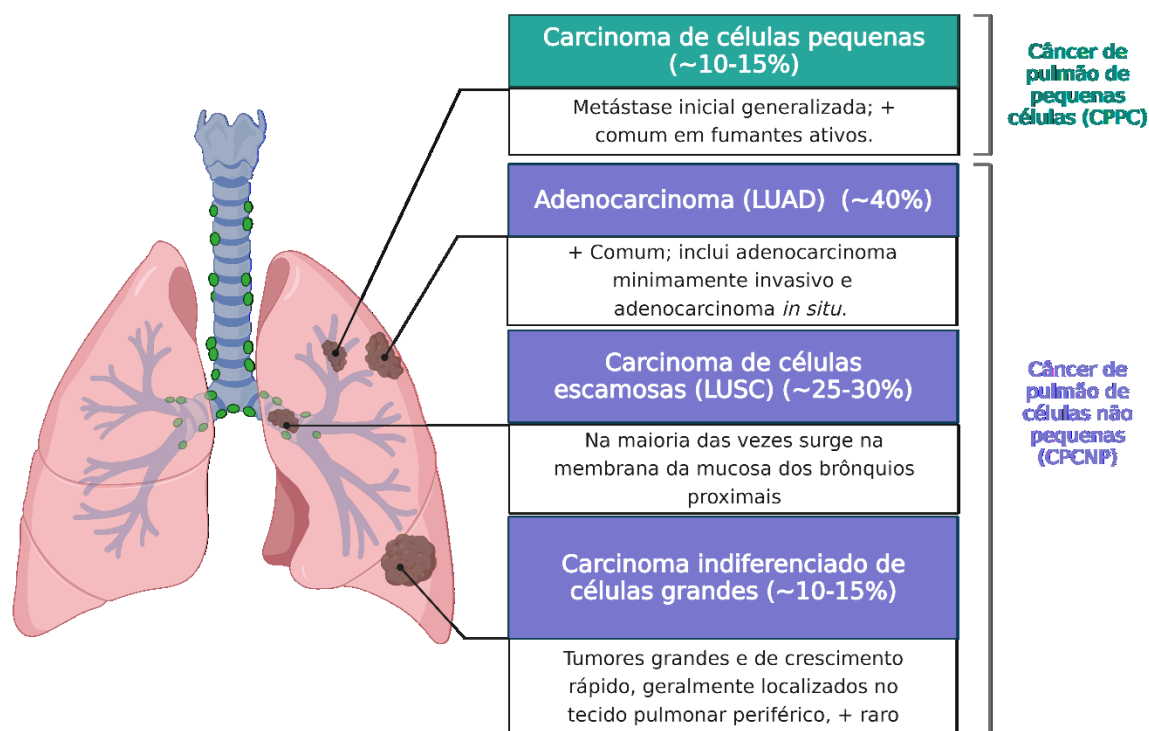
1.2.1 Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas

É um tumor maligno de origem epitelial que pode crescer em diferentes áreas entre a traqueia e a periferia do pulmão, caracterizado pelo crescimento e mutação desordenada das células epiteliais (KUMAR *et al.*, 2013; NOORELDEEN; BACH, 2021).

O LUAD refere-se ao tumor com início nas células epiteliais alveolares tipo II, localizadas no epitélio das vias aéreas menores e locais com produção de muco, normalmente em áreas periféricas da anatomia do pulmão. Este subtipo cresce mais lentamente e é o mais comum (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 LUSC, também chamado de epidermóide, refere-se aos tumores com origem nas células escamosas que revestem o interior das vias aéreas, e os tumores tendem a se localizar na região central dos pulmões e perto dos brônquios (CHABNER; LONGO, 2015). Já o carcinoma indiferenciado de células grandes é o subtipo mais agressivo, sendo capaz de 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 (Figura 2) (DUMA; SANTANA-DAVILA; MOLINA, 2019).

Representando juntos cerca de 15 a 20% dos casos, temos também os subtipos histológicos menos incidentes como o carcinoma adenoescamoso, carcinoma neuroendócrino de células grandes, carcinoma sarcomatóide pleomórfico e tumor carcinóide (SCHABATH; COTE, 2019).

Figura 2 – Classificação Histológica do Câncer de Pulmão



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Tipos e subtipos de câncer de pulmão de acordo com sua classificação histológica. Ressaltando que cerca de 85% dos casos de câncer de pulmão são classificados como câncer de pulmão de células não pequenas.

Segundo Schabath (2019), além dos subtipos histológicos, devido aos 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. O estágio do tumor no momento do diagnóstico é importante para o prognóstico da doença, a qual é a estimativa de como uma doença evolui em cada paciente, e está diretamente relacionado à evolução clínica do paciente. No estadiamento avaliamos o grau de disseminação do tumor, obtendo informações decisivas para a escolha da abordagem terapêutica (BYRD *et al.*, 2017; TRAVIS *et al.*, 2010).

Há 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, e, uma vez determinados o T, N e M, são combinados para atribuir uma nota global. Para a maioria dos cânceres, o estágio utiliza um número romano de I a IV, sendo o estágio IV o mais avançado do

que a fase imediatamente anterior e assim sucessivamente (DETTERBECK *et al.*, 2017).

1.2.2 Mutações em CPCNP

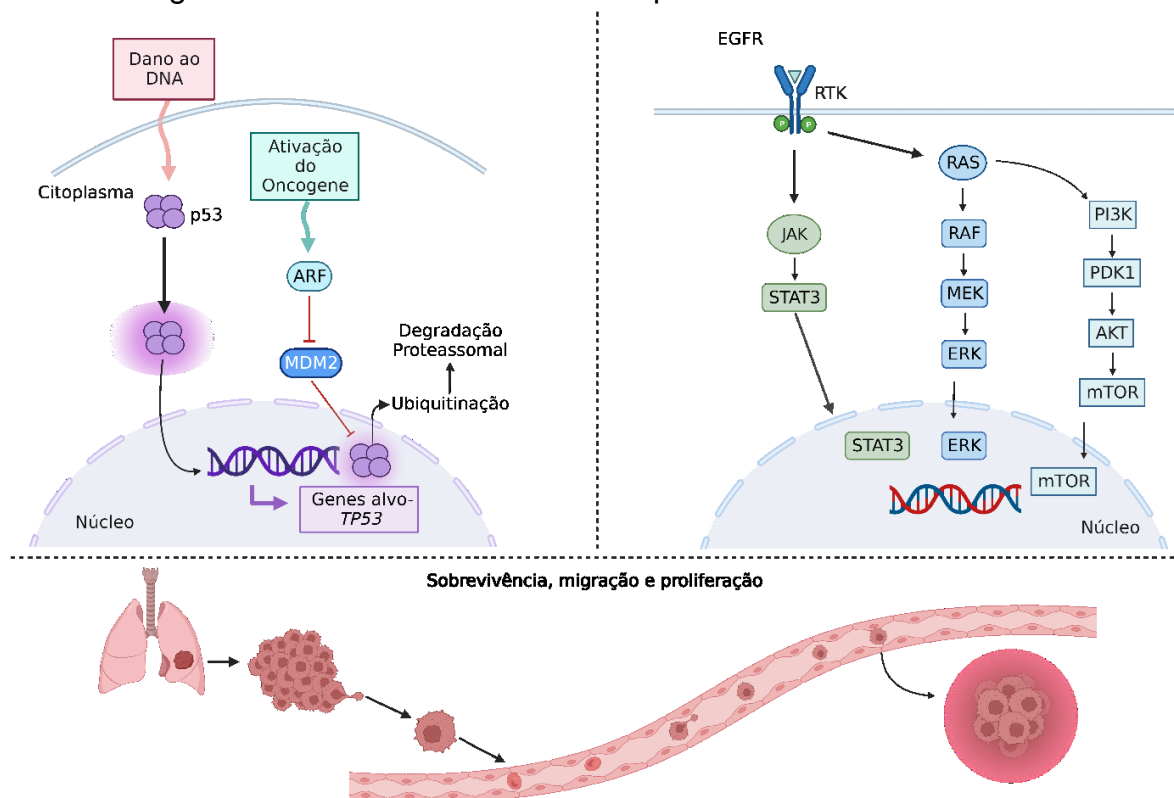
Foi demonstrado pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (2012) (COLISSON *et al.*, 2014) que tumores pulmonares são molecularmente heterogêneos, mesmo em um mesmo tipo histológico e, entre os principais achados moleculares, foi observado que as mutações em p53 (gene *TP53* – gene supressor tumoral 53) foram frequentes, ocorrendo em 46% dos casos em LUAD, 81% em LUSC e 68% dos casos nas análises de *Pan-Lung Cancer* (TCGA) (SÁNCHEZ-ORTEGA; CARRERA; GARRIDO, 2021). Por outro lado, nas análises de *Pan-Lung Cancer* (TCGA), as alterações genéticas mutualmente exclusivas em genes associados às vias das MAP cinases como *KRAS* (gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten) – 23%, *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico) – 14% e via da AKT (Serina/Treonina Quinase) – *PTEN* (Homólogo de Fosfatase e Tensina) – 9%, *PIK3CA* (Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato 3-Quinase Subunidade Catalítica Alfa) – 24% e *AKT1* (Serina/Treonina Quinase) – 2,9% – foram diferencialmente expressas nos subtipos histológicos de cânceres de pulmão (SÁNCHEZ-ORTEGA; CARRERA; GARRIDO, 2021).

Mutações recorrentes de *TP53* no câncer de pulmão foram descritas em 1989 (NIGRO *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1989), sendo o gene mais frequente mutado no LUAD. Seu produto proteico, p53, ativa programas de transcrição que induzem a parada do ciclo celular, apoptose e senescência em resposta a diversos estresses celulares (Figura 3) (VAZQUEZ *et al.*, 2008). Mutações em *EGFR* foram relatadas pela primeira vez no LUAD em 2004 em cerca de 10% dos pacientes ocidentais e mais de 40% dos pacientes do Leste Asiático (LYNCH *et al.*, 2004; PAEZ *et al.*, 2004; PAO *et al.*, 2004). As mutações observadas foram determinadas como ativadoras constitutivas e oncogênicas (GREULICH *et al.*, 2005) e correlacionadas com a resposta do paciente a gefitinibe e erlotinibe, inibidores seletivos do domínio tirosina quinase de EGFR. O *EGFR* mutante é, portanto, um alvo terapêutico comprovado no LUAD e, embora os pacientes com mutações em *EGFR* nos éxons 18, 19 e 21 respondam bem ao gefitinibe e ao erlotinibe, a boa resposta terapêutica inicial

geralmente se segue de resistência tumoral, e os pacientes recaem após cerca de um ano de tratamento (PAO; CHMIELECKI, 2010).

Sucintamente, receptores de tirosina quinases (RTKs) são quinases que atuam na sinalização em cascata e estão envolvidos na ativação da via RAS/RAF/MEK/ERK. EGFR ativa a cascata de transdução de sinal ao se ligar e ativar as glicoproteínas transmembrana dos RTKs, levando a regulação da transcrição/tradução de genes efetores (BRAICU *et al.*, 2019). Os três mecanismos-chave que levam à ativação de EGFR incluem aumento da expressão de *EGFR* em células malignas (amplificação de *EGFR*), aumento da produção de ligantes pelas células malignas e mutações ativadoras de EGFR dentro das células cancerosas. Como resultado da ativação de RTKs, o domínio estrutural intracelular de EGFR é autofosforilado, e os resíduos de fosfotirosina formam “pontos de ancoragem” para diversas moléculas adaptadoras, induzindo a sinalização *downstream* (LIU *et al.*, 2018). Por sua vez, as vias RAS, PI3K e JAK (*janus associated kinases*) são ativadas, estimulando a sobrevivência, migração e proliferação celular, inibindo a apoptose (Figura 3) (MEADOR; HATA, 2020).

Figura 3 – Do Gene *TP53* aos Receptores de Tirosina Quinases



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Podemos observar, de forma sucinta, as diferentes vias que são afetadas e levam/regulam a sobrevivência, migração e proliferação do CPCNP. Do lado esquerdo da imagem encontramos a via de sinalização de p53, por ser considerada a "guardiã do genoma", a p53 é ativada em resposta a

vários tipos de estresse celular e erros no DNA. Quando ativada, a p53 estimula a expressão de genes que inibem a proliferação de células danificadas, regulando assim, negativamente, o ciclo celular. Como fator de transcrição, a *TP53* interage com diferentes genes de acordo com o tipo celular e contexto do estresse celular. Dentre as respostas supressoras de tumor ativadas pela p53, encontram-se exemplos como apoptose, senescência, reparo do DNA e parada do ciclo celular. Em síntese, a p53 é crucial como proteína supressora de tumores, e sua inatividade causa instabilidades genômicas que desregulam mecanismos de controle do ciclo celular, levando à proliferação desgovernada e ilimitada de células que dão origem a tumores. Do lado direito, observamos as vias JAK/RAS/PI3K. A via JAK/STAT3 é responsável por regular a homeostase celular, incluindo processos como proliferação, diferenciação e apoptose. É ativada por diversos fatores de crescimento e citocinas que estão envolvidos no ciclo celular, a ativação desses fatores induz a fosforilação das proteínas do complexo JAK, que por sua vez, fosforila as proteínas do complexo STAT3. Essas proteínas se deslocam para o núcleo, onde funcionam como fatores de transcrição da expressão gênica. Na ativação das vias RAS e PI3K, EGFR atua no ciclo de sobrevivência celular.

Ensaio de Fase II com inibidores de MEK como agentes únicos em pacientes com CPCNP demonstraram falta de eficácia do inibidor (BODOKY *et al.*, 2012; RINEHART *et al.*, 2004). Em outro trabalho, no ano de 2009, demonstraram que o tratamento com sorafenibe, um inibidor de BRAF, e várias outras quinases, resultou na estabilidade da doença para 59% dos pacientes com CPCNP em um estudo de fase II, porém, não houve melhora significativa no quadro da doença desses pacientes (BLUMENSCHNEIN *et al.*, 2009).

Em 2021, a *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos, concedeu a rápida aprovação do medicamento sotorasibe (Lumakras™, Amgen) para o tratamento de adultos com CPCNP avançado com *KRAS* mutado, após terem recebido pelo menos uma terapia sistêmica prévia. A decisão de aprovação foi fundamentada no estudo *CodeBreak 100*, o qual consistiu em um estudo de fase I e II de escalonamento de dose e expansão de dose em pacientes com CPCNP avançado com *KRAS* mutado (SKOULIDIS, *et al.*, 2021; NAKAJIMA, *et al.*, 2022). Cabe ressaltar que essa é a primeira vez em que uma terapia direcionada para o CPCNP com mutação em *KRAS* recebe aprovação, o que representa um avanço significativo tanto para os pacientes que até então não dispunham de opções terapêuticas específicas quanto para a ciência.

Por fim, cerca de 30% da população com CPCNP apresenta mutações na via do Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2) (ZANOTTO-FILHO, *et al.*, 2016), incluindo o seu gene codificante *NFE2L2*, o seu modulador Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (*KEAP1*) e Culina 3 (*CUL3*), os quais estão melhor descritos no tópico a seguir.

1.2.2.1 Mutações em *KEAP1/NFE2L2* em CPCNP

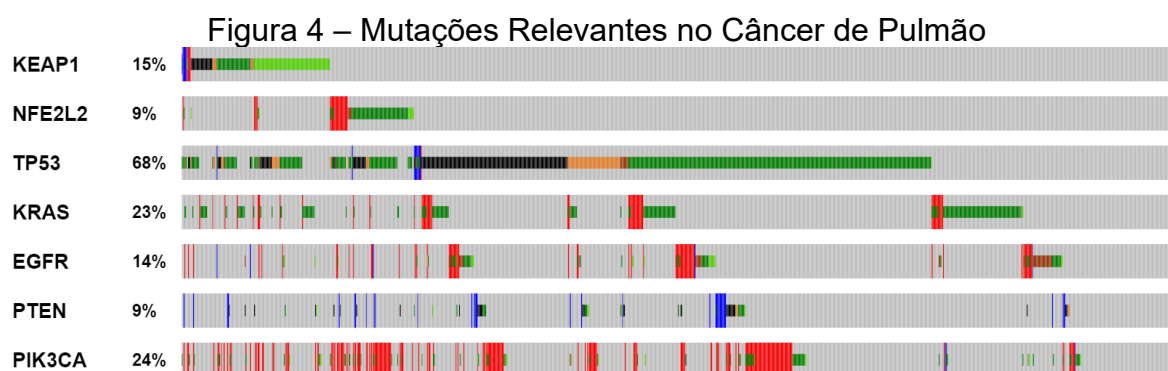
NRF2 é um fator de transcrição chave em vias celulares antioxidantes, metabólicas, citoprotetoras e anti-inflamatórias (JARAMILLO; ZHANG, 2013). E possui um papel importante na regulação de genes envolvidos na resposta antioxidante e de detoxificação celular. Pois, controla a expressão de enzimas responsáveis pela produção de GSH (GCLC/GCLM), sendo capaz de induzir a expressão do sistema xCT (antiportador aniônico de L-cistina/L-glutamato), controlando assim, a disponibilidade de cisteína, a qual é um aminoácido essencial na síntese de GSH (SASAKI *et al.*, 2002).

A KEAP1 é uma proteína que desempenha um papel crucial na regulação de NRF2 (este assunto está melhor descrito no tópico a seguir de Biologia Redox e os Sistemas Glutathione, Tiorredoxina e NRF2), sendo responsável por detectar o desequilíbrio do estado redox na célula e ativar a ação nuclear da proteína NRF2. A proteína NRF2 e a proteína KEAP1 estão relacionadas ao elemento de resposta antioxidante (ARE). O ARE é uma sequência de DNA palindrômica presente em mais de 250 genes reguladores, conhecidos como genes ARE, que codificam enzimas envolvidas em processos antioxidantes e de biotransformação. O NRF2, junto com proteínas Maf, formam um heterodímero que se liga ao ARE para regular a transcrição dos genes envolvidos nos processos antioxidantes. Além disso, a localização subcelular do NRF2 é afetada pela fosforilação pós-tradução, que é regulada por três vias de sinalização principais: a via PKC, a via MAPK e a via PI3K/AKT, em resposta ao estresse oxidativo.

Mutações inativadoras em KEAP1 foram associadas a um microambiente alterado imunologicamente em CPCNP (CRISTESCU *et al.*, 2018). Ademais, NRF2 foi recentemente identificado como um regulador negativo da expressão de *STING1* (estimulador da resposta do interferon CGAMP Interator 1) por meio de efeitos na estabilidade do mRNA de *STING* (OLAGNIER *et al.*, 2018), sugerindo assim uma conexão entre os efeitos da inativação de KEAP1 e *STK11* (Gene Supressor Tumoral Serina/Treonina Quinase 11). Fenótipos imunológicos adicionais podem estar exclusivamente associados à perda de KEAP1; por exemplo, o aumento do acúmulo peritumoral de células *natural killer* em tumores mutantes *KEAP1* foi relatado em uma coorte de pacientes com LUAD em estágio inicial ressecados cirurgicamente (KADARA *et al.*, 2017). Estudos com modelo *in vivo* demonstraram que a perda de

KEAP1 aumenta a carga tumoral e a porcentagem de lesões de alto grau, apontando para papéis tanto na iniciação quanto na progressão tumoral (ROMERO *et al.*, 2017). Assim, a potencialização das vias celulares anabólicas, antioxidantes e de detoxificação suportam coletivamente o fenótipo clínico agressivo do CPCNP *KEAP1* mutante, como um indicador de prognóstico negativo independente (MARCHETTI *et al.*, 2011; SKOULIDIS; HEYMACH, 2019).

Amostras de 1.144 pacientes do *Pan-Lung Cancer* provenientes do TCGA no ano de 2016 demonstram a heterogeneidade do câncer de pulmão, bem como, é possível notar nesses dados que os pacientes com mutações na via de KEAP1/NRF2 não possuem sobreposição de outros genes importantes sinalizados na Figura 4, ou seja, esses pacientes não são contemplados pelas terapias alvo. Logo, tendem a receber como tratamento os compostos de platina, lembrando que alguns estudos já demonstraram que a ativação de NRF2 confere um fenótipo de resistência à agentes alquilantes e compostos de platina em linhagens de câncer de pulmão (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016), ademais, foi identificado que a proteção celular mediada por NRF2 ocorria via expressão de enzimas da síntese de GSH e de TXNRD1 em células tratadas com cisplatina, uma vez que, inibidores da síntese destas enzimas potencializaram a morte celular por cisplatina em células tumorais (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016).



Fonte: cBioPortal - TCGA, 2016.

Legenda: *Oncoprint* com a porcentagem da mutação de cada gene selecionado para esta análise em uma coorte de 1.144 pacientes do *Pan- Lung Cancer* provenientes do TCGA no ano de 2016, demonstrando a heterogeneidade do câncer pulmonar, e que mutações na via de KEAP1/NRF2 não estão sobrepostas à outras mutações, ou seja, cada “risco” é um tipo de mutação, demonstradas nas cores azul (*deep deletion*), vermelho (amplificação), preto (mutação truncada), verde (mutação *missense*) e assim por diante, sendo, as mutações presentes nos genes de *KEAP1*: *Deep deletion*, amplificação, mutação truncada, mutação *splice* e mutação *missense*. *NFE2L2*: mutação *splice*, mutação *missense* e amplificação. *TP53*: *Deep deletion*, amplificação, mutação truncada, mutação *splice*, mutação *missense* e mutação *inframe*. *KRAS*: mutação *missense* e amplificação. *EGFR*: *Deep deletion*, amplificação, mutação *splice*, mutação *missense* e mutação *inframe*. *PTEN*: *Deep deletion*, mutação *splice* e mutação *missense*. *PIK3CA*: *Deep deletion*, amplificação e mutação *missense*.

O *Oncoprint* do cBioPortal é um gráfico que mostra a presença ou ausência de alterações genéticas, em uma determinada amostra de câncer, sendo frequentemente usado para identificar padrões de mutações em um grande conjunto de dados de pacientes com câncer. No quadro 1 podemos observar a descrição das mutações que ocorrem nos genes demonstrados na figura 4 e suas possíveis consequências.

Quadro 1 – Diferentes Mutações e suas Consequências

Mutação	Descrição	Consequências
<i>Deep Deletion</i>	Deleção de uma sequência maior do que um nucleotídeo	Pode causar perda completa ou parcial de uma ou várias regiões do gene, levando a alterações na proteína resultante
Amplificação	Aumento no número de cópias de uma sequência de DNA	Pode resultar em excesso de proteínas, afetando a sua função normal, ou em mudanças na sua expressão
Truncada	Resulta em uma proteína mais curta do que o normal	Pode levar à perda de funções importantes da proteína, como regiões de ligação ou atividade enzimática, afetando o seu papel biológico
<i>Missense</i>	Substituição de um nucleotídeo por outro que codifica um aminoácido diferente	Pode resultar em alterações na estrutura e função da proteína, causando efeitos variados que dependem da localização da mutação
<i>Splice</i>	Ocorre em um dos sítios de <i>splicing</i> que resulta na alteração na maneira como o RNA é processado	Pode levar à inserção de um códon prematuro ou a mudanças na estrutura da proteína, afetando sua função normal
<i>Inframe</i>	Afeta um número limitado de nucleotídeos, sem causar uma mudança no quadro de leitura do gene	Pode levar à adição ou remoção de aminoácidos específicos da proteína, afetando a sua função normal

Fonte: REITSMA, *et al.*, 1995.

Legenda: Neste quadro estão descritas as mutações citadas na Figura 4 e as consequências causadas por cada tipo de mutação, a qual pode ocorrer em diferentes genes.

Além destas alterações clássicas, mutações somáticas nos genes *NFE2L2* e/ou *KEAP1* ocorrem em aproximadamente 25% dos casos em LUSC, 20% em LUAD e aproximadamente 30% das mutações nessa via (*NFE2L2/KEAP1/CUL3*) são vistas nas análises de *Pan-Lung Cancer* (TCGA) (*CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al.*, 2012; COLLISSON *et al.*, 2014). Essas alterações podem afetar a interação proteína-proteína KEAP1:NRF2 e gerar uma série de alterações (descritas

no tópico a seguir sobre Biologia Redox e os Sistemas Glutationa, Tiorredoxina e NRF2) (NGUYEN; NIOI; PICKETT, 2009; HUANG; NGUYEN; PICKETT, 2002; NGUYEN *et al.*, 2003; LI; PAONESSA; ZHANG, 2012; ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016), às quais até o momento não foram exploradas do ponto de vista terapêutico (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; *CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al.*, 2014; . NADAL; PALMERO; MUÑOZ-PINEDO, 2019; NAMANI *et al.*, 2017; JARAMILLO; ZHANG, 2013; LI; PAONESSA; ZHANG, 2012).

Pacientes com CPCNP com mutações em *NFE2L2/KEAP1* e superexpressão de genes-alvo de NRF2 estão associados com uma má resposta aos quimioterápicos, bem como, apresentam sobrevida livre de progressão e sobrevida global mais curtas, quando comparadas aos pacientes que não apresentam essa mutação (FRANK *et al.*, 2018; GOEMAN *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2020).

1.3 Biologia Redox e os Sistemas Glutationa, Tiorredoxina e NRF2

Nos anos 2000 houve o surgimento de uma nova linha de pesquisa na área da Biologia Redox: Antioxidantes e a Regulação Redox de Genes (SUTHERLAND *et al.*, 1985; SIES; JONES, 2020). A reação redox é qualquer reação química que envolve a transferência de elétrons. A maioria dos processos redox envolve a transferência de átomos de oxigênio, hidrogênio ou elétrons, e todos compartilham de duas características importantes: primeira, eles são acoplados, ou seja, em qualquer reação de oxidação ocorre uma redução recíproca, e segunda, eles envolvem uma mudança química característica, ou seja, um átomo ou elétron vai de uma unidade de matéria para outra (SIES; JONES, 2020).

Em 1963, Hermann Esterbauer descobriu o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), o qual é um composto produzido por autooxidação de ácidos graxos insaturados e é considerado um dos produtos mais abundantes e biologicamente ativos (ESTERBAUER; WEGER, 1967; ESTERBAUER *et al.*, 1982). Ademais, foi identificado que o HNE era responsável pela patologia de várias doenças (CURZIO *et al.*, 1987; GRUNE *et al.*, 1994; BENEDETTI; COMPORTI; ESTERBAUER, 1980; BENEDETTI *et al.*, 1984). Investigando as funções do HNE na biologia redox, Rui-Ming Liu e colaboradores, demonstraram que esse composto poderia induzir a biossíntese de glutationa (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina – GSH), através da elevação transcricional da expressão gênica de glutamato-cisteína ligase (GCL) e de gama-

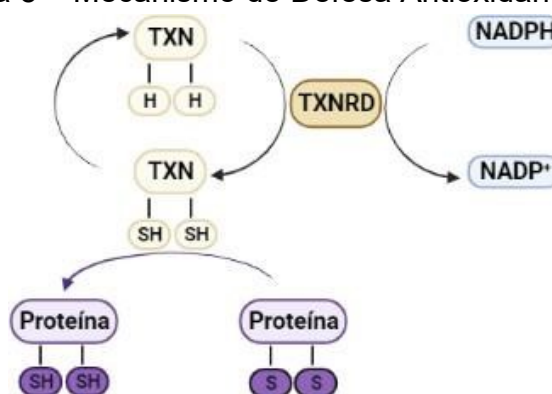
glutamil transpeptidase (GGT) (ZHANG *et al.*, 2005; ZHANG; COURT; FORMAN, 2007; DICKINSON *et al.*, 2002).

A GSH é sintetizada e degradada em um ciclo que foi descrito por Alton Meister (ORLOWSKI; MEISTER, 1970), sendo o substrato redutor para as peroxidases de GSH e peroxirredoxinas na remoção de hidroperóxidos, e para as S-transferases de glutathione na eliminação de xenobióticos. Helmut Sies, pesquisador que cunhou o termo de estresse oxidativo em 1985 como sendo o desbalanço entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes (SIES; JONES, 2020; CADENAS; SIES, 1985), sugeriu que a oxidação de GSH em glutathione dissulfeto (GSSG) e a formação de dissulfetos mistos de proteína-glutathione eram o determinante essencial desse estresse (FORMAN, 2016). A GSH é uma molécula produzida intracelularmente em todos os órgãos e tipos celulares, presente em maior quantidade no fígado e pulmões. Estando de 85 a 90% livremente distribuídos no citoplasma, e o restante estando compartimentalizados em organelas como as mitocôndrias, peroxissomos, matriz nuclear e retículo endoplasmático (FRANCO *et al.*, 2007). Como maior antioxidante intracelular do organismo, a depleção de GSH pode ser tanto a causa como o pré-requisito para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os sistemas GSH e tioredoxina (TXN) são considerados os dois principais sistemas antioxidantes redutores de tiol e ambos têm expressão ubíqua (NORDBERG; ARNÉR, 2001)

A TXN é uma importante rede enzimática para a defesa antioxidante e possui várias funções reguladoras redox. Ela é composta pela TXN, pelas tioredoxinas redutases (TXNRD1 e TXNRD2) e por NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) (NORDBERG; ARNÉR, 2001), sendo descrita em 1964 por Laurent e colaboradores como uma pequena proteína com atividade redox na *Escherichia coli* (LAURENT; MOORE; REICHARD, 1964). Mais adiante, as TXN foram encontradas em diversas espécies procarióticas e eucarióticas, demonstrando que as TXN de mamífero estão relacionadas com diversas funções celulares. A atividade destas proteínas é encontrada no meio extracelular, participando do crescimento celular e quimiotaxia, no citoplasma, atuando como antioxidante e fator redutor, no núcleo, regulando a atividade de fatores de transcrição e na mitocôndria (POWIS; MONTFORT, 2001). A TXN realiza a redução de grupos cisteína oxidados em proteínas, demonstrado na Figura 5, por meio da interação com o centro redox ativo da TXN (cisteína (Cys) – glicina (Gly) – prolina (Pro) - Cys) (MAULIK; DAS, 2008). Devido ao seu papel em diversos processos relacionados ao câncer, o par

TXNRD1/TXN surgiu como alvo potencial para a terapia do câncer, especialmente em tipos de tumores suscetíveis ao estresse oxidativo (URIG; BECKER, 2006; YAN *et al.*, 2019; DAI *et al.*, 2013). Inibidores da via TXNRD1, como o composto de fosfina de ouro (Au(I)) – Auranofina, disponível por via oral e aprovado pelo FDA desde 1985 para o uso no tratamento da artrite reumatóide, ganhou o interesse como um agente anticancerígeno (OMATA *et al.*, 2006).

Figura 5 – Mecanismo de Defesa Antioxidante TXN



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A TXN realiza a redução de grupos cisteína oxidados em proteínas, por meio da interação com o centro redox ativo da TXN, através de elétrons do NADPH reduzem as isoformas de TXN, bem como, uma série de outros substratos proteicos e não proteicos.

Com esses achados e a área da biologia redox crescendo cada vez mais, em 1991, Cecil Pickett caracterizou o “elemento regulador”, conhecido como o elemento de resposta antioxidante (ARE) (RUSHMORE; MORTON; PICKETT, 1991). Um dos reguladores transcricionais é o NRF2, regulado pelo gene *NFE2L2*, o qual foi identificado em 1994 por Paolo Moi e colaboradores (MOI *et al.*, 1994).

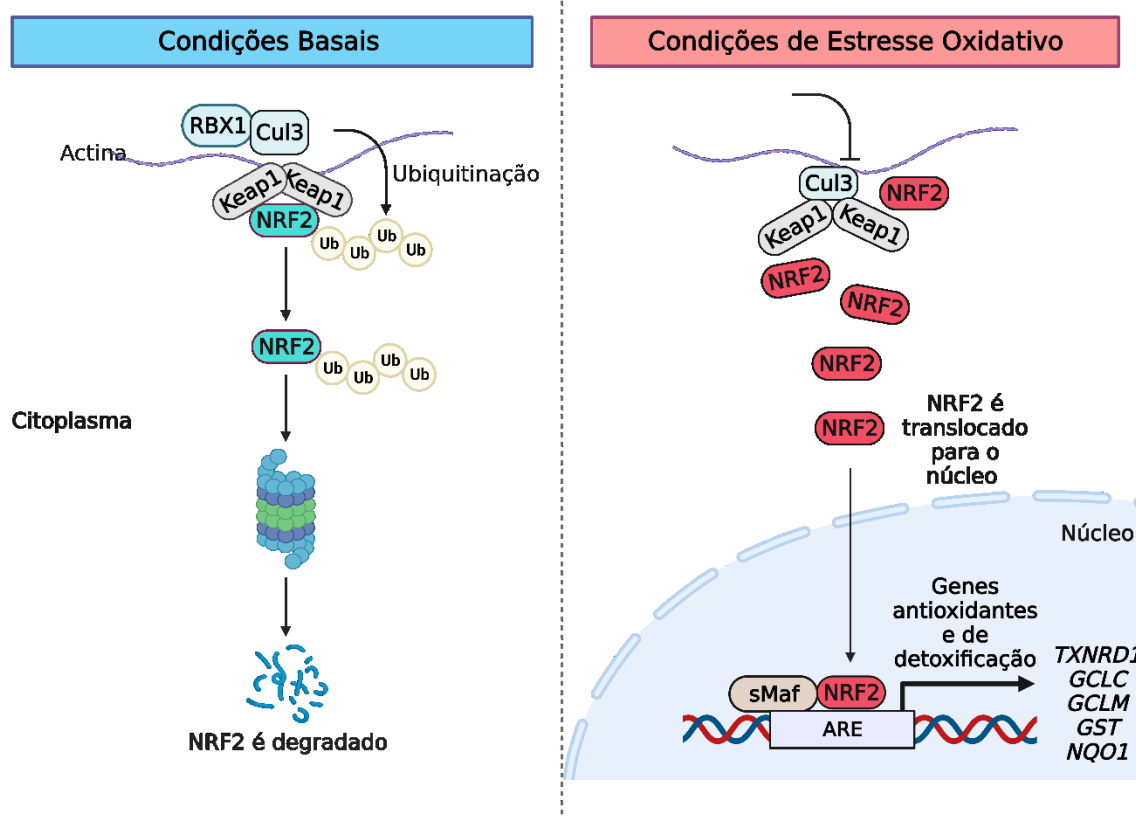
Sabendo que o NRF2 se liga ao ARE, provavelmente ele seria capaz de ativar respostas ao estresse oxidativo, com isso, o NRF2 logo se tornou um foco importante de pesquisa do grupo de Pickett, o qual ajudou a descobrir os principais aspectos de como o próprio NRF2 é regulado pela degradação proteassomal e pelas proteínas quinases (NGUYEN; NIOI; PICKETT, 2009; HUANG; NGUYEN; PICKETT, 2002). Sob condições basais, em que há correta ativação e desativação da via, o NRF2 interage no citoplasma com o seu modulador KEAP1. A KEAP1 atua em um complexo com a proteína Culina-3, promovendo a ubiquitinação de NRF2 e a sua degradação proteassomal, gerando citoproteção e homeostase celular. Mas, em situações de estresse oxidativo e eletrofílico gerados por xenobióticos, ou em alguns casos de

câncer de pulmão em que há mutação, amplificação ou até mesmo deleção de genes relacionados a essa via (*NFE2L2*, *KEAP1* e *CUL3*), resíduos de cisteína em *KEAP1* são modificados covalentemente, inibindo a *KEAP1* e interrompendo a interação desta com o *NRF2*, não ocorrendo a sua degradação proteassomal e sendo translocado para o núcleo (NGUYEN *et al.*, 2003; LI; PAONESSA; ZHANG, 2012; ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; LEVY; FORMAN, 2010; MAHAFFEY *et al.*, 2009).

NRF2, um membro ubiquamente transcrito da subfamília cap-n-colar dos fatores de transcrição bZIP, é um dos mais importantes reguladores de detoxificação e respostas ao estresse oxidativo em células de mamífero e um regulador mestre da expressão do gene *TXNRD1* (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; SAKURAI *et al.*, 2005; NAMANI *et al.*, 2017). Em condições sem estresse, baixos níveis celulares de *NRF2* são mantidos por meio da degradação proteassomal por meio da ligação à *KEAP1*. *KEAP1* liga *NRF2* como um dímero através de seu domínio Kelch C-terminal. Por meio de seu domínio N-terminal, *KEAP1* interage com Culina-3, que serve como um “andaime” para a caixa de anel 1 da ubiquitina ligase E3 (RBX1) (SHIBATA *et al.*, 2008; DE LA VEGA; CHAPMAN; ZHANG, 2018). As ERO e compostos eletrofílicos induzem a oxidação de cisteínas em *KEAP1*, que modificam a conformação de *KEAP1*, impedindo assim a degradação de *NRF2*. Após o acúmulo de *NRF2*, o mesmo se transloca para o núcleo e interage com o ARE no DNA para regular positivamente os genes que codificam as enzimas de eliminação de ERO e de detoxificação de xenobióticos, vias metabólicas e síntese de nucleotídeos (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; DENICOLA *et al.*, 2015; CLOER *et al.*, 2019).

NRF2 nuclear, como descrito logo acima, se liga ao ARE na região promotora de diversos genes antioxidantes e de detoxificação, atuando como um fator de transcrição de *TXNRD1*, sulfiredoxina (*SRXN1*), hemoxigenase-1 (*HMOX1*), NADPH quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*), genes da síntese de GSH (*GCLC/GCLM*) e GSH-S-Transferases (*GSTT1* e *GSTM1*), melhorando a maquinaria de detoxificação celular (NGUYEN *et al.*, 2003; LI; PAONESSA; ZHANG, 2012; ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; LEVY; FORMAN, 2010; MAHAFFEY *et al.*, 2009). Sendo demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Via KEAP1/NRF2 Sob Condições Basais e Condições de Estresse Oxidativo



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Quando em homeostase, NRF2 é constantemente degradado pela via ubiquitina-proteossoma de maneira dependente de KEAP1, mas, em situações de estresse oxidativo/eletrofílico ou em casos de mutações nessa via, não há degradação de NRF2 e o mesmo se transloca para o núcleo, atuando como um fator de transcrição de genes antioxidantes e citoprotetores alvo. Esses genes estão envolvidos na eliminação de ERO (*TXNRD1*), síntese e família de genes de GSH e glutatona s-transferase (*GCLC*, *GCLM*, *GST*), detoxificação de xenobióticos (*NQO1*), dentre outros.

1.3.1 Estresse Oxidativo e o Tecido Pulmonar: Porque é importante entendermos essa relação?

Estresse oxidativo é um *status* biológico em que ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e radicais livres e a capacidade de neutralização destes pelas defesas antioxidantes. As espécies reativas são moléculas instáveis e que facilmente reagem com outra molécula dentro de uma célula, sendo capazes de gerar danos, já os radicais livres, são definidos como qualquer molécula capaz de permanecer com um ou mais elétrons desemparelhados dentro de sua última camada eletrônica, sendo altamente instáveis e reativos (SIES; JONES, 2020).

O tecido pulmonar está fisiologicamente exposto e adaptado a altos níveis de

oxigênio que, por sua vez, podem produzir ERO e estresse oxidativo. Ademais, é sabido que o dano induzido por oxidantes é exacerbado em fumantes de tabaco, cujas defesas antioxidantes e de detoxificação de drogas no pulmão estão sob um desafio adicional de compostos eletrofílicos exógenos e carcinógenos (MÜLLER; HENGSTERMANN, 2012). Foi identificado que pessoas que fazem o uso constante de tabaco possuem mais estresse oxidativo e aumento constante de NRF2 (SCHAFER; BUETTNER, 2001). A exposição à fumaça do tabaco não apenas é capaz de esgotar a GSH intracelular, mas também, é capaz de comprometer (por meios diretos e indiretos) os *pools* de outros componentes redox-ativos, como a TXN e NADPH, geralmente resultando em potenciais redox celulares significativamente elevados (SCHAFER; BUETTNER, 2001). Para se proteger do dano induzido por ERO, as células desenvolveram sistemas de defesa antioxidante multifacetados, como a GSH/GPx/GR, TXN/TXNRD1 e as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD1/SOD2) e catalase, entre outras (NORDBERG; ARNÉR, 2001; ARNÉR; HOLMGREN, 2000; CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015).

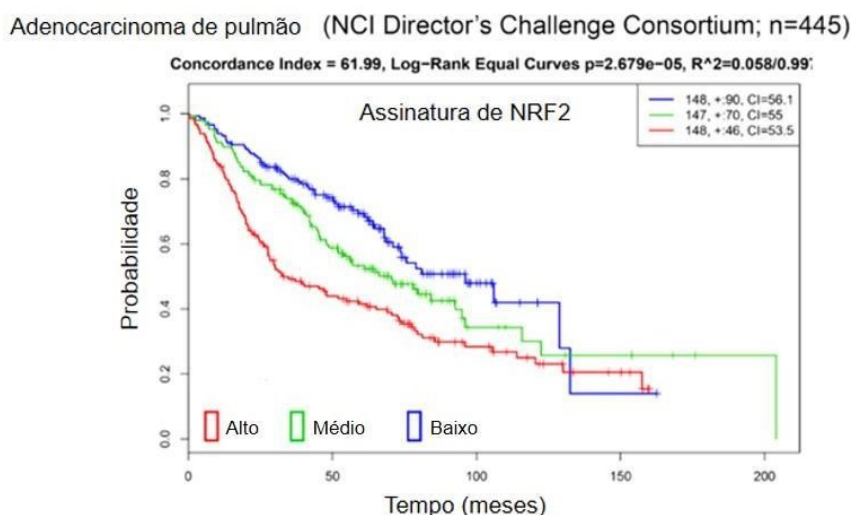
O par TXN/TXNRD1 é um modulador importante da homeostase redox da proteína, mas também exerce uma série de funções regulatórias redox adicionais. A TXN reduz e, portanto, suporta a atividade de peroxirredoxinas e metionina sulfóxido redutase (BJÖRNSTEDT *et al.*, 1995), regenera resíduos de ditiol na ribonucleotídeo redutase e modula fatores de transcrição regulados por redox, como NFκB e AP-1 (MATTHEWS *et al.*, 1992; BANNISTER; COOK; KOUZARIDES, 1991; ERIKSSON *et al.*, 2009). Para sua função enzimática como uma dissulfeto redutase, TXN deve ser reduzida pela selenoenzima TXNRD1, que catalisa a redução dependente de NADPH do sítio dissulfeto ativo de TXN a um ditiol (DAI *et al.*, 2013; OMATA *et al.*, 2006; URIG; BECKER, 2006; YAN *et al.*, 2019).

De modo geral, está descrito que as funções biológicas das ERO parecem ser dependentes do estágio tumoral. Nos estágios pré-cancerosos e neoplásicos precoces, a atividade antioxidante diminui e o acúmulo de ERO intracelular leva a danos oxidativos no DNA e mutações em pró-oncogenes e genes supressores de tumor, promovendo a progressão do câncer. Já nos estágios finais da progressão do câncer, há o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e o *pool* intracelular de NADPH e GSH (ASSI, 2017; ZHAO *et al.*, 2017). Desse modo, é provável que os antioxidantes sejam capazes de ajudar as células tumorais a escapar da apoptose nos estágios finais do câncer. Por isso, o uso de antioxidantes é proibido em pacientes

com câncer em estágio avançado e/ou em radioterapia (LV *et al.*, 2018).

O elevado nível de ERO intrínseco persistente em células cancerígenas é capaz de aumentar a capacidade antioxidante intracelular, a qual pode ser conferida por NRF2, GSH e TXN em grande parte, tornando-se resistentes ao estresse oxidativo e conferindo um fenótipo de resistência à agentes quimioterápicos (Figura 7), pois o NRF2 induzido pelo agente alquilador bloqueia a apoptose mediada pelo estresse do retículo endoplasmático via controle de *pools* de GSH e TXN (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009; BJELAKOVIC *et al.*, 2007; PIÑERO *et al.*; 2021).

Figura 7 – Alta Assinatura de NRF2 Confere uma Taxa de Menor Sobrevida em Pacientes com LUAD



Fonte: Adaptado de ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016.

Legenda: Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da regulação positiva da assinatura da expressão da via NRF2 alto (linha na cor vermelho), médio (linha na cor verde) ou regulação negativa (linha na cor azul) na sobrevida de pacientes com adenocarcinoma de pulmão, conforme determinado pela ferramenta *SurvExpress*. Neste gráfico vemos que, quanto mais ativada a via de NRF2, menor a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma pulmonar.

A assinatura de um gene refere-se ao padrão de expressão ou atividade desse gene em uma determinada condição biológica, seja em uma célula normal ou em uma célula cancerígena. Ou seja, é um conjunto de características que identificam a função ou a atividade desse gene em um determinado contexto. No caso específico da assinatura de NRF2 em LUAD, em uma condição de alta assinatura, temos que esse gene está altamente expresso ou ativado nas células cancerígenas do pulmão, o que pode levar a implicações para a resposta ao tratamento e prognóstico do paciente (SINGH *et al.*, 2016).

1.4 Farmacologia das Neoplasias Pulmonares

O início do desenvolvimento das drogas alquilantes remete à Primeira Guerra Mundial. Com a liberação do gás mostarda durante a guerra nos expostos, além de causar queimaduras na pele, olhos, mucosa e nos pulmões, foi relatado que as pessoas expostas tinham aplasia medular e do tecido linfóide, e casos de ulceração do trato gastrointestinal. Cerca de 20 anos após esse ocorrido, em 1942, Louis Goodman e Alfred Gilman demonstraram a atividade do gás mostarda (mostarda nitrogenada) contra linfomas em camundongos. Ademais, estudos clínicos em pacientes com linfoma tratados com mostarda nitrogenada, por administração intravenosa, iniciaram a era moderna da quimioterapia do câncer, porém o seu uso não teve sucesso devido a alta taxa de toxicidade (GOODMAN *et al.*, 1946).

Nos estágios precoces dessa doença a cirurgia é a primeira escolha para a retirada do tumor maligno. Em estágios avançados ou metastáticos, as terapias multimodais permanecem como norma, mesmo levando a benefícios paliativos a partir da quimioterapia (QT) (NOVELLO *et al.*, 2016). O uso da QT paliativa teve início na década de 70, com regimes que não geraram impacto na sobrevida global, entretanto, com o surgimento da cisplatina, começaram a demonstrar os benefícios da QT baseada em agentes alquilantes (a base de platina) como um tratamento de primeira escolha para os pacientes com câncer de pulmão avançado, sendo reportado pela primeira vez em um ensaio clínico publicado em 1988 (NOVELLO *et al.*, 2016).

A cisplatina é uma substância inorgânica antineoplásica e sua atuação biológica está relacionada à interação com o DNA, de modo a inibir a replicação do mesmo, bloqueando a replicação do RNA polimerase II, levando à apoptose (NOVELLO *et al.*, 2016; EL-KHATEEB *et al.*, 1999). Sua estrutura é reconhecida como uma espécie altamente reativa, a qual pode interagir com a GSH e levar a sua própria inativação. Estudos demonstrando a eficácia no tratamento por meio de agentes alquilantes trouxeram que a QT baseada em cisplatina foi associada com uma taxa de sobrevivência de um ano e, a partir disso, agentes alquilantes começaram a ser associados com outros medicamentos com o intuito de melhorar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, embora tenha sido demonstrado que a combinação desses agentes normalmente possui maior nível de toxicidade (NOVELLO *et al.*, 2016; EL-KHATEEB *et al.*, 1999; SIDDIK, 2003).

O tratamento desses pacientes frequentemente envolve a administração de QT combinada com radioterapia torácica. Idealmente, a radioterapia é iniciada dentro dos primeiros trinta dias de QT. Após a conclusão de cerca de quatro ciclos de QT (Tabela 1), pacientes que apresentam resposta parcial ou completa podem receber radioterapia cerebral, conhecida como radioterapia profilática do crânio (PCI). O objetivo dessa radioterapia é reduzir a incidência de metástases cerebrais, com impacto positivo na sobrevida dos pacientes. No caso de metástases presentes, o tratamento deve ser voltado para o controle da doença e melhora da qualidade de vida. Nesses casos, a radioterapia é geralmente administrada apenas em conjunto com a QT ou com a QT associada a imunoterápicos. Normalmente, o paciente passa por quatro a seis ciclos de QT associada a imunoterapia, seguidos pela imunoterapia de manutenção. É importante ressaltar que, infelizmente, a parcela de pacientes com acesso à imunoterapia ainda é baixa. Geralmente, o acesso ocorre por meio de requisição judicial ou através da pesquisa clínica (NOVELLO *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Medicamentos Utilizados como Tratamento de Primeira Escolha no CPCNP

Cisplatina e Associações	
Cisplatina 40 - 75mg/m ²	Vinorelbina 25mg/m ²
	Gencitabina 1000mg/m ²
	Docetaxel 75mg/m ²

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Faz-se o uso de Cisplatina 50mg/m² em associação com Vinorelbina 25mg/m²; Cisplatina 40mg/m² com Gencitabina 1000mg/m² ou Cisplatina 75mg/m² com Docetaxel 75mg/m², todos administrados por via endovenosa.

Não obtendo sucesso, utilizam-se outros agentes voltados às terapias alvo, como: o uso de Afatinibe, Erlotinibe, Gefitinibe e Necitumumabe, o qual inibe a fosforilação intracelular do receptor HER1/EGFR (SIDDIK, 2003; GAINOR *et al.*, 2016). Alectinibe, Brigatinibe, Ceritinibe e Crizotinibe, com alvo em células com alterações no gene *ALK*; Dabrafenibe e Trametinibe com alvo em células com mutações em *BRAF*, Sotorasibe (SKOULIDIS *et al.*, 2021) com alvo em *KRAS* mutado, aprovado pela ANVISA em 2022. Pemetrexede, um antifolato com capacidade de inibir várias enzimas-chave dependentes de folato envolvidas na biossíntese de ácidos nucleicos (SCHAER *et al.*, 2019), imunoterápicos, com anticorpos monoclonais anti-PD1 (Nivolumabe e Pembrolizumabe) e anti-PDL1 (Atezolizumabe, Avelumabe e Durvalumabe). Temos também o Trastuzumabe Deruxtecane, um anticorpo

conjugado composto por um anticorpo monoclonal específico para *HER2* com um potente inibidor de topoisomerase I como droga citotóxica (MODI *et al.*, 2020), também utilizado em pacientes com CPCNP (Quadro 2) (GAINOR *et al.*, 2016; MARCAR *et al.*, 2019).

Quadro 2 – Agentes Terapêuticos Alvo em Diferentes Vias de Sinalização e Mutações Genéticas em CPCNP

Terapia Alvo	Alvo Molecular	Ação Terapêutica	Medicamentos
ALK	Células com mutações em <i>ALK</i>	Inibição da atividade da proteína ALK	Alectinibe, Ceritinibe, Crizotinibe
Antifolato	Enzimas chave dependentes de folato	Inibição da síntese de DNA e RNA	Pemetrexede
BRAF	Células com mutações em <i>BRAF</i>	Inibição da atividade da proteína BRAF	Dabrafenibe, Trametinibe
HER1/EGFR	Fosforilação intracelular do receptor HER1/EGFR	Inibição da atividade do receptor HER1/EGFR	Afatinibe, Erlotinibe, Gefitinibe
HER2	Anticorpo monoclonal específico para <i>HER2</i> com inibidor de topoisomerase I	Inibição da atividade do receptor HER2	Trastuzumabe, Deruxtecan
Imunoterapia	<i>PD1</i> e <i>PDL1</i>	Ativação do sistema imunológico	Nivolumabe, Pembrolizumabe, Durvalumabe
KRAS	Células com mutações em <i>KRAS</i>	Inibição da atividade da proteína KRAS	Sotorasibe

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Estratégias modernas de farmacogenômica permitem a reconsideração de alvos conhecidos, com base em abordagens de medicina de precisão. Estas incluem o uso de biópsias líquidas como ferramenta para caracterizar o genoma do câncer, detectar alvos e monitorar as mudanças dinâmicas ocorrendo sob pressão de seleção de medicamentos.

De acordo com a 8ª edição da Classificação do Estágio de Câncer de Pulmão, 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 QT adjuvante (pós-operatória), quando o tamanho do tumor é maior que 4 cm. Pacientes IIA e IIB são encaminhados para ressecção cirúrgica seguida de QT adjuvante. Pacientes IIIA e IIIB são direcionados para tratamento multimodal, geralmente envolvendo QT e

radioterapia, sendo que em IIIA 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, sendo a principal finalidade o controle da doença, mantendo a qualidade de vida do paciente (ZHU *et al.*, 2017).

1.5 Fármacos que atuam no Sistema Redox: Possíveis Estratégias de Tratamento para Pacientes com CPCNP e demais Tipos de Câncer

Iniciando pelos inibidores da via de TXNRD1, temos como principal a Auranofina (AUR), um composto contendo ouro lipofílico oral capaz de inibir a TXNRD1 interagindo com o seu local de atividade redox (HU *et al.*, 2018). A AUR é um medicamento considerado para o uso em associação na QT devido à sua capacidade de prejudicar a homeostase redox nas células tumorais. De modo geral, apesar de ser um medicamento anti-inflamatório estabelecido, parece oferecer vantagens no contexto da terapia contra o câncer pró-oxidante (HU *et al.*, 2018; HOU *et al.*, 2018). Recentemente, os efeitos antitumorais da AUR foram explorados com mais detalhes em modelos pré-clínicos, uma vez que é um medicamento seguro para pacientes com câncer. Foram obtidos resultados no qual a AUR induziu toxicidade em células humanas de leucemia crônica e câncer gástrico devido ao estresse do retículo endoplasmático e à disfunção mitocondrial, acompanhada da superprodução de ERO (FISKUS *et al.*, 2014). Este efeito poderia ser potencializado por outros indutores de ERO, resultando no aumento de apoptose em células tumorais e em uma inibição significativa do crescimento de xenoinxertos tumorais. Ao lado de um efeito antitumoral direto, a AUR foi capaz de suprimir o crescimento de metástases pulmonares em um modelo de osteossarcoma humano em camundongos *nude*, e a inibição do fenótipo metastático foi explicada devido a apoptose dependente de ERO (FISKUS *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2015).

Em relação aos inibidores da via de NRF2, o Brusatol, descrito em 1968 (SIM; SIMS; GEISSMAN, 1968; CAI *et al.*, 2019), foi inicialmente avaliado como uma terapia experimental para a leucemia linfocítica, entretanto, ainda há muitos argumentos sobre o seu mecanismo de ação e a sua especificidade, o que limita os futuros desenvolvimentos e procedimentos deste composto na prática clínica (SIM; SIMS; GEISSMAN, 1968; CAI *et al.*, 2019). Com essas limitações, em 2018, um grupo de pesquisadores buscou descobrir novos inibidores de NRF2 para a terapia direcionada

(SINGH *et al.*, 2016). Eles realizaram uma triagem quantitativa de alto rendimento usando um conjunto diversificado da *Molecular Libraries Small Molecule Repository Library* (MLSMR) de aproximadamente 400.000 mil pequenas moléculas, destas, foi identificado o ML-385 como uma molécula que se liga ao NRF2 e inibe a expressão do gene alvo, mais especificamente, essa molécula é capaz de se ligar ao domínio Neh1, interferindo com a ligação no complexo de pequenas proteínas Maf_s (fibrosarcoma musculoaponeurótico) no núcleo, impedindo a expressão de genes na região promotora ARE. Lembrando que, o NRF2 é um fator de transcrição do tipo zíper de leucina básico (bZip), pertencente à família cap-n-colar e, a região básica, logo acima do zíper de leucina, é a responsável pela interação dos fatores de transcrição com o DNA. O ML-385 demonstrou especificidade e seletividade nas células A549 e em modelos pré-clínicos de CPCNP com ganho de função de NRF2 (SINGH *et al.*, 2016; NITURE *et al.*, 2010). Entretanto, ainda é uma molécula que necessita de mais estudos.

Outra via importante de estudo, mas apenas para fins de estudo do mecanismo celular, é a via da GSH, sendo o inibidor utilizado o L-Butionina Sulfoximina (BSO). Este composto é um inibidor irreversível e específico da gama-glutamylcisteína sintetase, ocasionando apoptose induzida por radicais livres. É considerado um agente anticancerígeno, comumente utilizado em trabalhos *in vitro* na área do câncer, sabendo que a inibição da GSH é incompatível com a vida (LI *et al.*, 2016). Alguns trabalhos demonstraram que a resistência a drogas citotóxicas como paclitaxel, gencitabina e cisplatina correlaciona-se diretamente com a capacidade antioxidante total das células que poderiam ser sensibilizadas com BSO (SHAPEK *et al.*, 1988; CLARK *et al.*, 2015; MAEDA *et al.*, 2004).

Pensando novamente em alguma estratégia de uso clínico, especialmente para os casos de CPCNP com mutação na via de NRF2, cresce cada vez mais o interesse em inibidores do sistema xCT, visto que temos inibidores clinicamente validados. O xCT está localizado na membrana plasmática das células, é dependente de cloreto (Cl⁻) e independente de sódio (Na⁺), tendo como função a captação de cistina extracelular em troca do glutamato intracelular (BANNAI, 1986). A cistina intracelular importada através do sistema xCT é a fonte predominante de cisteína na maioria das células cancerígenas (ZHU *et al.*, 2019). Dentre os fármacos utilizados temos o Sorafenibe (SRFN) e a Erastina. O SRFN é uma pequena molécula que atua como inibidor de múltiplas quinases de amplo espectro *in vitro*, interrompendo a sinalização

de RAS-MAPK e do Fator de crescimento endotelial vascular, e que está sendo utilizado no tratamento de tumores de cólon, rim, pulmão e mama em modelos de xenoenxerto, inibindo a proliferação e a angiogênese (ADNANE *et al.*, 2006; WILHELM *et al.*, 2004). Atualmente, o SRFN é aprovado pelo FDA para uso no tratamento clínico do carcinoma hepatocelular irressecável, carcinoma de células renais avançado, carcinoma de tireóide localmente recorrente ou metastático, progressivo, diferenciado e refratário ao tratamento com iodo radioativo (FDA, 2018).

No campo da terapia direcionada em CPCNP, além das mutações já descritas, a ativação da via RAS/RAF/MEK/ERK via mutações ativadoras em *KRAS*, ocorre principalmente em LUAD (GÖTZ, 2008; CHAN; HUGHES, 2015), e uma vez que a inibição direta de *KRAS* é recente na clínica, uma abordagem alternativa seria voltar os olhares para os mecanismos de inibição da atividade do sistema xCT, resultando em uma redução de GSH e no acúmulo de ERO lipídico, induzindo a morte celular por ferroptose (WILHELM *et al.*, 2006; DIXON *et al.*, 2012).

Em um estudo feito por Dixon e colaboradores, a Erastina causou morte celular com diferentes características morfológicas, bioquímicas e genéticas em células tumorais mutantes *KRAS*, com isso, eles foram capazes de caracterizar e definir uma nova forma de morte celular não apoptótica dependente de ferro, sendo chamada de ferroptose (DIXON *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2020). Porém, até o momento, os efeitos dos indutores de ferroptose no CPCNP, particularmente em pacientes com falha no tratamento aos compostos de platina, ainda estão em fase pré-clínica (LI *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços nas terapias-alvo, uma parcela significativa de pacientes com mutações na via NRF2 ainda não possui um tratamento específico. Assim sendo, é fundamental a realização de pesquisas direcionadas para a compreensão de como sensibilizar esses tumores e “quebrar” a resistência quimioterápica prevalente em tumores *KEAP1* mutados.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de pulmão é um dos maiores desafios da medicina moderna, e sua prevalência crescente representa um enorme obstáculo para a saúde pública. Apesar dos avanços na terapia do câncer, o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) é agressivo e possui prognóstico reservado, sendo a taxa de sobrevida desses pacientes de 5% em 5 anos, quando em estágio III e IV. Ao receber o diagnóstico, geralmente a doença já está em nível metastático e responde mal aos medicamentos atualmente disponíveis. Com ajuda de análises moleculares de EGFR, ALK e PD1/PDL1, os pacientes podem ser tratados com inibidores dessas vias e com imunoterapia, porém, por mecanismos ainda desconhecidos, acabam gerando resistência ao tratamento. Por isso, a identificação de novos marcadores prognósticos e assinaturas gênicas específicas para o CPCNP podem ajudar a aumentar as taxas de sobrevida e a melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Estudos mais recentes destacam a associação de mutações em *NFE2L2/KEAP1* e superexpressão de genes-alvo de NRF2 com uma má resposta aos quimioterápicos e uma menor sobrevida livre de progressão e sobrevida global nesses pacientes.

3 HIPÓTESE

A hipótese que guiou esta tese é que a alta expressão/conteúdo de *TXNRD1* está associada a uma via hiperativada de NRF2 em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, e que a TXNRD1 pode ser um preditor de desfechos de sobrevida na doença. Ainda, a TXNRD1 pode ser um possível alvo terapêutico para bloqueio farmacológico e inibição seletiva do crescimento de tumores com mutação na via de NRF2.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Determinar a associação entre a expressão de TXNRD1 e o grau de ativação da via de NRF2 e os desfechos de sobrevida em pacientes, e o potencial farmacológico da inibição da TXNRD1 em câncer de pulmão de células não pequenas.

4.2 ESPECÍFICO

1. Avaliar um conjunto de genes relacionados ao estresse oxidativo e o valor do prognóstico dos genes antioxidantes na sobrevida global (OS) de pacientes com CPCNP;
2. Avaliar dados demográficos e clinicopatológicos em uma coorte de pacientes com CPCNP;
3. Avaliar dados de DFS (sobrevida livre de doença) e DMFS (sobrevida livre de metástase) de uma coorte de pacientes CPCNP;
4. Avaliar os desfechos *endpoints* de sobrevida e análise de dados de uma coorte de pacientes com CPCNP;
5. Avaliar os efeitos de inibidores-alvo na viabilidade, imunoconteúdo, formação de colônias e capacidade de migração de linhagens celulares de câncer de pulmão;
6. Avaliar os efeitos da inibição genética e farmacológica de NRF2 em linhagem celular *KEAP1* mutante;
7. Avaliar os níveis de GSH nas linhagens celulares de câncer de pulmão.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Valor Prognóstico dos Genes Antioxidantes no Câncer de Pulmão

O valor prognóstico de genes antioxidantes na sobrevida global (OS) de pacientes com câncer de pulmão foi analisado usando o servidor web OSluca (*Online consensus Survival for Lung Cancer*) (<http://bioinfo.henu.edu.cn/LUCA/LUCAList.jsp>) (YAN *et al.*, 2020). Através do OSluca foi feita a coleta de 35 conjuntos de dados de câncer de pulmão, como TCGA (2 conjuntos), GEO (32 conjuntos) e o estudo *Roepman* (1 conjunto), correspondentes a informações clínicas e de seguimento.

A lista de entrada incluiu 64 genes associados ao estresse oxidativo humano, sendo 58 relatados anteriormente por nosso grupo (GELAIN *et al.*, 2009) e 6 selecionados manualmente como segue: (CAT, ERP44, GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, LPO, MPO, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6, SOD1, SOD2, SOD3, GLRX, GLRX2, GLRX3, GLRX5, GSR, MSRA, MT1A, MT1B, MT1E, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MT2A, NME8, NME9, NXNL1, SELENOP, TXN, TXN2, SRXN1, TMX1, TMX3, TXNDC11, TXNDC12, TMX4, TMX2, TXNDC17, TXNDC2, TXNDC5, TXNDC8, TXNDC9, TXNIP, TXNL1, TXNL4A, TXNL4B, TXNRD1, TXNRD2, TXNRD3; sendo selecionados manualmente: NQO1, GCLC, GCLM, EPHX1, CBR1, CBR3) (GELAIN *et al.*, 2009).

O OSluca é um programa ou ferramenta que realiza uma análise comparativa entre as expressões de genes. Mais especificamente, ele compara as expressões de genes que estão acima de 25% com os outros 75% de genes restantes. O resultado dessa análise é apresentado em um formato visual chamado *forest plot* e também em uma tabela de sobrevida da regressão proporcional de Cox. Essa tabela contém informações relevantes para cada conjunto e combinação de conjuntos de genes analisados. Essas informações incluem a Razão de Risco (HR), que indica a probabilidade relativa de um evento ocorrer, como a sobrevida ou mortalidade; o intervalo de confiança de 95% (CI 95%), que indica a precisão da estimativa da Razão de Risco; e o valor de p, que representa a significância estatística do resultado. Para facilitar a interpretação dos resultados, os escores combinados de HR de cada gene foram calculados e classificados. Esses escores combinados podem ser encontrados na Tabela Suplementar 1 (Apêndice A).

Para visualizar as interações de proteínas/gene antioxidantes, uma rede de

interação de proteínas foi gerada usando o banco de dados *STRING* (<https://string-db.org>) e os seguintes parâmetros: i) entrada: símbolo de genes antioxidantes; ii) métodos de previsão: experimentos, bancos de dados, fusão de genes, *text-mining*, *neighborhood* e coocorrência; iii) nível de confiança do escore de interação de 0,400 (média). A espessura da linha indica a força do suporte de dados (confiança).

5.2 Coorte de Pacientes com Câncer de Pulmão

Este estudo observacional de uma coorte hospitalar incluiu 65 pacientes diagnosticados com carcinoma de pulmão de células não pequenas (adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas) entre 2017 e 2019, tratados no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), Passo Fundo, RS, Brasil.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, com estadiamento tumoral (TNM) I, II, III ou IV, e escore ECOGPS de 0 - 1 no diagnóstico. Amostras de tecido pulmonar fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) foram obtidas de cada paciente a partir do serviço de patologia do HSVP. Os pacientes foram divididos em escore baixo *versus* alto de TXNRD1 na imunohistoquímica (IHC) em amostras de tumor de pulmão. Os dados demográficos e clinicopatológicos foram coletados por revisão dos prontuários médicos eletrônicos dos pacientes no banco de dados hospitalar (Tasy, *Philips Healthcare*).

Os prontuários foram revisados desde o diagnóstico até 12/2020 (mês/ano), com um período de acompanhamento de 24 a 45 meses (mín-máx). Todos os aspectos relacionados à ética em pesquisa com seres humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (CEP-UFRGS), protocolo #CAAE 83271317.1.00005347. A análise histológica foi rotineiramente realizada para a classificação e diferenciação dos tumores em LUAD e LUSC. Em alguns casos, a análise por IHC de p63, TTF1, CK5/6 e CK7 foi realizada para confirmar o subtipo histológico. O estadiamento da doença foi realizado de acordo com a 8ª edição da classificação TNM para estadiamento do câncer de pulmão (LABABEDE; MEZIANE, 2018). O acompanhamento usual incluía exame físico, avaliação de marcadores séricos e radiografia de tórax ou tomografia de tórax-abdômen a cada 3 – 6 meses por 3 anos, e então, a cada 6 meses por 2 anos. As tomografias por PET foram realizadas apenas quando houve suspeita de recorrência da doença.

5.3 Desfechos *Endpoints* de Sobrevida e Análise de Dados

A OS foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico e a data do óbito por qualquer causa ou a última data de acompanhamento. Os pacientes ainda vivos na última visita foram censurados como a data do último acompanhamento. A DFS (sobrevida livre de doença) em pacientes submetidos à cirurgia/lobectomia foi definida como o tempo da cirurgia até o primeiro evento (recorrência locorregional ou a distância ou a morte por qualquer causa). A DMFS (sobrevida livre de metástase) em pacientes submetidos à cirurgia/lobectomia foi definida como o tempo da cirurgia até o primeiro evento (recorrência a distância ou morte por qualquer causa) (BONNETAIN *et al.*, 2014). A data de recidiva foi a data da primeira observação da nova lesão. A PFS (sobrevida livre de progressão) em pacientes com doença irresssecável foi definida como o tempo do diagnóstico até o primeiro evento de progressão locorregional ou a distância (doença progressiva diagnosticada radiologicamente) de acordo com os critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (RECIST 1.1) (recist.eortc.org/), ou morte (MAUGUEN *et al.*, 2013).

Os pacientes foram dicotomizados em grupos de escore alto *versus* baixo de TXNRD1. Nós usamos o teste qui-quadrado de Pearson (ou exato de Fisher para amostras pequenas) para comparação estatística da associação entre variáveis categóricas e o escore de TXNRD1. O impacto dos níveis de TXNRD1 (escore alto *versus* baixo) e outras variáveis demográficas e de doença em DFS, DMFS, PFS e OS foram calculados de acordo com o método de Kaplan-Meier e teste log-rank. O modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox foi usado para analisar o efeito dos fatores de risco nos desfechos de sobrevida, calculando a razão de risco (HR) e intervalos de confiança de 95% (CI 95%). As covariáveis foram dicotomizadas, e o método *stepwise* para inserir variáveis no modelo de Cox foi selecionado. As análises estatísticas foram realizadas com o pacote de *software MedCalc* (www.medcalc.org). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.4 Imunohistoquímica (IHC)

Os tecidos tumorais de pulmão FFPE foram cortados em seções de 5 µm de espessura (Micrótomo Leica RM2255, Leica Biosystems) e montados em lâminas de microscopia silanizadas. As lâminas foram incubadas por 40 minutos a 50°C e, em

seguida, por 10 minutos a 60°C, seguido por xileno (3x, 7 minutos), gradiente de etanol (100°, 95° e 70°; 7 minutos) e água destilada (3x, 5 minutos) para desparafinização e hidratação das seções tumorais.

Para a recuperação de epítomos, foram comparados quatro métodos de recuperação de antígeno: tampões de citrato de sódio (10 mM de citrato de sódio, 0,05% *Tween* 20, pH 6,0) ou Tris-EDTA (10 mM de Tris Base, 1 mM de solução de EDTA, 0,05% *Tween* 20, pH 9,0) combinados com fervura ou aquecimento por micro-ondas (95°C por 20 minutos). A permeabilização do tecido foi realizada com 0,2% de Triton-X100 em PBS por 10 minutos. As proteínas foram bloqueadas em 10% de soro de cabra contendo 1% de BSA em TTBS por 40 minutos à temperatura ambiente e lavadas três vezes (2 minutos cada) com tampão TTBS.

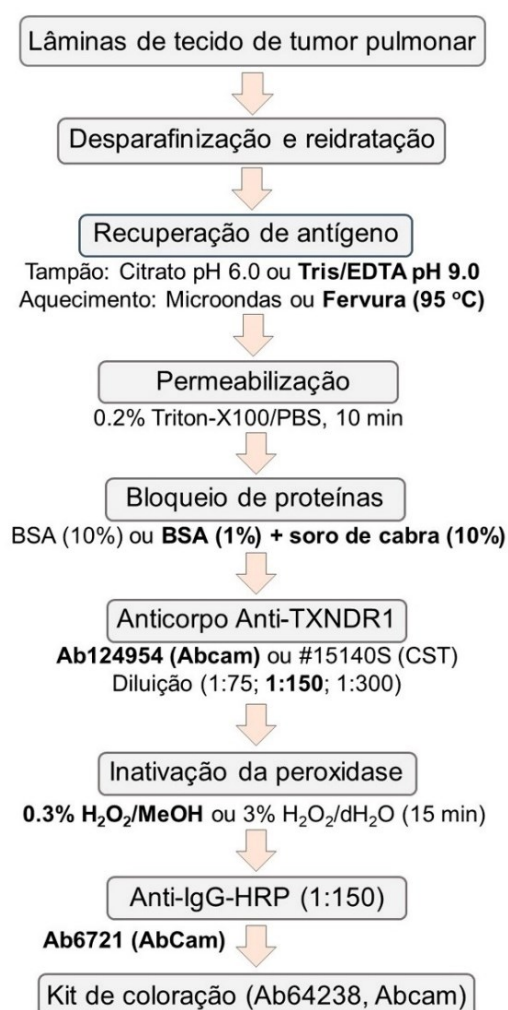
Dois anticorpos monoclonais primários anti-TXNRD1 foram comparados – o anticorpo anti-TXNRD1 recombinante [EPNCIR129] (Ab124954) da Abcam e o TRXR1 (D1T3D) *Rabbit mAb* #15140 da *Cell Signaling Technology* – na diluição de 1:75, 1:150 e 1:300 em 1% BSA/TTBS por 16 horas em uma câmara umidificada a 4°C. As amostras foram lavadas 3 vezes em TTBS (5 minutos) e a atividade da peroxidase endógena foi inibida com 0,3% de H₂O₂ em metanol ou 3% de H₂O₂ em dH₂O por 15 minutos. As amostras foram enxaguadas 3 vezes em TTBS (5 minutos) e incubadas com anticorpo anti-IgG HRP conjugado (1:150, Ab6721, Abcam) durante 40 minutos à temperatura ambiente (23 ± 1°C). As lâminas foram reveladas usando o DAB *Substrate Kit* (ab64238) (Abcam) de acordo com as instruções do fabricante, incubadas com o Kit por 4 minutos, e contrastadas com hematoxilina de Mayer por 3 minutos. Após, as lâminas foram montadas com Entellan (*Merck Millipore*).

O controle negativo correspondente foi realizado para cada amostra, seguindo o mesmo protocolo (Figura 8), com a exclusão do anticorpo primário. Entre os diferentes métodos comparados, aqueles com a melhor *signal-to-background* (ou seja, coloração de TXNRD1 *versus* controle negativo correspondente) foram selecionados. Cinco campos por amostra foram fotografados no microscópio Olympus BX41 (Japão) em um aumento de 200x. As células de câncer de pulmão A549 KEAP1 mutantes foram preparadas e centrifugadas no Cytospin e usadas como controle positivo para níveis altos de TXNRD1 (Figura Suplementar 1 – Apêndice A).

A intensidade da coloração foi avaliada por três pesquisadores independentes e anotada manualmente em uma escala de 4 graus: negativa (0), fraca (1+), moderada (2+) e forte (3+). A fração de células tumorais coradas foi pontuada da seguinte forma:

sem células positivas (0), 1% a 5% (1), 6% a 25% (2), 26% a 75% (3) e 76% a 100% (4). Cinco campos por amostra foram avaliados, a média das pontuações ordinais de intensidade e fração de células tumorais coradas foram multiplicadas, obtendo valores na faixa de 0 a 12. Essa escore foi posteriormente dicotomizada (baixo_TXNRD1: 0-8, alto_TXNRD1: 9-12).

Figura 8 – Validação do Protocolo de IHC para Coloração de TXNRD1 em Tecidos de Câncer de Pulmão e Linhagem Celular A549



Fonte: Adaptado de: DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: Representação das variáveis avaliadas durante a etapa de validação do protocolo de IHC para coloração de TXNRD1 em seções de tumor de pulmão e coloração de controle positivo da linhagem celular A549. Os métodos implementados no protocolo final estão destacados em negrito.

Para a IHC de NRF2, as amostras presente nas lâminas foram desparafinizadas e hidratadas, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água (H1009, Sigma). A recuperação antigênica foi realizada fervendo as seções em tampão EDTA (pH 8,0) por 40 minutos,

seguida de um resfriamento por 20 minutos. As amostras presente nas lâminas foram então bloqueadas com um bloqueio de avidina/biotina (*Vector Laboratories*) com 10% de soro de cabra, e incubadas durante a noite a 4°C em uma câmara umidificada com anticorpo anti-NRF2 (Abcam; ab31163) diluído em solução de bloqueio, seguido de uma incubação de 60 minutos com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (*Kit Impress Vector; Vector Laboratories, CA*).

As lâminas foram então coradas com DAB (5 minutos), contracoradas com hematoxilina de Mayer (1 minuto), lavadas com água e montadas usando o meio de montagem *PermOUNT*. As imagens foram capturadas em um Sistema de Digitalização de Lâminas Digitais Motic, com aumento de 100x. Cinco campos por amostra foram avaliados, e a intensidade de coloração e a porcentagem de células com NRF2 nuclear foram pontuadas usando o mesmo método aplicado para a IHC de TXNRD1 (descrita acima). Um escore maior ou igual a 4 foi considerada como "NRF2-Alto", o que está de acordo com os valores de corte utilizados em estudos anteriores (WANG *et al.*, 2020).

5.5 Análises de Bioinformática

Obtivemos matrizes de expressão de contagem a partir de experimentos de RNA-seq e metadados de um painel de linhagens celulares cancerígenas nos conjuntos de dados E-MTAB-2706 e *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), utilizando o pacote *ExpressionAtlas* R e portals.broadinstitute.org/ccle/data (matriz de expressão de contagem 20180929 e metadados - anotações de linhagem celular 20181226), respectivamente. O estado mutacional de *KEAP1* e *NFE2L2* das linhagens celulares foi obtido do *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

Para amostras de tumor humano, i) Matrizes de expressão gênica obtidas com a ferramenta HTSeq para análise de dados de RNA-seq, ii) Tabelas de presença de mutação somática obtidas com o *pipeline* de chamada de variantes somáticas MuSE, iii) Alteração do número de cópias a nível de gene obtida com o GISTIC2 (categorizados como genes "ganho" (+1), "perda" (-1) ou "neutro" (0) com valores focais de CNV maiores que +0,3, menores que -0,3 e entre -0,3 e +0,3, respectivamente) de mais de 11.000 tumores de 33 tipos de câncer no TCGA foram baixados do GDC Xena Hub (gdc.xenahubs.net). Com os dados de sequenciamento

de RNA, o método de normalização TMM (média aparada de valores - *trim-mean of M-values*) foi utilizado para ajustar as diferenças de tamanho e composição das bibliotecas entre as amostras (ROBINSON; OSHLACK, 2010).

Essas contagens normalizadas pelo TMM foram usadas para análise de expressão diferencial e transformadas em *log-counts-per-million* ($\log_2(\text{cpm}+1)$) para análise *downstream* e representação gráfica usando funções disponíveis no pacote EdgeR (ROBINSON, M.D.; MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K., 2010). Os valores de IC₅₀ de auranofina em 129 linhagens celulares de câncer de pulmão foram derivados de uma publicação anterior (YAN *et al.*, 2019) e combinados com dados de sequenciamento de RNA dos conjuntos de dados E-MTAB-2706 e CCLE. Os dados normalizados de expressão gênica e mutação de linhagens celulares e tumores foram combinados e usados para estimar: i) análise de correlação de Pearson entre os níveis de mRNA de *TXNRD1* e genes de transcriptoma completo; ii) expressão de *TXNRD1* em diferentes tipos de tumor do TCGA e entre estágios TNM de tumores LUSC e LUAD do TCGA; iii) expressão de *TXNRD1* em mutantes *KEAP1*, *NFE2L2*, *TP53*, *KRAS*, *EGFR*, *STK11* e *PIK3CA* versus tumores de pulmão *wild-type* (WT) do TCGA; iv) expressão de *TXNRD1* em linhagens celulares de câncer de pulmão mutantes *KEAP1/NFE2L2* versus WT dos conjuntos de dados CCLE e E-MTAB-2706; v) expressão de *TXNRD1* em tumores com alta versus baixa assinatura/*regulon* NRF2; e vi) correlação de Pearson entre mRNA *TXNRD1* e assinatura/*regulon* NRF2.

Para calcular o escore da assinatura NRF2 em tumores de pulmão do TCGA, usamos um conjunto de genes reguladores NRF2 composto por 32 genes alvo regulados positivamente pelo NRF2 em diferentes tipos de tumores, conforme validado por Levings *et al.*, 2018, conforme segue: *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 calcular o escore da assinatura NRF2 por amostra, usamos o Z-escore médio derivado da expressão dos genes individuais incluídos no conjunto de genes NRF2. Os valores de expressão do gene *i* para a amostra *j* (*gij*) foram padronizados para o escore transformado *Zij*, no qual o gene *i* teve uma média de $\mu=0$ e desvio padrão (SD) de $\sigma = 1$ em todas as amostras/linhas. A média desses valores *Zij* individuais de cada gene na assinatura foram calculados para obtenção do escore da assinatura de NRF2 em cada amostra. Assim, para a assinatura NRF2 estar regulada

positiva ou negativamente em uma amostra/genótipo, é necessário que um número significativo de genes-alvo de NRF2 mude a expressão na mesma direção (aumento ou diminuição).

A análise de enriquecimento de vias (PEA) e análise de enriquecimento de fatores de transcrição (TFEA) foram realizadas utilizando a ferramenta web Enrichr (maayanlab.cloud/Enrichr) (KULESHOV *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2013). A lista genes de entrada consistiu nos top-50 (para PEA) e top-100 (para TFEA) símbolos de genes correlacionados com a expressão de TXNRD1 obtida a partir da análise de correlação de Pearson. Os bancos de dados BioPlanet 2019 (HUANG *et al.*, 2019) e ChEA2016 foram escolhidos para avaliar as vias e fatores de transcrição enriquecidos na lista de genes de entrada, respectivamente. Termos de vias/TF com valor p ajustado $<0,05$ foram selecionados.

Nós também analisamos dados públicos do *Cancer Dependency Map Consortium* (depmap.org) para determinar se nossos genes de interesse são importantes para a proliferação/sobrevivência de linhagens celulares de CPCNP. Os dados de Probabilidade de Dependência de *TXNRD1*, *NFE2L2* e *KEAP1* provenientes de um teste de *knockout* CRISPR/Cas9 foram baixados do Portal DepMap (depmap.org/portal; arquivo "CRISPR_gene_dependency.csv"; DepMap 21Q3 Public + Escore, *Chronos*; data de lançamento 08/21).

As Probabilidades de Dependência são calculadas para cada escore de gene em uma linhagem celular como a probabilidade de que um escore surja da distribuição de escores de genes *pan*-essenciais em vez de escore de genes não-essenciais. Uma linhagem celular é considerada dependente de um gene se tiver uma probabilidade de dependência igual ou maior que 0,5 ($dep \geq 0,5$) (BEHAN *et al.*, 2019; MEYERS *et al.*, 2017). Cerca de 94 linhagens celulares de CPCNP foram divididas com base no seu *status* mutacional *KEAP1* e *NFE2L2* (mutações *hotspot*, danosas e outras mutações não conservadoras *versus* WT), e a probabilidade de dependência de uma linhagem celular ao *knockout* de *TXNRD1*, *NFE2L2* e *KEAP1* foi examinada.

5.6 Cultivo Celular

A linhagem celular A549 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*) e com passagens por menos de 3 meses após o descongelamento. As células Calu3 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCJR; bcrj.org.br), Brasil. A

condição livre de micoplasma foi confirmada por PCR. As células foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle*) (Sigma-Aldrich; cat #D5796) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) mais 1x solução de antibiótico: antimicótico (Sigma-Aldrich; cat #A5955) em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram tratadas em 50 – 60% de confluência.

Soluções estoque de 50 mM de auranofina (Sigma-Aldrich; cat #106M4756V) em DMSO, 8 mM de cisplatina (Sigma-Aldrich) em água ultrapura e 100 mM de Trolox foram preparadas e armazenadas a -20°C. N-acetilcisteína (NAC) e butionina sulfoximina (BSO) foram dissolvidas em meio de cultura celular imediatamente antes dos tratamentos; ajustamos o pH da solução de NAC com NaOH. O ML-385 (Sigma-Aldrich; cat #SML1833) foi dissolvido em DMSO a 50 mM. As concentrações finais de NAC, BSO, Trolox e ML-385 foram de 7,5 mM, 50 µM, 100 µM e 10 µM, respectivamente. Os inibidores foram adicionados cerca de 30 minutos antes da incubação com auranofina ou cisplatina.

5.7 Ensaio de Viabilidade Celular

Nesse ensaio temos a redução de MTT (3-(4,5-dimetil)-2,5-difenil tetrazólio) por desidrogenases celular, sendo utilizado para estimar a viabilidade celular, que indica a atividade de desidrogenases mitocondriais em células viáveis. Ao final dos tratamentos, o meio de cultura foi retirado, e as células foram incubadas com meio de cultura contendo 0,5 mg/mL de MTT (100 µL) por 1 hora em uma incubadora de células umidificada. O meio foi então descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL DMSO. A absorbância foi medida em 560 – 630 nm (A₅₆₀-A₆₃₀) em um espectrofotômetro (Infinite M200 TECAN Multitreader), e os dados foram expressos como porcentagem (%) de viabilidade celular em comparação ao grupo controle tratado com DMSO/sem o inibidor (GONÇALVES *et al.*, 2021).

5.8 RNA de Interferência (siRNA)

O siRNA para *NFE2L2* humano 100 nM (sc-37030) e o controle negativo siRNA-A (AM4611) foram adquiridos na Santa Cruz *Biotechnology* e *Ambion* Inc, respectivamente. As transfecções foram realizadas usando o reagente lipofectamina 100 nM RNAiMAX (Invitrogen) seguindo protocolo padrão do fabricante. O

silenciamento de NRF2 foi confirmado em 24 horas após a transfecção por *Western Blot*, e o impacto na viabilidade celular foi verificado em 48 e/ou 72 horas após a transfecção por ensaio de MTT (GONÇALVES *et al.*, 2021).

5.9 Ensaio Clonogênico

A linhagem celular A549 foi semeada em placas de 24 poços e foram tratadas com auranofina e cisplatina por 24 horas. Ao final do tratamento, as células foram tripsinizadas, e duas contagens de células (2×10^2 e 10^3 células/poço) foram semeadas em uma nova placa de 24 poços. A formação de colônias foi monitorada por cerca de 10 dias. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com 500 µL de metanol gelado por 10 minutos a 4°C. As células foram então coradas com violeta cristal 0,5% (p/v) em 25% metanol/dH₂O por 10 minutos, lavadas com cuidado com água da torneira e secas à temperatura ambiente.

5.10 Western Blot

Lisados de células A549 em tampão RIPA foram preparados em tampão Laemli 2x contendo 5% de beta-mercaptoetanol e foram fervidos por 10 minutos. As proteínas (40 µg) foram separadas em gel de SDS-PAGE 10% (Mini-Protean Bio-Rad) e transferidas para membranas de nitrocelulose usando um sistema semi-seco Hoefer TE77 (Amersham). As membranas foram coradas com Ponceau S, fotografadas, lavadas com TTBS e bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em TTBS por 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos primários incluíram anti-NRF2 (D1Z9C) XP® *Rabbit mAb* (1:1.000; *Cell Signaling Technology*, cat#12721) e anti-beta-actina (D6A8) *Rabbit mAb* (1:1.000; *Cell Signaling Technology*, cat#8457), que foram incubados a 4°C por 15 horas durante a noite. As membranas foram então incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (1:3.000; *Santa Cruz Biotechnology*) por 2 horas à temperatura ambiente e lavadas com TTBS. As bandas foram reveladas usando o sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad). O anticorpo NRF2 foi removido antes da reação com beta-actina.

5.11 Ensaio de GSH

Os níveis de GSH foram determinados pelo Ensaio de Glutathione GSH-Glo™ (Promega, cat #V6911). Sucintamente, 7×10^3 células das linhagens A549 e Calu3 foram semeadas em placas de 96 poços de fundo branco/transparente. Após 24 horas, o meio foi substituído e as células foram tratadas com as drogas de teste por 24 horas e testadas de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram expressos como concentração micromolar de GSH por poço. BSO (50 μ M) foi utilizado como controle para depleção de GSH.

5.12 Análise Estatística

Os experimentos *in vitro* foram repetidos de 2 a 4 vezes, e os dados de experimentos independentes foram plotados juntos e expressos como média $\pm$ desvio padrão. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram comparadas usando o teste de log-rank. Os testes exatos de Fisher ou Qui-quadrado foram usados para comparar proporções entre grupos, conforme indicado nas respectivas tabelas. O teste T não pareado foi utilizado para comparação de 2 grupos com base nos resultados do teste de normalidade. ANOVA de um ou dois fatores, seguida de post-hoc de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, foram aplicadas quando múltiplos grupos foram comparados. Todos os testes estatísticos foram bicaudais.

Nos *boxplots*: linha central (mediana); *box limits* (quartis superior e inferior); todos os pontos de dados são mostrados. As estatísticas de bioinformática foram realizadas no software R; outras estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 7 (experimentos *in vitro*) ou MedCalc (proporcionalidade de riscos de Cox). Usamos o pacote R ggplot2 e o GraphPad Prism versão 7.0 para Windows (GraphPad Software, Califórnia, EUA (www.graphpad.com)) para fazer gráficos.

6 RESULTADOS

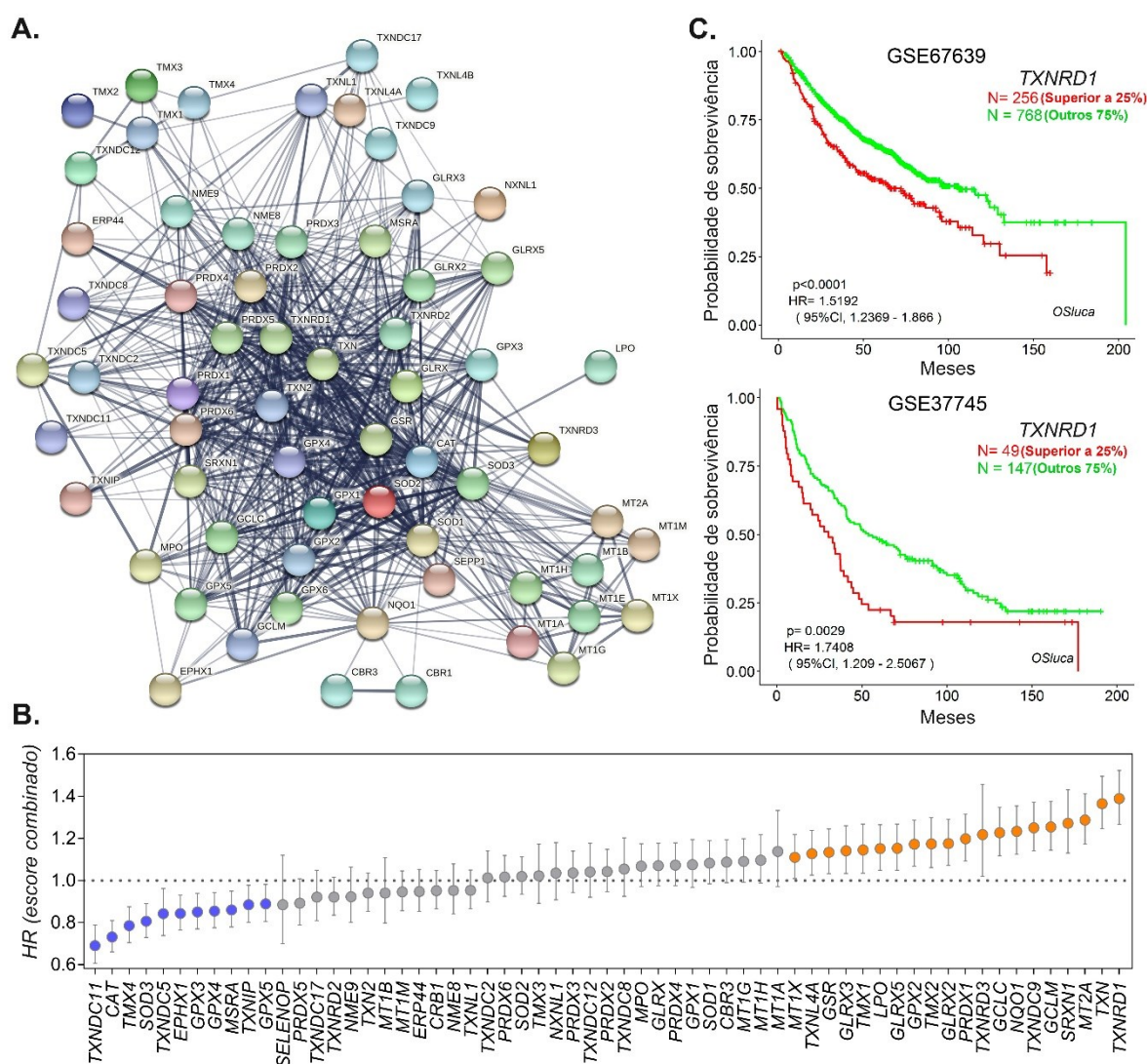
6.1 A Expressão da Tiorredoxina Redutase-1 Correlaciona-se com a Baixa Sobrevida no Câncer de Pulmão: Comparação com um Conjunto de Genes Relacionados ao Estresse Oxidativo

Inicialmente, avaliamos o impacto na OS de 64 genes relacionados ao estresse oxidativo em 35 coortes de dados publicados sobre câncer de pulmão. A análise de rede pelo STRING mostrou que esse conjunto de genes codifica proteínas altamente interconectadas em um nível funcional (Figura 9A). As interações proteína-proteína são indicadas por linhas/arestas que conectam as proteínas/nós individuais; a espessura de cada aresta é proporcional ao grau de confiança calculado de que as interações são biologicamente significativas ($p < 0.05$), de acordo com a análise de conectividade da rede realizada pelo STRING (Figura 9A).

No rastreamento dos genes antioxidantes associados com sobrevida de pacientes com CPCNP, a ferramenta OSluca identificou 11 genes relacionados ao aumento da OS (*TXNDC11*, *CAT*, *TMX4*, *SOD3*, *TXNDC5*, *EPHX1*, *GPX3*, *GPX4*, *MSRA*, *TXNIP*, *GPX5*) e 20 genes (*MT1X*, *TXNL4A*, *GSR*, *GLRX3*, *TMX1*, *LPO*, *GLRX5*, *GPX2*, *TMX2*, *GLRX2*, *PRDX1*, *TXNRD3*, *GCLC*, *NQO1*, *TXNDC9*, *GCLM*, *SRXN1*, *MT2A*, *TXN*, *TXNRD1*) associados a uma menor OS (Figura 9B e Tabela Suplementar 1 – Apêndice A).

Entre estes, o par *TXN* e *TXNRD1* apresentou os maiores escores combinados de HR nos conjuntos de dados, como segue: *TXNRD1* (HR 1,39, CI95% 1,27-1,52, $p < 0,0001$) e *TXN* (HR 1,37, CI95% 1,25-1,50, $p < 0,0001$) (Figura 9B). Na Figura 9C, a associação entre a alta expressão de *TXNRD1* e a OS no câncer de pulmão é mostrada em dois conjuntos de dados representativos (GSE67639 e GSE37745).

Figura 9 – Screening de Genes Relacionados ao Estresse Oxidativo Associados a um Prognóstico Ruim em Câncer de Pulmão



Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: (A) Rede de interação proteína-proteína baseada em STRING dos 64 genes relacionados ao estresse oxidativo selecionados para triagem de OS em câncer de pulmão. Os "nós" representam as proteínas codificadas pelos genes e as larguras das bordas são escalonadas pela força da evidência que suporta uma interação entre dois nós. (B) Escores combinados de risco (HR) e intervalo de confiança de 95% (CI95%) da associação entre expressões de genes relacionados ao estresse oxidativo e OS em 35 conjuntos de dados de câncer de pulmão, avaliados pela ferramenta de sobrevivência OSLuca. Amostras/pacientes foram divididos em coorte superior a 25% versus outros 75% de expressões de genes para um determinado gene e análises de log-rank foram realizadas em 35 conjuntos de dados individuais. Esses valores individuais de HR foram usados para calcular pontuações combinadas de HR (expressão gênica alta/baixa) por gene. Pontos em laranja e azul representam genes com associação significativa (valor p adj $< 0,05$) com piores e melhores OS, respectivamente. (C) Coortes representativas mostrando a associação univariada entre a expressão de TXNRD1 e OS em câncer de pulmão.

6.2 Níveis Elevados de Tiorredoxina Redutase-1 Predizem a Recorrência de Câncer De Pulmão: Resultados de uma Coorte de Pacientes com CPCNP

Levando em consideração os resultados acima, examinamos se os níveis de TXNRD1 estão relacionados com os desfechos de sobrevida em uma coorte hospitalar de pacientes com CPNPC. A coorte consistiu em 65 pacientes, com idade média de 69 anos (IQR: 60-76 anos), com uma razão de mulher – homem de 1,24. Sendo cerca de 72% fumantes atuais/ex-fumantes (Tabela 2).

As comorbidades foram relatadas em 77% dos pacientes, e as mais prevalentes foram hipertensão, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença cardíaca, hipotireoidismo e *diabetes mellitus* tipo II (Tabela 2). Em relação ao câncer de pulmão, 78,5% (51/65) dos pacientes foram diagnosticados com adenocarcinoma de pulmão (LUAD) e 21,5% (14/65) com carcinoma de células escamosas (LUSC); 69% (45/65) estavam no estágio I/II e apenas 13,8% (9/65) apresentavam doença metastática no diagnóstico (Tabela 2).

Todos os pacientes com estágio I/II (45 pacientes) e mais da metade do estágio III (6 pacientes) foram submetidos à lobectomia – isoladamente ou seguida por quimiorradioterapia adjuvante – totalizando 78% (51/65) da coorte. Os 22% restantes (14/65) incluíram pacientes diagnosticados com doença metastática (estágio IV; 9 pacientes) e doença irresecável do estágio III (5 pacientes), que não eram elegíveis para cirurgia.

Os medicamentos baseados em compostos de platina (cisplatina e carboplatina) foram administrados a 33 dos 34 pacientes submetidos à quimioterapia citotóxica; e em todos os casos, combinados com outras quimioterapias citotóxicas, como:

1. Gencitabina;
2. Taxanos;
3. Vinorelbina
4. Pemetrexede.

Em nossa coorte, apenas 1 paciente foi tratado em primeira linha com Erlotinibe associado a Bevacizumabe.

Tabela 2 – Características Clínicas da Nossa Coorte de Pacientes com Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas

Características	Nº
Idade (anos)	
Média (IQR)	69 (60 – 76)
Sex – no. (%)	
Masculino	29 (45)
Feminino	36 (55)
Raça ou grupo étnico – Nº (%)	
Branco	62 (95.4)
Afrodescendente	1 (1.5)
Outro	2 (3.1)
Histórico de Fumante – Nº (%)	
Fumante Ativo	16 (24.6)
Ex-fumante	31 (47.7)
Nunca Fumou	15 (23.1)
Não informado	3 (4.6)
Comorbidades – Nº (%)‡	
Não	15 (23)
Sim	50 (77)
Hipertensão	32 (49.2)
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	11 (17)
Hipotireoidismo	10 (15.4)
Doença Cardíaca (Insuficiência Cardíaca Congestiva/Angina)	1/5 (9.2)
Transtorno de Humor (depressão/bipolar/esquizofrenia)	4/1/1 (9.2)
<i>Diabetes mellitus II</i>	8 (12.3)
Estágio – Nº (%)	
I	23 (35.4)
II	22 (33.8)
III	11 (17.0)
IV	9 (13.8)
Tipo Histológico – Nº (%)	
Adenocarcinoma (LUAD)	51 (78.5)
Carcinoma de Células Escamosas (LUSC)	14 (21.5)
Tratamento	
Apenas Lobectomia	27 (41.5)
Lobectomia + Adj. quimioterapia	17 (26.2)
Lobectomia + Adj. quimioterapia + Radioterapia	7 (10.8)
Quimioterapia + Radioterapia	9 (13.8)
Apenas Quimioterapia	2 (3.1)
Apenas Radioterapia	3 (4.6)

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: Nº – número; ‡ - pacientes que declararam ter mais de 1 comorbiade; Adj. – adjuvante.

Realizamos, em seguida, as análises de IHC da proteína TXNRD1 em amostras de tumor pulmonar da nossa coorte. Comparamos dois anticorpos primários diferentes e diversos métodos aplicados a diferentes etapas do protocolo de IHC, conforme descrito na metodologia deste trabalho e descrito na Figura 8. O método selecionado

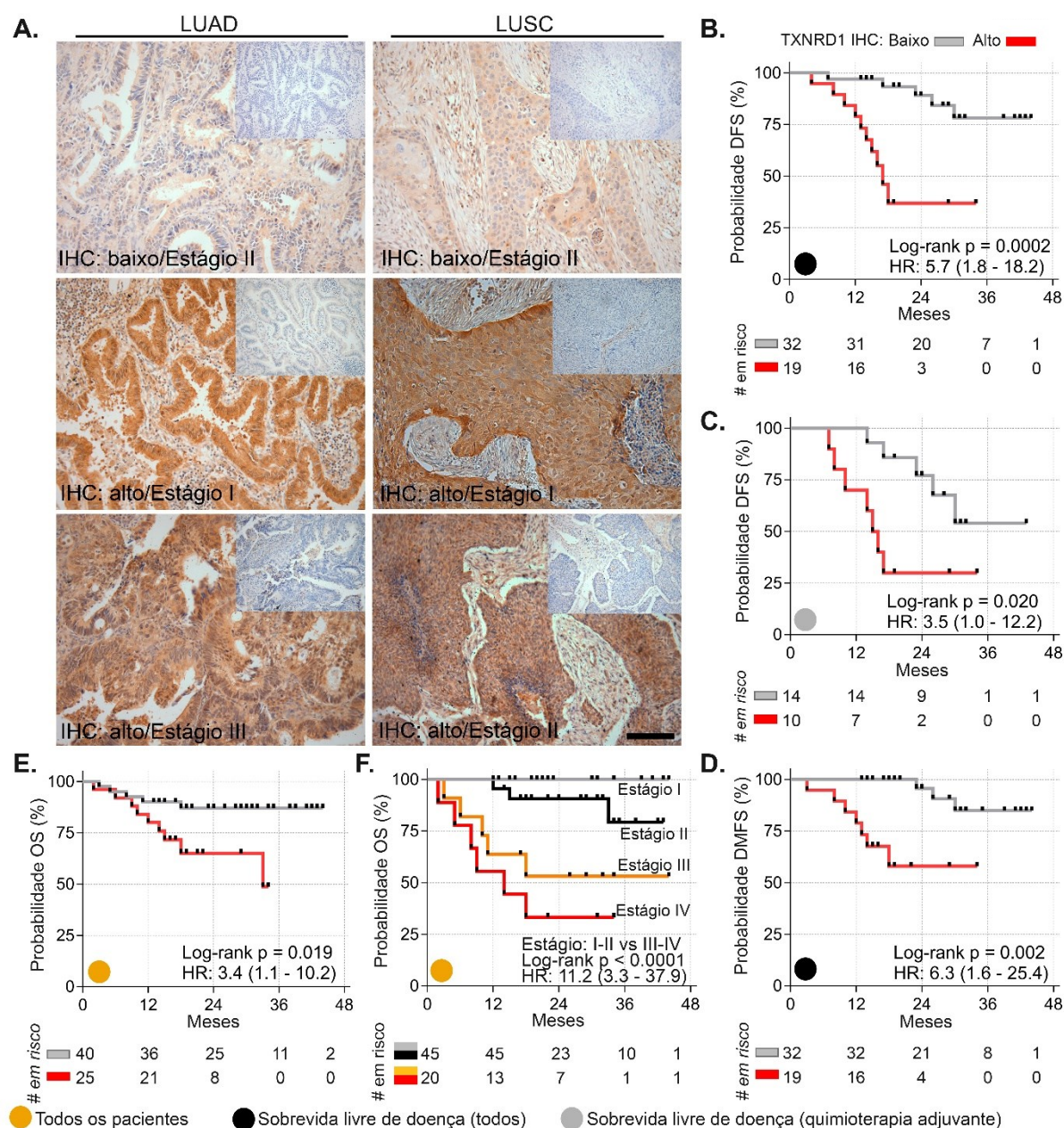
mostrou uma boa marcação, isto é, a marcação de IHC da TXNRD1 nas amostras quando comparado ao controle negativo sem o anticorpo primário (Figura 10A).

O sinal de TXNRD1 foi principalmente detectado no citoplasma de amostras de TXNRD1 baixo e em ambos compartimentos citoplasmático e nuclear de células TXNRD1 alto (Figura 10A). A TXNRD1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos humanos e, de fato, todas as amostras de tumor de pulmão apresentaram escores de IHC ≥ 1 . Escores elevados de IHC para TXNRD1 foram observados em 38% (25/65) das amostras, e nenhuma associação com idade, sexo, raça, história de tabagismo, comorbidades, estágio da doença e subtipo histológico LUAD/LUSC foi observada (Tabela 3). Também não houve associação dos níveis de TXNRD1 com os tratamentos (lobectomia, quimioterapia ou radioterapia), enquanto uma associação significativa com maiores frequências de recorrências de doenças locorregionais e metastáticas e eventos de morte foram observados em pacientes com níveis elevados de TXNRD1 (Tabela 3). Em pacientes com doença irresssecável, a progressão com base nos critérios RECIST não mostrou uma associação estatisticamente significativa com TXNRD1 (Tabela 3), mas essa análise foi limitada devido ao baixo número de pacientes elegíveis para avaliação da sobrevida livre de progressão.

A estimativa de Kaplan-Meier da sobrevivência por tempo (meses) de acordo com os escores de IHC de TXNRD1 (alta vs baixa) mostrou que pacientes/tumores expressando altos níveis de TXNRD1 e que foram submetidos à cirurgia de lobectomia apresentaram menor tempo para recorrência locorregional e metastática distante, avaliada por meio dos pontos finais de sobrevida livre de doença (DFS) (Figura 10B-C) e sobrevida livre de metástases distantes (DMFS) (Figura 10D). É importante notar que todos os eventos nos pontos finais de DFS e DMFS foram atribuídos a recorrências locais ou distais do câncer de pulmão; nenhum a mortes. No subgrupo de pacientes tratados com cirurgia mais quimioterapia adjuvante, altos escores de TXNRD1 também se correlacionaram com menor DFS (Figura 10C).

Corroborando os resultados apresentados na Figura 9, altos níveis de TXNRD1 foram associados a um desfecho mais curto de OS (Figura 10E). A sobrevida livre de progressão (PFS) em pacientes com doença irresssecável não mostrou relação com os níveis de TXNRD1 (Figura Suplementar 1 – Apêndice A). Como controle, pacientes com câncer de pulmão agrupados com base no estágio da doença confirmaram que nossa coorte reproduz a esperada OS pior em indivíduos diagnosticados com doença em estágio III e IV (Figura 10F).

Figura 10 – Níveis de Proteína TXNRD1 e *Endpoints* de Sobrevivência em uma Coorte de CPCNP



Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: (A) Imunohistoquímica representativa (IHC) de TXNRD1 em LUAD e LUSC. Os escores de IHC de TXNRD1 (baixo ou alto) e o estadiamento (TNM) em cada amostra também estão indicados. As IHC menores representadas no canto superior direito de cada IHC representa o controle negativo realizado sem incubação do anticorpo primário. As fotos foram tiradas com ampliação de 200x. (B-F) Gráficos de Kaplan-Meier em uma coorte de pacientes CPCNP. Os pacientes foram dicotomizados em alto-TXNRD1 *versus* baixo-TXNRD1, conforme determinado por IHC. (B) Sobrevida livre de doença, DFS, em pacientes com doença ressecada (n=51); (C) DFS em pacientes que receberam quimioterapia adjuvante após a ressecção do tumor (n=24); (D) Sobrevida livre de metástase, DMFS, em pacientes com doença ressecada (n=51); (E) Sobrevida Global (OS), em todos os pacientes (n=65); (F) OS de acordo com o estágio TNM no diagnóstico. O valor p do teste de log-rank, o risco relativo (HR), o intervalo de confiança de 95% e o número de indivíduos em risco também estão demonstrados.

Tabela 3 – Características Clinicopatológicas de Pacientes com CPCNP de Acordo com os Escores de IHC de TXNRD1 em Tumores Pulmonares

Características	TXNRD1 escore		p-valor
	Baixo	Alto	
Todos os pacientes (%)	40 (62)	25 (38)	
Idade			
< 60	8 (20)	9 (36)	0.153
≥ 60	32 (80)	16 (64)	
Sex – N° (%)			0.144
Masculino	15 (37)	14 (56)	
Feminino	25 (63)	11 (44)	
Raça ou grupo étnico – N° (%)			0.304
Branco	39 (98)	23 (92)	
Afrodescendente & Outros	1 (2)	2 (8)	
Histórico de Fumante – N° (%)			0.536
Fumante ativo e ex-fumante	27 (68)	20 (80)	
Nunca Fumou	11 (27)	4 (16)	
Não respondeu	2 (5)	1 (4)	
Comorbidades – N° (%)‡			0.889
Não	9 (23)	6 (24)	
Sim	31 (77)	19 (76)	
Hipertensão	22	10	
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	3	8	
Hipotireoidismo	9	1	
Doença Cardíaca (Insuficiência Cardíaca Congestiva/Angina)	1	5	
Transtorno de Humor (depressão/bipolar/esquizofrenia)	3	3	
<i>Diabetes mellitus II</i>	5	3	
Estágio – N° (%)			0.474
I	14 (35)	9 (36)	
II	16 (40)	6 (24)	
III	5 (12.5)	6 (24)	
IV	5 (12.5)	4 (16)	
Tipo Histológico – N° (%)			
Adenocarcinoma (LUAD)	33 (82)	18 (72)	0.316
Carcinoma de Células Escamosas (LUSC)	7 (18)	7 (28)	
Lobectomia – N° (%)			0.703
Sim	32 (80)	19 (76)	
Não	8 (20)	6 (24)	
Radioterapia – N° (%)			0.698
Sim	11 (27)	8 (32)	
Não	29 (73)	17 (68)	
Quimioterapia – N° (%)			
Sim	22 (55)	13 (52)	0.813
Não	18 (45)	12 (48)	
Recorrência (locoregional & metástases) N° (%)‡			
Sim	5 (16)	10 (53)	0.005 ^b
Não	27 (84)	9 (47)	
Recorrência (metástases) N° (%)‡			
Sim	3 (9)	7 (37)	0.017 ^b
Não	29 (91)	12 (63)	
Progressão (RECIST) N° (%)¥			
Sim	7 (88)	6 (100)	0.995 ^a
Não	1 (12)	0 (0)	
Morte (Câncer Específico) N° (%)			
Sim	5 (12)	9 (36)	0.025 ^b
Não	35 (88)	16 (64)	

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: Sendo, ‡ - pacientes pós-lobectomia +/- quimioterapia adjuvante e/ou radioterapia; ¥ -

pacientes com doença doença irresssecável +/- quimioterapia e/ou radioterapia; N^o – número; ^a - Fisher-exact test (two-tailed); ^b - Chi-squared test ($p < 0.05$; two-tailed).

Além de TXNRD1, outros fatores de risco como sexo, história de tabagismo, comorbidades, estágio da doença, subtipo histológico e idade foram avaliados em análise univariada. Destes, apenas o estágio TNM II/III no diagnóstico se correlacionou com um tempo mais curto para recorrência/DFS em comparação com tumores em estágio I (Tabela 4). Nenhuma das variáveis clinicopatológicas foi associada à DMFS (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise Univariável de Fatores Basais Associados a DFS, DMFS e OS em Pacientes com CPCNP

Variáveis	Efeito Testado	HR	p-valor	95% CI
DFS				
TXNRD1 escore	Alto vs. Baixo	5.73	0.0002*	1.80-18.20
Sexo	F vs. M	1.37	0.529	0.47-4.05
Fumante	S vs. N	0.71	0.546	0.20-2.46
Comorbidades	S vs. N	0.75	0.618	0.24-2.31
Estágio	II-III vs. I	3.25	0.049*	1.18-8.68
Tipo Histológico	LUSC vs. LUAD	1.21	0.574	0.52-5.01
Idade	> 60 vs. < 60 yr	0.74	0.575	0.24-2.30
DMFS				
TXNRD1 escore	Alto vs. Baixo	6.29	0.002*	1.56-25.39
Sexo	F vs. M	2.44	0.159	0.70-8.48
Fumante	S vs. N	2.20	0.333	0.44-10.93
Comorbidades	S vs. N	1.41	0.622	0.35-5.58
Estágio	II-III vs. I	1.53	0.543	0.41-5.72
Tipo Histológico	LUSC vs. LUAD	2.22	0.225	0.41-11.91
Idade	> 60 vs. < 60 yr	2.60	0.152	0.70-9.64
OS				
TXNRD1 escore	Alto vs. Baixo	3.38	0.019*	1.13-10.17
Sexo	F vs. M	4.65	0.005*	1.60-13.54
Fumante	S vs. N	0.81	0.759	0.21-3.15
Comorbidades	S vs. N	1.87	0.299	0.66-7.08
Estágio	III-IV vs. I-II	11.24	<0.0001*	3.33-37.94
Tipo Histológico	LUSC vs. LUAD	1.44	0.519	0.46-4.34
Idade	> 60 vs. < 60 yr	1.35	0.642	0.41-4.40

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: CI (intervalo de confiança); HR (*hazard ratio*); S (sim); N (não); yr (anos); F (feminino); M (masculino); LUAD (adenocarcinoma); LUSC (carcinoma de células escamosas). * p-valor <0.05 (Log-rank test).

A regressão de Cox multivariável revelou que o alto escore de TXNRD1 estava significativamente associado a um menor DFS e DMFS, mas não a OS (Tabela 5). Além de TXNRD1, o estágio I contribuiu para um DFS prolongado e a idade maior que

60 anos para um DMFS mais curto (Tabela 5). Por fim, a doença avançada no diagnóstico (estágios III e IV) e a presença de comorbidades destacaram-se como as covariáveis mais relevantes para uma OS ruim (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise Multivariada de Fatores Basais Associados a DFS, DMFS e OS em Pacientes com CPCNP

Variáveis		HR	p-valor	95% CI
DFS				
TXNRD1 score	Alto	6.39	0.001*	2.13-19.20
Estágio	Estágio I	0.29	0.062	0.08-1.06
DMFS				
TXNRD1 score	Alto	10.18	0.001*	2.48-41.62
Idade	> 60 anos	7.17	0.065	0.89-58.13
OS				
Estágio	III	9.34	0.002*	2.21-38.40
Estágio	IV	24.37	<0.0001*	5.68-104.56
Comorbidades	N	0.22	0.059	0.045-1.06

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: CI (interval de confiança); HR (*hazard ratio*); N (não); * p-valor <0.05 (*Cox proportional hazard regression*).

6.3 TXNRD1 é Regulada Positivamente em Tumores que Abrigam Mutações KEAP1/NRF2 e se Correlaciona com a Expressão do *Regulon* NRF2

Até o momento, nossos dados sugerem que altos níveis de TXNRD1 preveem resultados ruins em CPCNP. Em seguida, aproveitamos a coorte TCGA para investigar quais processos biológicos estão associados ao TXNRD1. Selecionamos os 50 principais genes positivamente correlacionados com a expressão de TXNRD1 (correlação de Pearson) em todo o transcriptoma de LUAD (intervalo R²: 0,64-0,83) e LUSC (intervalo R²: 0,53-0,76) (Tabela Suplementar 2 – Apêndice A) e interrogamos os processos enriquecidos por meio da *Pathway Enrichment Analysis*. Identificamos que os genes correlacionados com TXNRD1 estão relacionados a termos como via KEAP1-NRF2, estresse oxidativo, via da fosfato pentose e metabolismo do glutathione, que incluem genes como *NQO1*, *GCLC*, *GCLM*, *GSR* e *TXN*, entre outros (Figura 11A e Tabela Suplementar 3 – Apêndice A). A análise de enriquecimento do fator de transcrição revelou NRF2 como o principal regulador transcricional dos genes correlacionados com TXNRD1 (Figura 11A e Tabela Suplementar 4 – Apêndice A).

Após, examinamos se a alta expressão de *TXNRD1* se associa a mutações somáticas no gene codificador de NRF2, *NFE2L2*, e/ou seu regulador *KEAP1* em

vários tipos de tumores do TCGA. Essa análise nos mostrou diferenças na expressão de *TXNRD1* entre os tipos de câncer, com CPCNP se destacando entre os valores mais altos, bem como revelou uma distribuição distorcida da expressão de *TXNRD1* em alguns tipos de câncer (Figura 11B).

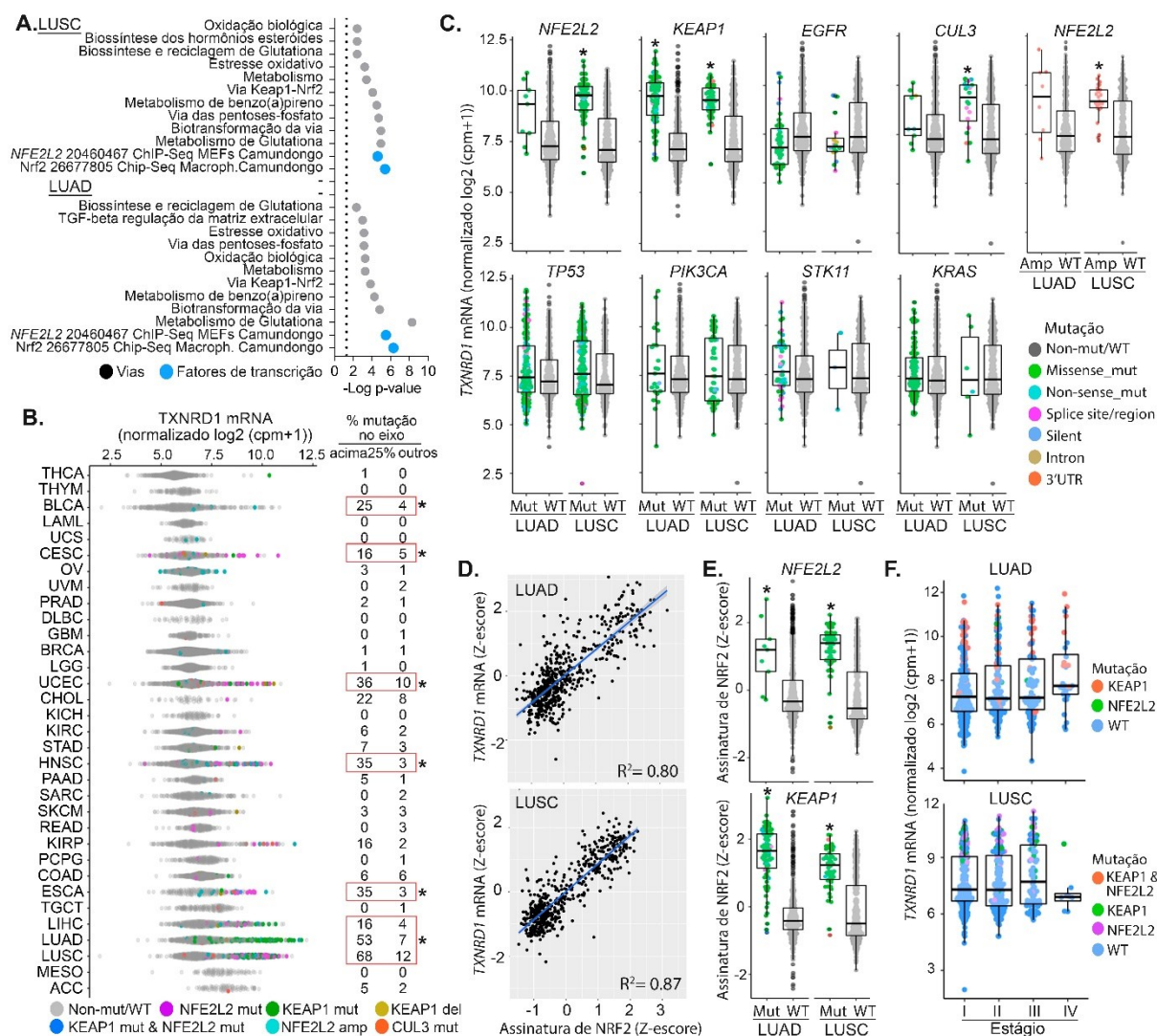
Comparando as frequências de alterações genéticas ativadoras da via NRF2 (mutações em *NFE2L2*, *KEAP1* e *CUL3*, amplificação de *NFE2L2* e deleção de *KEAP1*) nas amostras de 25% com níveis mais altos de transcrição de *TXNRD1* em comparação com as outras 75% de amostras, verificou-se que as mutações no eixo NRF2 se sobrepõem a níveis de mRNA de *TXNRD1* aumentados em vários tipos de câncer, como, carcinoma escamoso cervical, carcinoma de endométrio do corpo uterino, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço e, mais frequente, carcinoma esofágico, LUAD e LUSC (Figura 11B). Em seguida, examinamos quais mutações clássicas de câncer de pulmão estão relacionadas à superexpressão de *TXNRD1* e descobrimos que apenas mutações em *KEAP1* ou *NFE2L2* estão conectadas com a regulação positiva de *TXNRD1*, enquanto mutantes *TP53*, *PIK3CA*, *KRAS*, *EGFR* e *STK11* não diferiram das amostras WT (Figura 11C). As mutações em *CUL3* também estavam envolvidas na degradação da proteína NRF2 (SHIBATA *et al.*, 2008) e a amplificação de *NFE2L2* também estava associada à regulação positiva de *TXNRD1*, especialmente em LUSC, onde essas alterações somáticas são mais frequentes (Figura 11C).

Notavelmente, as alterações genéticas *KEAP1/NFE2L2/CUL3* não coocorrem na maioria dos pacientes com CPCNP com *TXNRD1* superexpressa (Figura Suplementar 2 – Apêndice A), indicando que diferentes mecanismos podem desencadear a expressão de *TXNRD1*. Curiosamente, tanto em LUSC quanto em LUAD, a expressão de *TXNRD1* apresentou forte correlação positiva (r^2 de Pearson = 0,80 em LUAD; 0,87 em LUSC; Figura 11D) com os escores de uma assinatura de genes alvo de NRF2 previamente validada para inferir a atividade de NRF2 no câncer (LEVINGS *et al.*, 2018). Além disso, as mutações de *KEAP1* e *NFE2L2*, de fato, ditaram altos escores de assinatura NRF2 em CPCNP (Figura 11E).

No transcriptoma completo de CPCNP, as expressões gênicas que mais se correlacionaram (r^2 de Pearson $\geq 0,7$, Tabela Suplementar 5 – Apêndice A) com os escores de assinatura NRF2 são enriquecidas com *sites* de ligação do fator de transcrição NRF2, incluindo *TXNRD1*, conforme determinado por *Transcription Factor enrichment analysis* (TFEA) (Tabela Suplementar 6 – Apêndice A). Por fim, os níveis

de mRNA de *TXNRD1* não variaram em relação aos estágios TNM em pacientes com CPCNP da coorte TCGA (Figura 11F). Estes dados sugerem que os níveis de *TXNRD1* são provavelmente ditados pela atividade da via NRF2.

Figura 11 – Superexpressão de *TXNRD1* em Tumores Pulmonares com Mutações Ativadoras da Via NRF2



Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

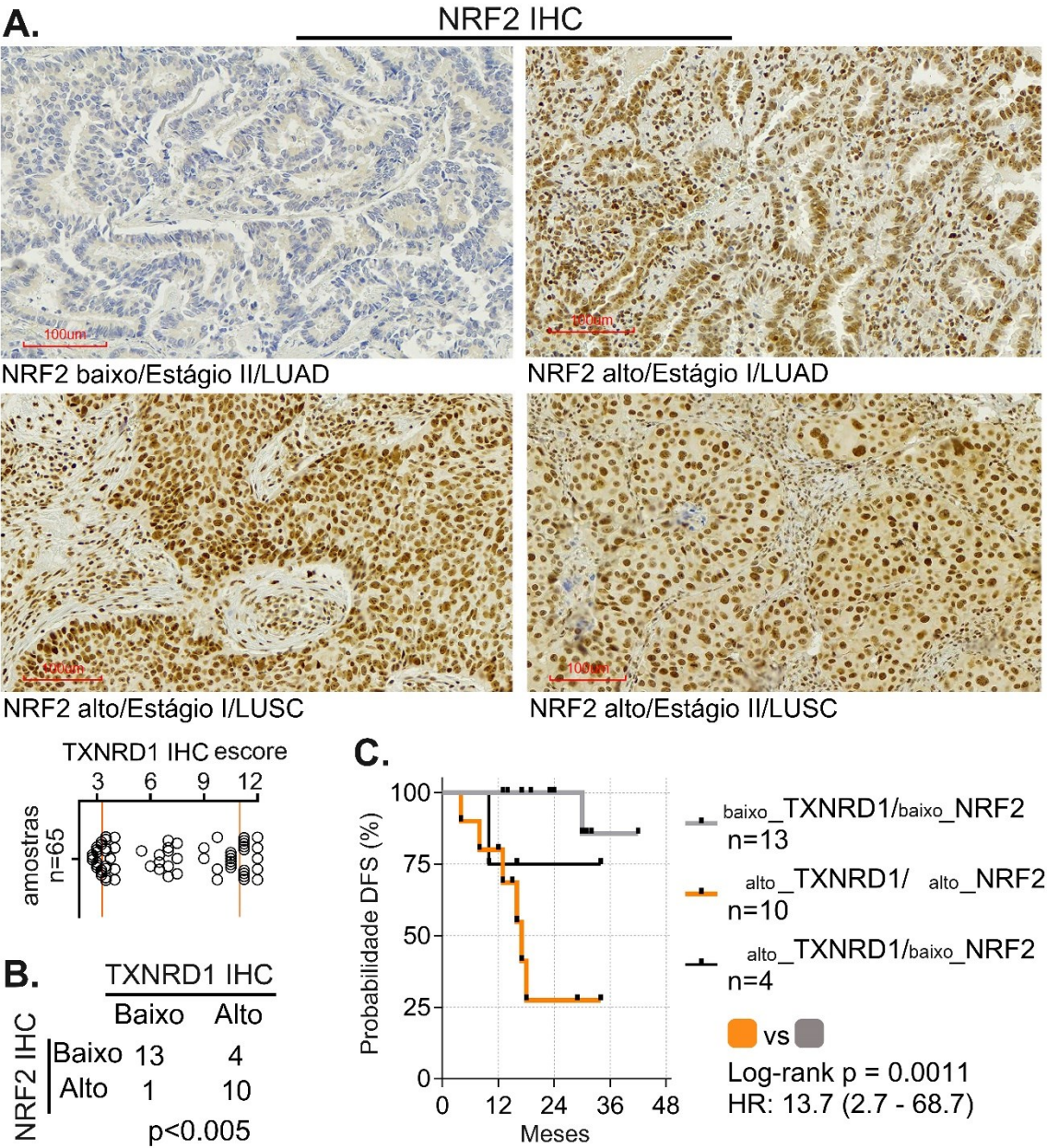
Legenda: (A) Análise de enriquecimento de vias e análise de enriquecimento de fatores de transcrição que mostram as principais vias (pontos cinza) e fatores de transcrição (pontos azuis) enriquecidos para os principais genes melhor correlacionados com o mRNA de *TXNRD1* em tumores LUSC e LUAD do TCGA. O transcriptoma completo foi avaliado pela correlação de Pearson. (B) Mudanças relativas na expressão de *TXNRD1* em 33 tipos de tumores do conjunto de dados *PanCancer* do TCGA e sua sobreposição com alterações genéticas na via NRF2. As frequências (%) de amostras com mutações no eixo NRF2 (ou seja, nos genes *NFE2L2*, *KEAP1* e *CUL3*) entre as expressões superiores de 25% *versus* outras expressões de 75% de *TXNRD1* também são apresentadas. * proporções diferentes entre amostras de expressões superiores de 25% *versus* outras expressões de 75% (teste exato de Fisher, bilateral, $p < 0,05$). (C) Níveis de expressão do gene *TXNRD1* em tumores LUSC e LUAD agrupados com base em seu *status* mutacional de *KEAP1*, *NFE2L2*, *CUL3*, *EGFR*, *TP53*, *KRAS*, *STK11* e *PIK3CA*, e amplificação *NFE2L2*, em comparação com amostras WT para o respectivo gene. Os tipos de mutação são representados com cores diferentes. * diferente de WT

(FDR <0,05 e $\log_2 \text{fold-change} \geq 1$; análise de expressão diferencial EdgeR). (D) Gráfico de pontos de correlação de Pearson entre o mRNA de *TXNRD1* e o escore da assinatura de genes-alvo de NRF2 em tumores LUAD e LUSC do TCGA. (E) Expressão da assinatura NRF2 em mutantes de *KEAP1* e *NFE2L2* versus tumores de pulmão WT do TCGA. * denota diferença estatística em relação às amostras WT (teste t não pareado; $p < 0,05$). (F) Expressão do mRNA de *TXNRD1* em diferentes estágios TNM em tumores LUSC e LUAD do TCGA. As amostras com mutações em *KEAP1*, *NFE2L2* e WT são anotadas com cores diferentes.

Para compreender se a relação entre TXNRD1 e NRF2 também ocorre em nível proteico, usamos IHC para comparar os níveis de NRF2 entre amostras com os escores mais altos versus mais baixos de TXNRD1 ($n = 28$; 14/grupo) em nossa coorte de CPCNP (Figura 12A).

Os resultados indicaram uma associação significativa entre alta proteína NRF2 e alta TXNRD1, dado que 10 de 14 tumores com alto nível de TXNRD1 também tinham alto nível de NRF2 e, vice-versa, apenas 1 amostra com alto nível de NRF2 apresentou baixo escore de TXNRD1 (Figura 12B). A análise de DFS mostrou que o alto conteúdo tanto de TXNRD1 quanto de NRF2 está associado a um tempo mais curto de recorrência da doença quando comparado aos pacientes TXNRD1-baixo/NRF2-baixo (Figura 12C).

Figura 12 – Análises IHC de NRF2 Associadas com a Proteína TXNRD1 em Amostras de CPCNP



Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: (A) Análise IHC representativa de NRF2 em amostras de LUAD e LUSC. O gráfico inferior esquerdo representa o corte usado para selecionar as 14 amostras de alto_TXNRD1 e as 14 amostras de baixo_TXNRD1 com base nos escores de IHC; (B) Proporção de amostras de CPCNP (n = 28) em relação aos seus escores de IHC para NRF2 e TXNRD1 ($p < 0,005$; teste exato de Fisher; bilateral). (C) Probabilidade de DFS de pacientes com CPCNP agrupados com base no *status* de NRF2/TXNRD1 IHC. O grupo alto_NRF2/baixo_TXNRD1 foi omitido devido ao baixo número de pacientes (n = 1). A estatística de *log-rank* também é mostrada.

6.4 Resistência à Inibição de TXNRD1 Mediada por NRF2/GSH e o Papel Fundamental de NRF2 na Sobrevivência de Células de Câncer de Pulmão Mutantes de *KEAP1*

Em seguida, investigamos se altos níveis de TXNRD1 em cânceres de pulmão com mutações ativadoras de NRF2 são capazes de promover a sobrevivência e quimiorresistência, ou, se esses fenótipos são ditados por outros componentes da via NRF2. Ao avaliar os dados da triagem de *knockout* CRISPR/Cas9, descobrimos que 41% (25/61) das linhagens celulares de CPCNP com NRF2/KEAP1 WT dependem de *TXNRD1* para sobreviver/proliferar (Figura 13A), enquanto apenas 19% (5/27) das células com qualquer mutação em KEAP1 (*hotspot*, danosa ou não conservadora) e nenhuma (0/8) com mutações danosas/*hotspot* em KEAP1 foram sensíveis ao *knockout* de TXNRD1 (Figura 13A).

A frequência de dependência de linhagens celulares mutantes de *NFE2L2* em relação a *TXNRD1* não diferiu do tipo WT, mas essa comparação é limitada pelo baixo número de mutantes NRF2 no painel de células examinado (Figura 13A). Além disso, células mutantes de *KEAP1* e *NFE2L2* não apresentaram dependência associada ao *knockout* de *KEAP1* (Figura 13A); o que pode não ser surpreendente, já que a depleção de KEAP1 é esperada para induzir NRF2. Interessantemente, 67% (18/27) das células com qualquer mutação em KEAP1, 88% (7/8) daquelas com mutações danosas/*hotspot* em KEAP1 e 75% (3/4) das linhagens celulares mutantes de NRF2 *hotspot* dependiam de NRF2/*NFE2L2* para sobreviver/proliferar (Figura 13A). Em contraste, apenas 16% (10/61) das células de CPCNP com a via NRF2 de tipo WT apresentaram dependência em relação a NRF2 (Figura 13A). Em consonância com esses dados, o tratamento com o inibidor de NRF2, ML-385 (SINGH *et al.*, 2016), inibiu a proliferação em células de CPCNP mutantes de KEAP1 (A549), mas não em células de CPCNP tipo WT (Calu3) (Figura 13B). Corroborando os dados do TCGA, linhagens de células de câncer de pulmão que apresentavam mutações no gene *KEAP1* mostraram uma forte *upregulation* do mRNA de *TXNRD1* em comparação com células WT nos dois conjuntos de dados avaliados (Figura 13C).

Analizamos os valores de IC₅₀ publicados do inibidor de TXNRD1, auranofina, em 129 linhagens de células de câncer de pulmão (YAN *et al.*, 2019) com dados de expressão do gene *TXNRD1* dos conjuntos de dados E-MTAB-2706 e CCLE, e descobrimos que as células de câncer de pulmão com alta expressão de *TXNRD1*

demonstram sensibilidade reduzida ao inibidor do TXNRD1 (Figura 13D). Em seguida, investigamos um possível papel de NRF2 como fator causal de resistência ao inibidor de TXNRD1 em células mutantes *KEAP1*. Na linhagem celular mutante *KEAP1*, A549, a inibição de TXNRD1 com auranofina é compensada pela ativação de NRF2, como inferido pelo acúmulo de proteína NRF2 nos dados de *Western Blot* (Figura 13E). Além disso, a depleção mediada por siRNA de NRF2 e o tratamento com ML-385 sensibilizaram as células A549 ao tratamento com auranofina (Figura 13F).

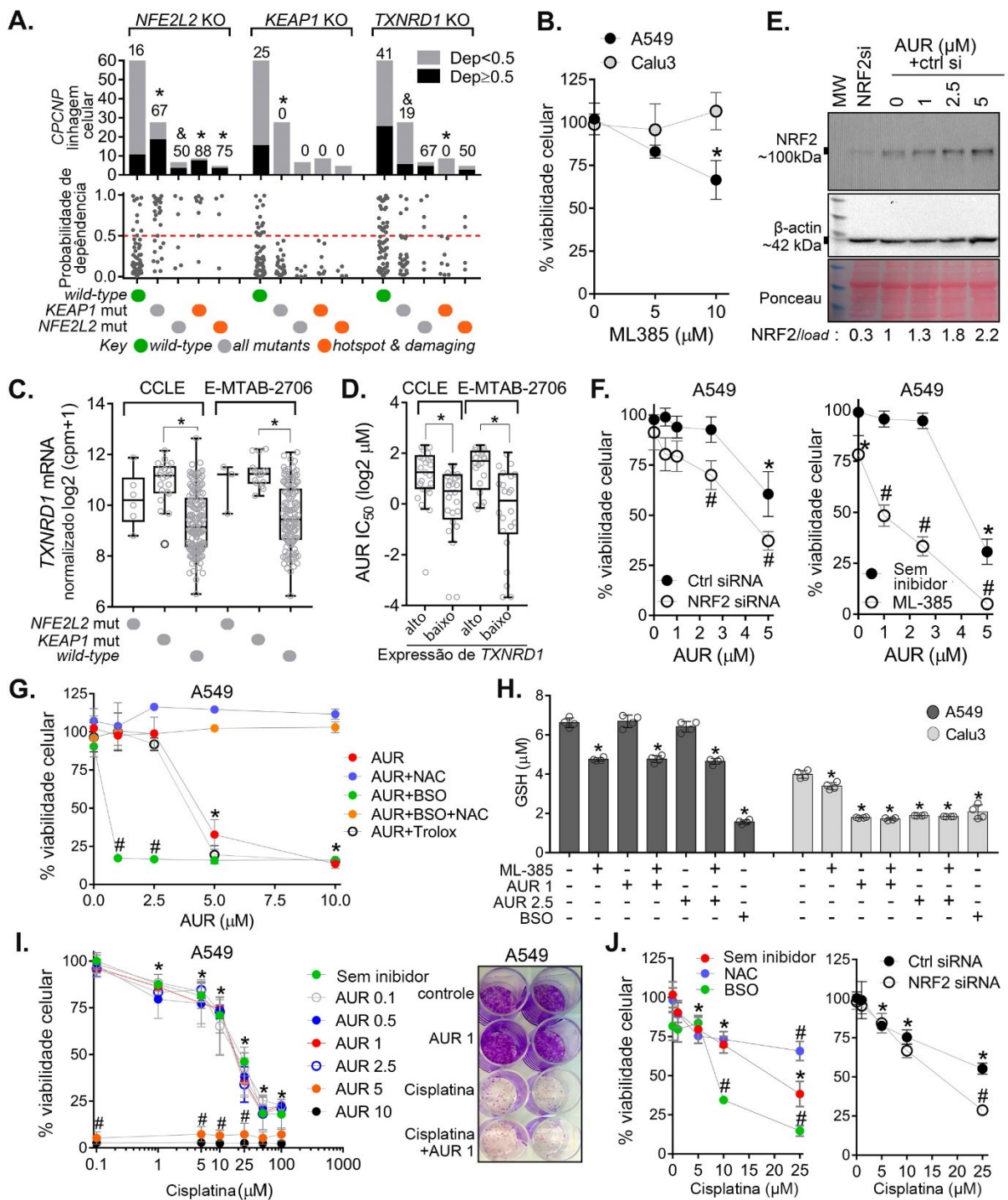
A síntese/reciclagem de GSH e as vias antioxidantes dependentes de tióis TXN/TXNRD1, são as duas principais compensações que mantêm o equilíbrio de ditiol/dissulfeto de proteínas e, ambas, estão sob o controle de NRF2 (YAN *et al.*, 2019). Na verdade, as células A549 sucumbiram à auranofina combinada com o inibidor de síntese de GSH, BSO, quando comparadas a BSO ou à auranofina isoladamente (Figura 13G). A presença do antioxidante NAC apresentou efeito protetor/precursor de tiol e preveniu completamente a citotoxicidade da auranofina, bem como, aboliu o efeito deletério da combinação BSO/auranofina. Por outro lado, o antioxidante tiol não relacionado, Trolox, não teve efeito protetor (Figura 13G). Curiosamente, as células mutantes *KEAP1* A549 tratadas com auranofina (1 e 2,5 μ M) não apresentaram alterações nos níveis de GSH, enquanto a linhagem celular WT, Calu3, apresentou um esgotamento significativo de GSH após 24 horas de tratamento com o inibidor TXNRD1 (Figura 13H).

Em células A549, ML-385 sozinho causou uma diminuição de 31% em GSH, sendo esse efeito não potencializado pela co-administração de auranofina (Figura 13H). Esses resultados indicam que as células mutantes *KEAP1* são menos suscetíveis a alterações na homeostase de GSH/tiol quando a função de TXNRD1 é inibida. Em relação à resposta das células mutantes *KEAP1* a compostos de platina, inesperadamente, a auranofina não sinergizou com a cisplatina tanto em ensaios de viabilidade celular de 72 horas quanto em ensaios clonogênicos de longo prazo (Figura 13I). Em contraste, a redução de NRF2 e de GSH com BSO tornou as células A549 mais sensíveis à cisplatina (Figura 13J). Também exploramos se níveis não citotóxicos de auranofina (0,1 a 2,5 μ M) poderiam prejudicar a migração celular, mas nenhum efeito foi encontrado nos ensaios de *scrating* (Figura Suplementar 3 – Apêndice A).

Tomados em conjunto, esses resultados indicam que a superexpressão de TXNRD1 não confere nem susceptibilidade à auranofina nem resistência à cisplatina

em células mutantes KEAP1. Por outro lado, o eixo NRF2/GSH parece ser um componente chave da sobrevivência/proliferação celular e da quimiorresistência em mutantes KEAP1.

Figura 13 – Avaliação *in vitro* do Impacto de TXNRD1 na Sobrevida de Células com Via NRF2 Hiperativa



Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: (A) Resultados da triagem *knockout* CRISPR mostrando a dependência dos genes *NRF2*, *KEAP1* e *TXNRD1* em um painel de 94 linhagens celulares CPCNP. As células foram divididas com base no *status* mutacional de *KEAP1* e *NFE2L2* da seguinte forma: todas as mutações (*hotspot*, danosa e outras alterações não conservadoras); mutações *hotspot* e danosas; e tipo WT (*NRF2/KEAP1* WT). No gráfico superior, é mostrado o número de linhagens celulares dependentes ($\text{dep} \geq 0,5$) ou não ($\text{dep} < 0,5$) de um determinado gene por grupo mutacional. O número no topo de cada coluna denota a porcentagem de linhagens celulares dependentes em cada condição. O gráfico inferior mostra as probabilidades individuais de dependência por linhagem celular. * e & denotam diferenças do respectivo grupo "tipo WT" $p < 0,05$ e $p = 0,05$ a $0,1$, respectivamente (teste exato de Fisher, *two-tailed*). (B) Ensaio MTT mostrando o efeito de ML-385 na viabilidade das linhagens celulares A549 e Calu3 após tratamento de 72 h. *Diferente das células não tratadas e de células Calu3 na mesma concentração de ML-385 (ANOVA de duas vias, pós-hoc Bonferroni; $p < 0,05$). (C) Expressão da *TXNRD1* em linhagens celulares de câncer de pulmão *KEAP1/NFE2L2* mutantes e WT dos conjuntos de dados E-MTAB-2706 e CCLE. Os dados de expressão da *TXNRD1* por linhagem celular foram combinados com o *status* mutacional de *KEAP1* e *NFE2L2* derivados do COSMIC. * Diferente nas comparações indicadas (FDR $< 0,05$, análise de expressão diferencial EdgeR). (D) Valores de IC_{50} do inibidor da *TXNRD1* auranofina (AUR) em linhagens celulares de CPCNP com baixa *versus* alta expressão de *TXNRD1*. Os valores de IC_{50} foram obtidos de Yan *et al.* (2019) e combinados com mRNA de *TXNRD1* dos conjuntos de dados CCLE e E-MTAB-2706. Os valores de IC_{50} dos tercís T1 (1º tercíl; baixo *TXNRD1*) *versus* T3 (3º tercíl; alto *TXNRD1*) de expressão de *TXNRD1* foram comparados. * $p < 0,05$ (teste t não pareado). (E) *Imunoblot* representativo de *NRF2* após tratamento com AUR por 24 h em células A549. (F) Efeito da inibição (siRNA) de *NRF2* ou inibidor de *NRF2* (ML-385, 10 μM) sobre a citotoxicidade da AUR em células A549 avaliados por MTT após tratamento por 48 h e 72 h, respectivamente. * Diferente dos controles não tratados. # Diferente da AUR sozinha na mesma concentração (ANOVA de duas vias, post-hoc Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 3$ em quadruplicata). (G) Ensaio de viabilidade celular MTT mostrando o efeito de BSO, NAC, Trolox e BSO + NAC combinados sobre a citotoxicidade da AUR em células A549 após tratamento por 72 h. * Diferente do controle não tratado. # Diferente do controle não tratado e da AUR sozinha na mesma concentração (ANOVA de duas vias, post-hoc Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 3$ em quadruplicata). (H) Níveis de GSH nas linhagens celulares A549 e Calu3 tratadas com AUR (1 e 2,5 μM) e ML-385 (10 μM), sozinha ou associadas, por 24 h. * Diferente do grupo de controle/não tratado (ANOVA de uma via, post-hoc Tukey; $p < 0,05$). (I) Efeito da AUR associada com cisplatina sobre a viabilidade da linhagem celular A549 avaliada por MTT (72 h) e ensaios clonogênicos (10 dias). * Diferente das células não tratadas. # Diferente das células não tratadas e da cisplatina-sozinha/sem inibidor na mesma concentração (ANOVA de duas vias, post-hoc Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 3$ em quadruplicata). (J) Testes MTT mostrando o efeito de BSO, NAC e silenciamento de *NRF2* na citotoxicidade da cisplatina na linhagem celular A549 após 72 horas de tratamento. * Diferente do controle não tratado; #diferente do controle não tratado e da cisplatina isolada na mesma concentração (ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 3$ em triplicata). Legenda: AUR (auranofina); ctrl si (siRNA controle negativo).

7 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é um problema de saúde pública significativo em todo o mundo, inclusive no Brasil, sendo uma das principais causas de mortalidade relacionada as neoplasias. Embora a redução do tabagismo seja uma medida importante na prevenção da doença, muitos casos ainda são diagnosticados anualmente e frequentemente em estágios avançados. O tratamento disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) para pacientes com câncer de pulmão, particularmente o câncer de pulmão de células não pequenas, envolve geralmente quimioterapia (QT) adjuvante em combinação com radioterapia. Entre as opções de QT disponíveis e mais utilizadas como tratamento de primeira escolha, destacam-se compostos de platina, como a cisplatina e a carboplatina (GRIESINGER *et al.*, 2019).

Novas terapias direcionadas, apresentadas no quadro 2 desta tese (SIDDIK, 2003; GAINOR *et al.*, 2016; SKOULIDIS *et al.*, 2021; SCHAER *et al.*, 2019; MODI *et al.*, 2020; GAINOR *et al.*, 2016; MARCAR *et al.*, 2019), surgiram e cada vez mais ganham destaque. No entanto, além da dificuldade de acesso a esses tratamentos modernos e direcionados, devido à condição atual do SUS, somente os pacientes que “se encaixam” no estudo da pesquisa clínica conseguem acesso às imunoterapias e terapias alvo (pacientes em estágios avançados da doença (III e/ou IV) sem tratamento disponível pelo SUS) ou, pacientes que conseguem esse tratamento através de requisição judicial, devido ao elevado preço desses medicamentos.

Dados do TCGA juntamente com a pesquisa de Colisson *et al.* em 2014, demonstraram que os tumores pulmonares são heterogêneos em nível molecular, mesmo quando no mesmo tipo histológico. A pesquisa demonstrou em diferentes subtipos histológicos de cânceres de pulmão mutações em *TP53*, *KRAS*, *EGFR*, *PTEN*, *PIK3CA* e *AKT1*. Com o passar dos anos, novos alvos foram surgindo e observaram mutações importantes que afetam aproximadamente 30% da população com CPCNP, sendo essas as mutações na via de NRF2 (*NFE2L2*, *KEAP1* E *CUL3*) (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016). A ativação de mutações na via NRF2 é uma alteração genética observada em tipos selecionados de câncer, com CPCNP mostrando uma das maiores frequências desses genótipos (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2014; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2012). Mutação *missense* no gene *KEAP1* leva a perda de função de *KEAP1* e são enriquecidas em LUAD e LUSC, enquanto as mutações *NFE2L2* são mais associadas

a LUSC (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2014; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2012).

O fator de transcrição NRF2, emergiu como o "regulador mestre" da sobrevivência celular, coordenando a indução de genes antioxidantes citoprotetores, enzimas de detoxificação de fase II, transportadores de múltiplas drogas e vias metabólicas centrais (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007). Devido às suas funções citoprotetoras, a ativação da via de NRF2 tem sido um objetivo de estudos de quimioprevenção. Mas, mutações somáticas com perda de função em *KEAP1* levam à ativação constitutiva de NRF2 em CPCNP (SHIBATA *et al.*, 2008). Em suma, estudos de sequenciamento genômico usando tumores de CPCNP revelaram mutações frequentes e alterações somáticas do número de cópias levando a uma interação KEAP1-NRF2 prejudicada (OHTA *et al.*, 2008). Além do câncer de pulmão, mutações em *KEAP1* e *NFE2L2* foram relatadas em câncer de ovário, esôfago, cabeça e pescoço, vesícula biliar, próstata e rins (SHIBATA *et al.*, 2008; OOI *et al.*, 2011; SJOBLÖM *et al.*, 2006).

Estudos anteriores do nosso grupo (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016) e de outros grupos (NAMANI *et al.*, 2017; LEVINGS *et al.*, 2018; CAI *et al.*, 2019) demonstraram que a via mutante KEAP1/NRF2 confere expressão de vários genes antioxidantes e de detoxificação em tumores. A alta expressão da assinatura do gene alvo NRF2 foi associada a piores resultados quando comparada com as contrapartes de baixa assinatura (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; NAMANI *et al.*, 2017). Mais recentemente, evidências de múltiplos estudos de coorte de diferentes grupos sugeriram que os cânceres de pulmão mutantes da via NRF2 são um subtipo de doença único com um fenótipo agressivo, relacionado a um prognóstico ruim, metastático e resistente à quimioterapia (NAMANI *et al.*, 2017; NADAL; PALMERO; MUÑOZ-PINEDO, 2019; FRANK *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2021). Mesmo sabendo que a resistência à quimioterapia é um problema multifacetado com diversas manifestações clínicas que requerem uma compreensão tanto dos mecanismos básicos quanto da evolução dessa resistência à medida que o câncer progride, é possível identificar alguns fatores importantes que levam a piora deste quadro e, quem sabe, "controlar" essa resistência com as terapias direcionadas e suas associações.

Um estudo de coorte realizado em 2004, examinou o risco do desenvolvimento de câncer de pulmão entre fumantes de cigarros com teores médio, baixo e muito

baixo de alcatrão (produto líquido presente em partes voláteis proveniente da queima do carvão), que mantiveram o uso de tabaco por mais de dez anos, quando comparado com aos ex-tabagistas. Com isso, foi observado que independente do teor de alcatrão, os fumantes ativos apresentavam maior risco de câncer de pulmão em relação aos ex-tabagistas (HARRIS *et al.*, 2004). Já em nossa coorte de 65 pacientes com CPNPC, não foi possível observar uma relação significativa entre a alta/baixa expressão de TXNRD1 e fumantes ativos/ex-fumantes. Provavelmente devido ao baixo número de pacientes em nossa coorte.

A partir dos nossos achados, é possível discutir as características da coorte de pacientes com adenocarcinoma de pulmão e suas comorbidades mais prevalentes. Destacando hipertensão, DPOC, doença cardíaca, hipotireoidismo e *diabetes mellitus* tipo II como as comorbidades mais comuns observadas. A maioria dos pacientes foi diagnosticada em estágios I/II e submetidos a lobectomia, seguida ou não de quimiorradioterapia adjuvante. Os medicamentos mais utilizados na quimioterapia foram compostos de platina combinados com outras quimioterapias citotóxicas. Além disso, os resultados da análise mostraram que não houve associação entre os níveis de TXNRD1 e fatores como idade, sexo, raça, história de tabagismo, comorbidades, estágio da doença e subtipo histológico LUAD/LUSC (Tabela 2). Entretanto, em um trabalho que também teve uma coorte pequena (n = 66), indetificaram que a disfunção cardíaca ou pulmonar pode afetar o prognóstico de pacientes com CPCNP não operável. Embora essas condições sejam geralmente excluídas de ensaios clínicos para proteger os pacientes de efeitos colaterais potencialmente perigosos, os pacientes com disfunção cardíaca ou pulmonar em geral receberam tratamentos semelhantes aos pacientes sem essas condições. Nessa coorte, a idade avançada não afetou a viabilidade da radioterapia, porém, aumentou o risco de trombocitopenia e leucopenia (SEMRAU, *et al.*, 2008).

Altos níveis de TXNRD1 estavam associados a um DFS e DMFS mais curtas em pacientes em estágio inicial submetidos à ressecção do tumor. Uma DFS mais curta também foi observada no subgrupo de pacientes tratados com quimioterapia adjuvante. Com esses resultados destacamos a importância de avaliar os níveis de TXNRD1 para identificar pacientes com maior risco de recorrência e óbito. Ressaltando que a análise da progressão com base nos critérios RECIST não mostrou uma associação estatisticamente significativa com TXNRD1 em pacientes com doença irresssecável, porém, a análise foi limitada devido ao baixo número de

pacientes elegíveis para avaliação da sobrevida livre de progressão. Portanto, são necessários estudos adicionais com coortes maiores para confirmar esses resultados e investigar outros fatores que possam influenciar a progressão da doença em pacientes com adenocarcinoma de pulmão.

A IHC, técnica utilizada neste trabalho, é uma técnica importante na identificação e classificação de células específicas dentro de uma população celular heterogênea. Mesmo sabendo que nesta técnica os anticorpos nem sempre são específicos e podem reagir de maneira cruzada, resultando em resultados falso-positivos ou falso-negativos (YATABE, *et al.*, 2019). No contexto do câncer de pulmão, a IHC tem sido amplamente utilizada para a identificação de marcadores biológicos diagnósticos e prognósticos. Muitos laboratórios de anatomia patológica já possuem painéis mínimos de anticorpos disponíveis para complementar o diagnóstico.

A identificação de marcadores biológicos através de exames IHC é fundamental na rotina diagnóstica complementar do câncer de pulmão. A obtenção de amostras de biópsias é necessária para a realização do exame, sendo atualmente recomendado o uso de marcadores específicos como o marcador do adenocarcinoma (TTF-1 – Fator de transcrição da tireoide 1, Napsin-A – Proteinase Aspártica Funcional, CK7 – Citoqueratina 7), marcadores do carcinoma epidermóide (CK5/6 – Citoqueratina 5/6, P63 – Homólogo de p53 e P40 – Delta Np63 (produto truncado de p63)) e marcadores dos tumores neuroendócrinos (sinaptofisina, cromogranina e CD56 – molécula de adesão celular neuronal). Além disso, o uso de marcadores de outros tumores pode ser útil para investigação de metástase pulmonar, como o marcador CDX2 (*caudal type homeobox type 2*) de adenocarcinoma de cólon (GURDA *et al.*, 2015).

Outro avanço na área é o uso da tecnologia de sequenciamento de nova geração para direcionar o tratamento com terapias alvo de adenocarcinomas de pulmão, que tem modificado e melhorado o prognóstico do paciente. É recomendado que, no material das biópsias e/ou peças cirúrgicas de tumores de câncer de pulmão, sejam testadas mutações de *EGFR*, rearranjos do *EML4-ALK*, fusões de *ROS1*, mutações de *BRAF* e amplificações de *MET*. Esse perfil genético pode ser obtido pela combinação de técnicas de imunofluorescência (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR) e a IHC (HOFMAN *et al.*, 2019).

Ao avaliar o valor prognóstico de uma variedade de genes relacionados ao estresse oxidativo em coortes de CPCNP, identificamos genes alvo clássicos NRF2

associados a uma sobrevivência mais curta, como o par *TXNRD1/TXN*, enzimas da síntese de GSH - *GCLC* e *GCLM*, *NQO1* e *SRXN1* com *TXNRD1* apresentando a maior significância (Figura 9). Em uma coorte de pacientes com CPCNP, a *TXNRD1* foi detectável (escore de coloração IHC $\geq 1+$) em todas as amostras tumorais, sem associação entre os níveis de *TXNRD1* e as variáveis clinicopatológicas examinadas (Figura 10). E, esses resultados, estão de acordo com os dados de Boullosa *et al.*, 2021, em que em uma coorte de 72 pacientes LUAD; a *TXNRD1* foi detectável por IHC em cerca de 95% das amostras, mas nenhuma associação com características clinicopatológicas foi encontrada (BOULLOSA *et al.*, 2021). Ademais, encontramos uma sobreposição significativa entre alta coloração de *TXNRD1* e acúmulo nuclear de NRF2 em CPCNP. Corroborando nossos resultados, o NRF2 nuclear foi associado a uma pior sobrevida livre de recorrência em pacientes com carcinoma de células escamosas que receberam tratamento adjuvante (SOLIS *et al.*, 2010).

O escore alto de *TXNRD1* foi mais forte do que as variáveis clinicopatológicas na previsão de uma DFS e DMFS mais curtas em análises univariadas e multivariadas, enquanto com relação a doença avançada (estágio III e IV), no momento do diagnóstico, foi o preditor mais significativo de sobrevida global (OS). Na coorte de 72 pacientes mencionada acima, a *TXNRD1* não foi um preditor de OS ou sobrevida livre de progressão (PFS) (BOULLOSA *et al.*, 2021), embora seja importante mencionar que o método de escore de *TXNRD1* e a divisão de pacientes para análise de sobrevivência diferiram dos usados neste trabalho. Por outro lado, dados de grandes coortes como TCGA - LUAD (BOULLOSA *et al.*, 2021) e GSE67639 mostram uma associação entre o mRNA de *TXNRD1 upregulated* e um OS mais curto (Figura 10C).

As características clinicopatológicas e o período de acompanhamento da nossa coorte tornaram mais adequada a avaliação dos eventos DFS e DMFS. Portanto, coortes maiores que incluam pacientes com CPCNP em estágio avançado fornecerão melhores evidências de que o escore de *TXNRD1* por IHC tem alguma utilidade clínica na previsão de resultados de PFS e OS. A análise dos dados do TCGA em nível de mRNA confirmou nossas descobertas pela IHC. A expressão do gene *TXNRD1* não se associou nem ao estágio da doença, nem ao subtipo histológico (LUAD ou LUSC). Por outro lado, mutações em *KEAP1* e *NFE2L2* mostraram forte associação com a superexpressão de *TXNRD1* em tumores de pulmão. Além disso, os níveis de transcrição de *TXNRD1* correlacionaram-se com genes-alvo clássicos de NRF2 e a expressão do *regulon* de NRF2. Ademais, a IHC em CPCNP mostrou que apenas 1

dos 11 tumores que expressavam proteína NRF2 alta/nuclear apresentou escore de TXNRD1 baixo (Figura 11). Assim, a TXNRD1 pode ser um meio indireto de inferir a ativação da via NRF2.

Foi demonstrado que o câncer de pulmão mutante KEAP1/NRF2 é um subtipo de câncer de pulmão com um microambiente distinto, biologicamente heterogêneo e clinicamente subestimado (CAI *et al.*, 2019). Em geral, espera-se que a terapia direcionada dependa da detecção de marcadores moleculares no tecido tumoral ou biópsia líquida. No caso de NRF2, as mutações *NFE2L2* geralmente se agrupam em um dos motivos de interação KEAP1, sendo, DLG o motivo de ligação mais fraco e ETGE o motivo de ligação mais forte, enquanto as mutações KEAP1 podem ocorrer em vários locais da proteína (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2014; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2012). Nesse contexto, o teste genético para mutações ativadoras de NRF2 pode ser complexo, caro e demorado, pois tanto os genes *KEAP1* quanto *NFE2L2* devem ser testados idealmente. Além disso, a amplificação de *NFE2L2*, a deleção de *KEAP1* e as mutações de *CUL3* também parecem ditar a regulação da assinatura NRF2 (LEVINGS *et al.*, 2018); e a superexpressão de *TXNRD1*, conforme observado neste estudo. Assim, a detecção por IHC de NRF2 ou substitutos da atividade NRF2, como TXNRD1, pode ser clinicamente útil para identificar tumores com via NRF2 hiperativa, especialmente em ambientes de poucos recursos onde o teste genômico não está disponível ou não é padronizado em termos de prática laboratorial.

A auranofina é um medicamento antigo com mecanismo de ação, farmacocinética e perfil de segurança bem estabelecidos. E, apesar de TXNRD1 ser expresso constitutivamente e ser crucial para a homeostase da oxirredução de proteínas em praticamente todos os tipos celulares, há evidências crescentes de que linhagens de células cancerosas, inclusive do mesmo subtipo histológico, podem apresentar sensibilidade diferente à auranofina, como relatado em subconjuntos de linhagens de células de CPCNP (YAN *et al.*, 2019) e câncer de mama (RANINGA *et al.*, 2020).

Recentemente, nosso grupo (FALCHETTI *et al.*, 2023) identificou uma assinatura de resistência à auranofina a partir de experimentos com linhagens celulares de diferentes tipos de câncer, sólidos e hematológicos. Foi observado que células de hepatocarcinoma com tipo WT NRF2 - HepG2 e células de CPCNP - A549 com mutação *KEAP1* apresentaram os maiores valores de IC₅₀ de auranofina

(FALCHETTI *et al.*, 2023). A comparação entre os valores de IC₅₀ de auranofina em CPCNP com dados genômicos e transcricionais de um painel de células de câncer de pulmão confirmou que os níveis de TXNRD1 são fortemente elevados em células mutantes *KEAP1* e isso está relacionado com a resistência a auranofina. Em células mutantes *KEAP1* com alta expressão de *TXNRD1*, o tratamento concomitante com inibidores de AKT e TXNRD1 (MK2206 e auranofina) não conseguiu induzir citotoxicidade, enquanto as células de câncer de pulmão do tipo WT foram altamente sensíveis à combinação. O mecanismo de resistência mediado por KEAP1 ao inibidor de TXNRD1 parece envolver a síntese e reciclagem de GSH, uma vez que a deleção por CRISPR/Cas9 de *GCLC*, *GCLM* e *GSR* sensibilizou as células de câncer de pulmão DFC1024 e H2023 a auranofina (YAN *et al.*, 2019; DAI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

Em nosso modelo, o efeito sensibilizante do BSO e a proteção pela NAC confirmaram a sobrevivência dependente de GSH em células tratadas com auranofina (Figura 13). De fato, vários estudos demonstraram que a NAC combinada impede a morte celular, enquanto o BSO aumenta a morte celular em células tratadas com auranofina (KIEBALA *et al.*, 2015; TESSOULIN *et al.*, 2019; CLAPPER *et al.*, 2020; RANINGA *et al.*, 2020; KARSA *et al.*, 2021; FALCHETTI *et al.*, 2023). Também observamos que as células mutantes em *KEAP1* foram capazes de manter os níveis de GSH quando a TXNRD1 foi inibida, enquanto as células WT apresentaram depleção de GSH. Esse controle diferencial dos reservatórios de GSH pode explicar, pelo menos em parte, os valores de IC₅₀ mais altos de auranofina em linhagens celulares com mutação em *KEAP1*. A depleção de GSH com BSO também é capaz de tornar as linhagens celulares de mieloma múltiplo e câncer de mama mais sensíveis à auranofina, indicando que a síntese de GSH é uma via compensatória importante que mitiga o efeito deletério da inibição de TXNRD1.

Em nossos dados, observamos que a ativação de NRF2 pode contribuir para diminuir a suscetibilidade de mutantes de *KEAP1* a auranofina, visto que o direcionamento do NRF2 com siRNA e o inibidor farmacológico (ML-385) sensibilizou as células A549 ao inibidor de TXNRD1 (Figura 13). Na verdade, as células resistentes a auranofina apresentam superexpressão de vários genes-alvo clássicos de NRF2, como *GCLC*, *GCLM*, *NQO1* e *GSR*, além de *TXNRD1* (YAN *et al.*, 2019).

De acordo com Singh *et al.*, 2016, que descobriram e validaram o composto ML-385, foi detectado uma redução dependente da dose na atividade transcricional do

NRF2 (5-10 μ M ML-385, por 72 h). Eles também descobriram que houve uma diminuição dependente da dose na sinalização de NRF2 e a queda máxima foi em cerca de 72 h. Neste trabalho, eles transfectaram células A549 com um construto de repórter luciferase do gene promotor NRF2 e trataram essas células com ML-385 ou veículo. O tratamento com ML-385 levou a uma diminuição na atividade do promotor NRF2, o que foi consistente com a atividade da proteína NRF2 que regula sua própria transcrição. Neste mesmo artigo, os pesquisadores observaram uma redução dependente do tempo nos níveis de transcrição de enzimas de síntese e reciclagem de GSH, membros da família da TXN, e genes relacionados ao metabolismo da glicose em células A549 tratadas com ML-385.

Corroborando com os nossos dados, onde vimos uma redução notável na viabilidade celular com o uso de ML-385, assim como nos níveis de GSH. A auranofina foi capaz de esgotar mais GSH na linhagem celular Calu3, o que não foi possível observar na linhagem celular A549 (Figura 13H), precisamente porque A549 possui a mutação em KEAP1/NRF2 e, portanto, tem altos níveis de NRF2, podendo manter altos níveis de GSH e, consequentemente, é mais resistente à auranofina. Enquanto não notamos esse resultado na linhagem celular Calu3, precisamente porque ela não depende do sistema antioxidante. A depleção de GSH com BSO e um sistema de entrega de microRNA lentiviral para *knockdown* de TXNRD1 juntos diminuíram a viabilidade celular, enquanto nenhuma alteração foi observada com BSO e depleção de TXNRD1 sozinha (POERSCHKE; MOOS, 2011). Por outro lado, a redução de TXNRD1 em cerca de 90% causou apenas um leve efeito no crescimento celular das células A549, indicando que ou TXNRD1 não é essencial ou a atividade residual de TXNRD1 pode sustentar a proliferação das células A549 (ERIKSSON *et al.*, 2009).

Dados de um *screening* de CRISPR/Cas9 sugerem que TXNRD1 pode não ser essencial para a sobrevivência de células portadoras de mutações KEAP1, como A549. Em contraste, as células *KEAP1* mutantes são notavelmente dependentes de NRF2, conforme inferido a partir dos dados de CRISPR/Cas9 (Figura 13A), experimentos com ML-385 (Figura 13B) e sobrevivência clonogênica das células H460, A549 e BEAS2B tratadas com inibidor de NRF2 (SINGH *et al.*, 2016). No contexto da quimioterapia à base de platina, auranofina não sinergizou com cisplatina, por outro lado, o *knockdown* de NRF2 e a depleção de GSH sensibilizaram as células A459 ao composto de platina, de acordo com os dados prévios do nosso grupo e de outros grupos (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019).

Estudos metabolômicos são uma abordagem da área da metabolômica, que se concentra na identificação e quantificação de todas as moléculas metabólicas presentes em um sistema biológico. Buscando entender as alterações metabólicas que ocorrem em uma célula, tecido ou organismo em resposta a diferentes condições, como doenças, tratamentos ou exposições ambientais. No câncer de pulmão, os estudos metabolômicos estão sendo cada vez mais utilizados na identificação de biomarcadores úteis para diagnóstico, prognóstico e tratamento (XIE *et al.*, 2021).

Em estudos metabolômicos em um painel de linhagens celulares de câncer de pulmão revelaram que a GSH e seu precursor γ -glutamilcisteína são aumentados em linhagens celulares de CPCNP com alta assinatura de NRF2 (SAIGUSA *et al.*, 2020). Assim, uma hipótese de quimiorresistência baseada na superexpressão de TXNRD1 provavelmente não consegue explicar a recorrência mais rápida do tumor em pacientes com alta expressão de *TXNRD1* tratados com quimioterapia adjuvante à base de platina, em nossa coorte. A ativação de NRF2 após exposição à auranofina, bem como o efeito quimiossensibilizante de BSO e inibição/*knockdown* de NRF2 em células A549 tratadas com auranofina indicam que o bloqueio da atividade de TXNRD1 é contrabalançada por outros componentes do *regulon* de NRF2, como a via de GSH. Assim, postulamos que os resultados ruins observados em tumores/pacientes com alta expressão de TXNRD1 são resultado da hiperativação da via de NRF2 e não apenas da função aumentada de TXNRD1.

Os biomarcadores são divididos em várias categorias, incluindo diagnóstico, previsão do estágio da doença, prognóstico e escolha/evolução terapêutica. É importante destacar que existe uma ampla área de pesquisa voltada para o diagnóstico precoce do CPCNP. Por outro lado, os estudos que avaliam e predizem a resposta terapêutica têm aumentado significativamente nos últimos anos. Ademais, é importante ter biomarcadores auxiliares no diagnóstico por imagem, pois a triagem por tomografia computadorizada pode apresentar um alto índice de falsos positivos. Isso pode levar a algumas rodadas a mais de triagem, exposição à radiação, aumento de tempo e custos. Portanto, o desenvolvimento de biomarcadores complementares não invasivos pode ser muito útil para melhor estadiar o paciente e, com os resultados apresentados neste trabalho indicamos que a TXNRD1 pode ser um marcador substituto da ativação da via NRF2 e um potencial preditor de recorrência tumoral em CPCNP.

Por outro lado, TXNRD1, por si só, pode não ser responsável pelos fenótipos

malignos de tumores de pulmão mutantes *NFE2L2/KEAP1*. O perfil TXNRD1-alto é típico de tumores que carregam mutações ativadoras da via NRF2 e expressão do *regulon* NRF2, mas não outras alterações genéticas clássicas do CPCNP. Embora a TXNRD1 tenha o potencial de ser implementado como um substituto para testes genéticos de NRF2/KEAP1, estudos adicionais devem abordar se altos níveis de TXNRD1 se correlacionam com mutações ativadoras de NRF2 e desfechos da doença em coortes maiores de pacientes com CPCNP.

8 CONCLUSÃO

O trabalho realizado nesta tese fornece evidências de que a proteína TXNRD1 é um indicador de mau prognóstico, especialmente de recorrência tumoral e resistência à quimioterapia adjuvante, em pacientes com CPCNP. Os níveis de TXNRD1 parecem estar fortemente relacionados com a presença de mutações ativadoras da via KEAP1/NRF2, como determinado por análises de bioinformática e IHC em diferentes coortes de pacientes. Embora a TXNRD1 não seja um determinante-chave de fenótipos malignos em células mutantes *KEAP1*, ela pode ser considerada como um marcador indireto da hiperativação da via de NRF2 em CPCNP. Isso pode ter, até mesmo, aplicação na prática clínica, como o uso da IHC para TXNRD1 como um exame de baixo custo com capacidade de predizer uma eventual alteração genética na via de NRF2 em câncer. Ainda, o dado de resistência celular ao inibidor de tiorredoxina em tumores *KEAP1* mutantes, e o papel da GSH nessa resposta, também destacam a importância de investigar a relação entre TXNRD1 e outras vias de regulação redox e de sinalização no contexto de tumores KEAP1/NRF2 mutantes, a fim de desenvolver novas estratégias terapêuticas para pacientes com CPCNP.

REFERÊNCIAS

1. ADNANE, Lila et al. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. **Methods in enzymology**, v. 407, p. 597-612, 2006.
2. AGUADÉ-GORGORIÓ, Guim; SOLÉ, Ricard. Adaptive dynamics of unstable cancer populations: The canonical equation. **Evolutionary applications**, v. 11, n. 8, p. 1283-1292, 2018.
3. ARNÉR, Elias SJ; HOLMGREN, Arne. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6102-6109, 2000.
4. ASSI, Mohamad. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 313, n. 6, p. R646-R653, 2017.
5. BANNAI, Shiro. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 5, p. 2256-2263, 1986.
6. BANNISTER, A. J.; COOK, A.; KOUZARIDES, T. In vitro DNA binding activity of Fos/Jun and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. **Oncogene**, v. 6, n. 7, p. 1243-1250, 1991.
7. BARATA, Ana T. et al. Handgrip dynamometry and Patient-Generated Subjective Global Assessment in patients with nonresectable lung cancer. **Nutrition and cancer**, v. 69, n. 1, p. 154-158, 2017.
8. BASU, Ashis K. DNA damage, mutagenesis and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 970, 2018.
9. BEHAN, Fiona M. et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. **Nature**, v. 568, n. 7753, p. 511-516, 2019.
10. BENEDETTI, Angelo et al. Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids: identification of 4, 5-dihydroxydecanal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 792, n. 2, p. 172-181, 1984.
11. BENEDETTI, Angelo; COMPORTI, Mario; ESTERBAUER, Hermann. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 620, n. 2, p. 281-296, 1980.
12. BJELAKOVIC, Goran et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 297, n. 8, p. 842-857, 2007.
13. BJÖRNSTEDT, Mikael et al. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 20, p. 11761-11764, 1995.
14. BLUMENSCHNIG JR, George R. et al. Phase II, multicenter, uncontrolled trial of single-agent sorafenib in patients with relapsed or refractory, advanced non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 26, p. 4274-4280, 2009.
15. BODOKY, György et al. A phase II open-label randomized study to assess the efficacy and safety of selumetinib (AZD6244 [ARRY-142886]) versus capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer who

- have failed first-line gemcitabine therapy. **Investigational new drugs**, v. 30, p. 1216-1223, 2012.
16. BONNETAIN, Franck et al. Guidelines for time-to-event end-point definitions in trials for pancreatic cancer. Results of the DATECAN initiative (Definition for the Assessment of Time-to-event End-points in CANcer trials). **European journal of cancer**, v. 50, n. 17, p. 2983-2993, 2014.
 17. BOULLOSA, Laurie Freire et al. Auranofin reveals therapeutic anticancer potential by triggering distinct molecular cell death mechanisms and innate immunity in mutant p53 non-small cell lung cancer. **Redox biology**, v. 42, p. 101949, 2021.
 18. BRAICU, Cornelia et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1618, 2019.
 19. BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018
 20. BRAY, Freddie et al. Planning and developing population-based cancer registration in low-or middle-income settings. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon (FR) 2014.
 21. BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina; FLOHÉ, Leopold. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 8, p. 2335-2381, 2011.
 22. BYRD, David R. et al. **AJCC cancer staging manual**. New York: springer, 2017.
 23. CADENAS, Enrique; SIES, Helmut. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. **Advances in enzyme regulation**, v. 23, p. 217-237, 1985.
 24. CAI, Mei-Chun et al. Clinicopathological, microenvironmental and genetic determinants of molecular subtypes in KEAP1/NRF2-mutant lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 4, p. 788-801, 2019.
 25. CAI, Sabrina J. et al. Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. **Cell & bioscience**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2019.
 26. CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 519, 2012.
 27. CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 543, 2014.
 28. CEBULA, Marcus; SCHMIDT, Edward E.; ARNÉR, Elias SJ. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 10, p. 823-853, 2015.
 29. CHABNER, Bruce A.; LONGO, Dan L. **Manual de oncologia de Harrison**. Amgh Editora, 2015.
 30. CHAN, Bryan A.; HUGHES, Brett GM. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. **Translational lung cancer research**, v. 4, n. 1, p. 36, 2015.
 31. CHEN, Edward Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2013.
 32. CLAPPER, Erin et al. Cross-talk between Bcr-abl and the thioredoxin system in chronic myeloid leukaemia: implications for CML treatment. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 207, 2020.

33. CLARK, Owen et al. Oxovanadium-based inhibitors can drive redox-sensitive cytotoxicity in neuroblastoma cells and synergise strongly with buthionine sulfoximine. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 316-327, 2015.
34. CLOER, Erica W. et al. NRF2 activation in cancer: from DNA to protein. **Cancer research**, v. 79, n. 5, p. 889-898, 2019.
35. COLLISSON, E. A. C. J. et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 543-550, 2014.
36. CRISTESCU, Razvan et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade–based immunotherapy. **Science**, v. 362, n. 6411, p. eaar3593, 2018.
37. CURZIO, M. et al. Possible role of aldehydic lipid peroxidation products as chemoattractants. **International journal of tissue reactions**, v. 9, n. 4, p. 295-306, 1987.
38. DAI, Bingbing et al. KEAP1-dependent synthetic lethality induced by AKT and TXNRD1 inhibitors in lung cancer. **Cancer research**, v. 73, n. 17, p. 5532-5543, 2013.
39. DE BRUIN, Elza C. et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. **Science**, v. 346, n. 6206, p. 251-256, 2014.
40. DE LA VEGA, Montserrat Rojo; CHAPMAN, Eli; ZHANG, Donna D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. **Cancer cell**, v. 34, n. 1, p. 21-43, 2018.
41. DELGOBO, Marina et al. Thioredoxin reductase-1 levels are associated with NRF2 pathway activation and tumor recurrence in non-small cell lung cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 177, p. 58-71, 2021.
42. DENICOLA, Gina M. et al. NRF2 regulates serine biosynthesis in non–small cell lung cancer. **Nature genetics**, v. 47, n. 12, p. 1475-1481, 2015.
43. DETTERBECK, Frank C. et al. The eighth edition lung cancer stage classification. **Chest**, v. 151, n. 1, p. 193-203, 2017.
44. DICKINSON, Dale A. et al. 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 7, p. 974-987, 2002.
45. DING, Li et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1069-1075, 2008.
46. DIXON, Scott J. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.
47. DUMA, Narjust; SANTANA-DAVILA, Rafael; MOLINA, Julian R. Non–small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2019. p. 1623-1640.
48. EL-KHATEEB, Mahmoud et al. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 77, n. 1-2, p. 13-21, 1999.
49. ERIKSSON, Sofi E. et al. High levels of thioredoxin reductase 1 modulate drug-specific cytotoxic efficacy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1661-1671, 2009.
50. ESTERBAUER, H.; WEGER, W. About the effects of aldehydes on healthy and malignant cells. 3. Synthesis of homologous 4-hydroxy-2-alkenals, II. **Monatshefte für Chemie**, v. 98, p. 1884-1897, 1967.

51. ESTERBAUER, Hermann et al. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. **Biochemical Journal**, v. 208, n. 1, p. 129-140, 1982.
52. FALCHETTI, Marcelo et al. Omics-based identification of an NRF2-related auranofin resistance signature in cancer: Insights into drug repurposing. **Computers in Biology and Medicine**, v. 152, p. 106347, 2023.
53. FISKUS, Warren et al. Auranofin induces lethal oxidative and endoplasmic reticulum stress and exerts potent preclinical activity against chronic lymphocytic leukemia. **Cancer research**, v. 74, n. 9, p. 2520-2532, 2014.
54. FITZMAURICE, Christina et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.
55. Food and Drug Administration – FDA - Guidance for Industry: “SPL Standard for Content of Labeling Technical Qs and As”. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - These highlights do not include all the information needed to use NEXAVAR safely and effectively. Reference ID: 4357655. 2018.
56. FORMAN, Henry Jay. Glutathione—From antioxidant to post-translational modifier. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 595, p. 64-67, 2016.
57. FRANCO, R. et al. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 113, n. 4-5, p. 234-258, 2007.
58. FRANK, Rieke et al. Clinical and Pathological Characteristics of KEAP1-and NFE2L2-Mutated Non–Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) KEAP1–NFE2L2 Mutations in Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 13, p. 3087-3096, 2018.
59. GAINOR, Justin F. et al. EGFR mutations and ALK rearrangements are associated with low response rates to PD-1 pathway blockade in non–small cell lung cancer: a retrospective analysis. **Clinical cancer research**, v. 22, n. 18, p. 4585-4593, 2016.
60. GELAIN, Daniel P. et al. A systematic review of human antioxidant genes. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 14, n. 12, p. 4457-4463, 2009.
61. GOEMAN, Frauke et al. Mutations in the KEAP1-NFE2L2 pathway define a molecular subset of rapidly progressing lung adenocarcinoma. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1924-1934, 2019.
62. GONÇALVES, Rosângela Mayer et al. COX-2 promotes mammary adipose tissue inflammation, local estrogen biosynthesis, and carcinogenesis in high-sugar/fat diet treated mice. **Cancer Letters**, v. 502, p. 44-57, 2021.
63. GOODMAN, Louis S. et al. Nitrogen mustard therapy: Use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. **Journal of the American Medical Association**, v. 132, n. 3, p. 126-132, 1946.
64. GÖTZ, Rudolf. Inter-cellular adhesion disruption and the RAS/RAF and beta-catenin signalling in lung cancer progression. **Cancer cell international**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2008.
65. GREULICH, Heidi et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and-resistant EGFR mutants. **PLoS medicine**, v. 2, n. 11, p. e313, 2005.

66. GREULICH, Heidi. The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. **Genes & cancer**, v. 1, n. 12, p. 1200-1210, 2010.
67. GRIDELLI, Cesare et al. Second-line treatment of advanced non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 3, n. 4, p. 430-440, 2008.
68. GRIESINGER, Frank 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, 2019.
69. GRUNE, Tilman et al. Postischemic accumulation of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine. **Life sciences**, v. 55, n. 9, p. 693-699, 1994.
70. GURDA, Grzegorz T. et al. Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases. **Clinical and translational medicine**, v. 4, p. 1-13, 2015.
71. GUTTERIDGE, John MC; HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 899, n. 1, p. 136-147, 2000.
72. HANAHAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.
73. HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
74. HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
75. HARRIS, Jeffrey E. et al. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. **Bmj**, v. 328, n. 7431, p. 72, 2004.
76. HOFMAN, Paul et al. Multiplexed immunohistochemistry for molecular and immune profiling in lung cancer—just about ready for prime-time?. **Cancers**, v. 11, n. 3, p. 283, 2019.
77. HOU, Guo-Xin et al. Elimination of stem-like cancer cell side-population by auranofin through modulation of ROS and glycolysis. **Cell death & disease**, v. 9, n. 2, p. 1-15, 2018.
78. HU, Jing et al. Auranofin enhances Ibrutinib's anticancer activity in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. **Molecular cancer therapeutics**, v. 17, n. 10, p. 2156-2163, 2018.
79. HUANG, H.-C.; NGUYEN, Truyen; PICKETT, Cecil B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42769-42774, 2002.
80. HUANG, Ruili et al. The NCATS BioPlanet—an integrated platform for exploring the universe of cellular signaling pathways for toxicology, systems biology, and chemical genomics. **Frontiers in pharmacology**, p. 445, 2019.
81. HUTCHINSON, Barry D. et al. Spectrum of lung adenocarcinoma. In: **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. WB Saunders, 2019. p. 255-264.
82. IMYANITOV, Evgeny N.; IYEVLEVA, Aglaya G.; LEVCHENKO, Evgeny V. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 157, p. 103194, 2021.

83. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Câncer de pulmão. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>> 2020.
84. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Câncer de pulmão. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2023/inca-projeta-queda-de-28-na-probabilidade-de-mortalidade-prematura-por-cancer-de-pulmao-em-homens>> 2023.
85. JARAMILLO, Melba C.; ZHANG, Donna D. The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes & development**, v. 27, n. 20, p. 2179-2191, 2013.
86. KADARA, H. et al. Whole-exome sequencing and immune profiling of early-stage lung adenocarcinoma with fully annotated clinical follow-up. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 1, p. 75-82, 2017.
87. KARSA, Mawar et al. Exploiting the reactive oxygen species imbalance in high-risk paediatric acute lymphoblastic leukaemia through auranofin. **British Journal of Cancer**, v. 125, n. 1, p. 55-64, 2021.
88. KASTAN, M. B. Bartek, 2004, J. **Cell-cycle checkpoints and cancer**, *Nature*, v. 432, n. 7015, p. 316-323.
89. KENSLER, Thomas W.; WAKABAYASHI, Nobunao; BISWAL, Shyam. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 89-116, 2007.
90. KHALIL, Roula; DIAB-ASSAF, Mona; LEMAITRE, Jean-Marc. Emerging Therapeutic Approaches to Target the Dark Side of Senescent Cells: New Hopes to Treat Aging as a Disease and to Delay Age-Related Pathologies. **Cells**, v. 12, n. 6, p. 915, 2023.
91. KIEBALA, Michelle et al. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione antioxidant systems in malignant B cells: a novel synergistic therapeutic approach. **Experimental hematology**, v. 43, n. 2, p. 89-99, 2015.
92. KOBAYASHI, Susumu et al. EGFR mutation and resistance of non–small-cell lung cancer to gefitinib. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 8, p. 786-792, 2005.
93. KULESHOV, Maxim V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W90-W97, 2016.
94. KUMAR, Vinay et al. **Robbins patologia básica**. Elsevier Brasil, 2008.
95. LAURENT, Torvard C.; MOORE, E. Colleen; REICHARD, Peter. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides: IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 10, p. 3436-3444, 1964.
96. LEVINGS, Daniel 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, 2018.
97. LEVY, Smadar; FORMAN, Henry Jay. C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements. **IUBMB life**, v. 62, n. 3, p. 237-246, 2010.
98. LI, Hongyu et al. Auranofin-mediated inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis and anticancer activity in non-small cell lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 3548, 2016.
99. LI, Qiwei et al. The effects of buthionine sulfoximine on the proliferation and apoptosis of biliary tract cancer cells induced by cisplatin and gemcitabine. **Oncology letters**, v. 11, n. 1, p. 474-480, 2016.

100. LI, Yu et al. Erastin/sorafenib induces cisplatin resistant non small cell lung cancer cell ferroptosis through inhibition of the Nrf2/xCT pathway. **Oncology letters**, v. 19, n. 1, p. 323-333, 2020.
101. LI, Yun; PAONESSA, Joseph D.; ZHANG, Yuesheng. Mechanism of chemical activation of Nrf2. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35122, 2012.
102. LIU, Qian et al. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. **Molecular cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2018.
103. LV, Hongwei et al. Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2. **NPJ precision oncology**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2018.
104. LYNCH, Thomas J. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 21, p. 2129-2139, 2004.
105. MAEDA, H. et al. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 7, p. 737-746, 2004.
106. MAHAFFEY, Christopher M. et al. Multidrug-resistant protein-3 gene regulation by the transcription factor Nrf2 in human bronchial epithelial and non-small-cell lung carcinoma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1650-1657, 2009.
107. MANNELLI, Lorenzo Di Cesare et al. Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Experimental neurology**, v. 261, p. 22-33, 2014.
108. MARCAR, Lynnette et al. Acquired resistance of EGFR-mutated lung cancer to tyrosine kinase inhibitor treatment promotes PARP inhibitor sensitivity. **Cell reports**, v. 27, n. 12, p. 3422-3432. e4, 2019.
109. MARCHETTI, Antonio et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 26, p. 3574-3579, 2011.
110. MATTHEWS, James R. et al. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphid bond involving cysteine 62. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 15, p. 3821-3830, 1992.
111. MAUGUEN, Audrey et al. Surrogate endpoints for overall survival in chemotherapy and radiotherapy trials in operable and locally advanced lung cancer: a re-analysis of meta-analyses of individual patients' data. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 7, p. 619-626, 2013.
112. MAULIK, Nilanjana; DAS, Dipak K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1368-1382, 2008.
113. MEADOR, Catherine B.; HATA, Aaron N. Acquired resistance to targeted therapies in NSCLC: Updates and evolving insights. **Pharmacology & therapeutics**, v. 210, p. 107522, 2020.
114. MEYERS, Robin M. et al. Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells. **Nature genetics**, v. 49, n. 12, p. 1779-1784, 2017.
115. MODI, Shanu et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 7, p. 610-621, 2020.

116. MOI, Paolo et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 21, p. 9926-9930, 1994.
117. MÜLLER, Thomas; HENGSTERMANN, Arnd. Nrf2: friend and foe in preventing cigarette smoking-dependent lung disease. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 9, p. 1805-1824, 2012.
118. NADAL, Ernest; PALMERO, Ramon; MUÑOZ-PINEDO, Cristina. Mutations in the antioxidant KEAP1/NRF2 pathway define an aggressive subset of NSCLC resistant to conventional treatments. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1881-1883, 2019.
119. NAKAJIMA, Erica C. et al. FDA approval summary: sotorasib for KRAS G12C-mutated metastatic NSCLC. **Clinical Cancer Research**, v. 28, n. 8, p. 1482-1486, 2022.
120. NAMANI, Akhileshwar et al. NRF2-regulated metabolic gene signature as a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69847, 2017.
121. NASSOUR, Joe et al. Telomere-to-mitochondria signalling by ZBP1 mediates replicative crisis. **Nature**, p. 1-7, 2023.
122. NGUYEN, Truyen et al. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element: degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4536-4541, 2003.
123. NGUYEN, Truyen; NIOI, Paul; PICKETT, Cecil B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13291-13295, 2009.
124. NGUYEN, Truyen; SHERRATT, Philip J.; PICKETT, Cecil B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 43, n. 1, p. 233-260, 2003.
125. NIGRO, Janice M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, n. 6250, p. 705-708, 1989.
126. NITURE, Suryakant K. et al. Nrf2 signaling and cell survival. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 244, n. 1, p. 37-42, 2010.
127. NOORELDEEN, Reem; BACH, Horacio. Current and future development in lung cancer diagnosis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, p. 8661, 2021.
128. NORDBERG, Jonas; ARNÉR, Elias SJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
129. NOVELLO, Silvia et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 27, p. v1-v27, 2016.
130. NOVIKOV, Nikita M. et al. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. **British journal of cancer**, v. 124, n. 1, p. 102-114, 2021.
131. OHTA, Tsutomu et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. **Cancer research**, v. 68, n. 5, p. 1303-1309, 2008.

132. OLAGNIER, David et al. Nrf2 negatively regulates STING indicating a link between antiviral sensing and metabolic reprogramming. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3506, 2018.
133. OMATA, Yo et al. Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 6, p. 882-890, 2006.
134. OOI, Aikseng et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. **Cancer cell**, v. 20, n. 4, p. 511-523, 2011.
135. ORLOWSKI, Marian; MEISTER, Alton. The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 67, n. 3, p. 1248-1255, 1970.
136. PAEZ, J. Guillermo et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1497-1500, 2004.
137. PAO, William et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 36, p. 13306-13311, 2004.
138. PAO, William; CHMIELECKI, Juliann. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 11, p. 760-774, 2010.
139. PIÑERO, Marion et al. Scaling up the surveillance of childhood cancer: a global roadmap. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 113, n. 1, p. 9-15, 2021.
140. POERSCHKE, Robyn L.; MOOS, Philip J. Thioredoxin reductase 1 knockdown enhances selenazolidine cytotoxicity in human lung cancer cells via mitochondrial dysfunction. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 211-221, 2011.
141. POWIS, Garth; MONTFORT, William R. Properties and biological activities of thioredoxins. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, n. 1, p. 261-295, 2001.
142. RAMALINGAM, Suresh; BELANI, Chandra. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. **The oncologist**, v. 13, n. S1, p. 5-13, 2008.
143. RANINGA, Prahlad V. et al. Therapeutic cooperation between auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor and anti-PD-L1 antibody for treatment of triple-negative breast cancer. **International journal of cancer**, v. 146, n. 1, p. 123-136, 2020.
144. RAPP, Edna et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer--report of a Canadian multicenter randomized trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 4, p. 633-641, 1988.
145. REITSMA, P. H. et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. **Thrombosis and haemostasis**, v. 73, n. 05, p. 876-889, 1995.
146. RINEHART, John et al. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 22, n. 22, p. 4456-4462, 2004.

147. ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.
148. ROBINSON, Mark D.; OSHLACK, Alicia. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome biology**, v. 11, n. 3, p. 1-9, 2010.
149. ROBLEDINOS-ANTÓN, Natalia et al. Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.
150. ROMERO, Rodrigo et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. **Nature medicine**, v. 23, n. 11, p. 1362-1368, 2017.
151. RUSHMORE, Thomas H.; MORTON, Marcia R.; PICKETT, Cecil B. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 18, p. 11632-11639, 1991.
152. SAHA, Trishna et al. Invasion and metastasis as a central hallmark of breast cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 16, p. 3498, 2021.
153. SAIGUSA, Daisuke et al. Impacts of NRF2 activation in non-small-cell lung cancer cell lines on extracellular metabolites. **Cancer science**, v. 111, n. 2, p. 667-678, 2020.
154. SAKURAI, Atsuko et al. Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2. **Journal of cellular physiology**, v. 203, n. 3, p. 529-537, 2005.
155. SÁNCHEZ-ORTEGA, Miriam; CARRERA, Ana Clara; GARRIDO, Antonio. Role of NRF2 in Lung Cancer. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1879, 2021.
156. SASAKI, Hiromi et al. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44765-44771, 2002.
157. SCHABATH, Matthew B.; COTE, Michele L. Cancer progress and priorities: lung cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 28, n. 10, p. 1563-1579, 2019.
158. SCHAER, David A. et al. The folate pathway inhibitor pemetrexed pleiotropically enhances effects of cancer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 23, p. 7175-7188, 2019.
159. SCHAFER, Freya Q.; BUETTNER, Garry R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free radical biology and medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.
160. SEMRAU, S. et al. Impact of comorbidity and age on the outcome of patients with inoperable NSCLC treated with concurrent chemoradiotherapy. **Respiratory medicine**, v. 102, n. 2, p. 210-218, 2008.
161. SHIBATA, Tatsuhiro et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13568-13573, 2008.
162. SIDDIK, Zahid H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265-7279, 2003.

163. SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.
164. SILVA, Matheus Molina et al. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 17639, 2019.
165. SIM, Keng Yeow; SIMS, James J.; GEISSMAN, Theodore A. Constituents of *Brucea sumatrana*. I. Brusatol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 429-431, 1968.
166. SINGH, Anju et al. NRF2 activation promotes aggressive lung cancer and associates with poor clinical outcomes. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 3, p. 877-888, 2021.
167. SINGH, Anju 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, 2016.
168. SJOBLOM, Tobias et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. **science**, v. 314, n. 5797, p. 268-274, 2006.
169. SKAPEK, Stephen X. et al. Enhanced melphalan cytotoxicity following buthionine sulfoximine-mediated glutathione depletion in a human medulloblastoma xenograft in athymic mice. **Cancer research**, v. 48, n. 10, p. 2764-2767, 1988.
170. SKOULIDIS, Ferdinandos et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p. G12C mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 25, p. 2371-2381, 2021.
171. SKOULIDIS, Ferdinandos; HEYMACH, John V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 9, p. 495-509, 2019.
172. SOLIS, Luisa M. et al. Nrf2 and Keap1 Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Association with Clinicopathologic Features Nrf2/Keap1 in NSCLC. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 14, p. 3743-3753, 2010.
173. STRICKLER, John G. et al. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. **Cancer research**, v. 54, n. 17, p. 4750-4755, 1994.
174. SUHAIL, Yasir et al. Systems biology of cancer metastasis. **Cell systems**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.
175. SUTHERLAND, Mark W. et al. Effects of t-butyl hydroperoxide on NADPH, glutathione, and the respiratory burst of rat alveolar macrophages. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 243, n. 2, p. 325-331, 1985.
176. SUTHERLAND, Mark W. et al. Oxygen toxicity: loss of lung macrophage function without metabolite depletion. **Journal of free radicals in biology & medicine**, v. 1, n. 3, p. 209-214, 1985.
177. TAGUCHI, Keiko; MOTOHASHI, Hozumi; YAMAMOTO, Masayuki. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes to cells**, v. 16, n. 2, p. 123-140, 2011.
178. TAKAHASHI, Takashi et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. **Science**, v. 246, n. 4929, p. 491-494, 1989.
179. TANOUE, Lynn T. Lung cancer staging. **Clinics in chest medicine**, v. 41, n. 2, p. 161-174, 2020.

180. TESSOULIN, Benoit et al. Targeting oxidative stress with auranofin or Prima-1Met to Circumvent p53 or Bax/Bak deficiency in myeloma cells. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 128, 2019.
181. TRACHOOTHAM, Dunyaporn; ALEXANDRE, Jerome; HUANG, Peng. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 579-591, 2009.
182. TRAVIS, William 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, 2010.
183. TRAVIS, William D.; BRAMBILLA, Elisabeth; RIELY, Gregory J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 8, p. 992-1001, 2013.
184. URAMOTO, Hidetaka; TANAKA, Fumihiro. Recurrence after surgery in patients with NSCLC. **Translational lung cancer research**, v. 3, n. 4, p. 242, 2014.
185. URIG, Sabine; BECKER, Katja. On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2006. p. 452-465.
186. VAZQUEZ, Alexei et al. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 12, p. 979-987, 2008.
187. WANG, Qingsong et al. Prognostic and clinicopathological significance of NRF2 expression in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. **Plos one**, v. 15, n. 11, p. e0241241, 2020.
188. WILHELM, Scott et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 10, p. 835-844, 2006.
189. WILHELM, Scott M. et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. **Cancer research**, v. 64, n. 19, p. 7099-7109, 2004.
190. XIE, Ying et al. Early lung cancer diagnostic biomarker discovery by machine learning methods. **Translational oncology**, v. 14, n. 1, p. 100907, 2021.
191. YAN, Xiang et al. Inhibition of Thioredoxin/Thioredoxin Reductase Induces Synthetic Lethality in Lung Cancers with Compromised Glutathione Homeostasis Targeting Cancers with Glutathione Reductase Deficiency. **Cancer research**, v. 79, n. 1, p. 125-132, 2019.
192. YAN, Zhongyi et al. OSluca: an interactive web server to evaluate prognostic biomarkers for lung cancer. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 420, 2020.
193. YATABE, Yasushi et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. **Journal of thoracic oncology**, v. 14, n. 3, p. 377-407, 2019.
194. ZANOTTO-FILHO, Alfeu et al. Alkylating agent-induced NRF2 blocks endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via control of glutathione pools and protein thiol homeostasis. **Molecular cancer therapeutics**, v. 15, n. 12, p. 3000-3014, 2016.

195. ZHANG, Hongqiao et al. 4-Hydroxynonenal increases γ -glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 4, p. 463-471, 2005.
196. ZHANG, Hongqiao; COURT, Nathalie; FORMAN, Henry Jay. Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells. **Redox Report**, v. 12, n. 1-2, p. 101-106, 2007.
197. ZHAO, Bochen et al. Effect of Angelica sinensis root extract on cancer prevention in different stages of an AOM/DSS mouse model. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, p. 1750, 2017.
198. ZHIHUA, Li et al. Fast response ammonia sensor based on porous thin film of polyaniline/sulfonated nickel phthalocyanine composites. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 553-562, 2016.
199. ZHU, Jiajun et al. Transsulfuration activity can support cell growth upon extracellular cysteine limitation. **Cell metabolism**, v. 30, n. 5, p. 865-876, 2019.
200. ZOU, Peng et al. Auranofin induces apoptosis by ROS-mediated ER stress and mitochondrial dysfunction and displayed synergistic lethality with piperlongumine in gastric cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 36505, 2015.

APÊNDICE – A

Para complementar a argumentação deste trabalho, trago aqui os dados suplementares referentes ao artigo de DELGOBO *et al.* (2021). Acredito que, desta forma, visualizar estes dados no apêndice facilitará a leitura deste trabalho. Com isso, seguimos para o primeiro dado suplementar.

A tabela suplementar 1 complementa os dados referentes aos resultados presente no tópico 6.1 - A Expressão da Tiorredoxina Redutase-1 Correlaciona-se com a Baixa Sobrevida no Câncer de Pulmão: Comparação com um Conjunto de Genes Relacionados ao Estresse Oxidativo.

Tabela Suplementar 1 – Resultados Resumidos da Análise OSLuca de Genes Relacionados ao Estresse Oxidativo como Potenciais Preditores de Sobrevida em Pacientes com Câncer de Pulmão

(continua)

Gene	Combined HR	CI 95% upper	CI 95% lower	Adj. p-valor	OS
<i>TXNRD1</i>	1.39	1.52	1.27	<0.0001	Ruim
<i>TXN</i>	1.37	1.50	1.25	<0.0001	Ruim
<i>MT2A</i>	1.29	1.41	1.17	<0.0001	Ruim
<i>SRXN1</i>	1.27	1.43	1.13	0.0001	Ruim
<i>GCLM</i>	1.25	1.38	1.14	<0.0001	Ruim
<i>TXNDC9</i>	1.25	1.37	1.14	<0.0001	Ruim
<i>NQO1</i>	1.23	1.35	1.12	<0.0001	Ruim
<i>GCLC</i>	1.23	1.35	1.12	<0.0001	Ruim
<i>TXNRD3</i>	1.22	1.46	1.02	0.0302	Ruim
<i>PRDX1</i>	1.20	1.31	1.09	0.0001	Ruim
<i>GLRX2</i>	1.18	1.29	1.07	0.0006	Ruim
<i>TMX2</i>	1.17	1.30	1.06	0.0018	Ruim
<i>GPX2</i>	1.17	1.29	1.07	0.0009	Ruim
<i>GLRX5</i>	1.15	1.27	1.05	0.0032	Ruim
<i>LPO</i>	1.15	1.26	1.05	0.0031	Ruim
<i>TMX1</i>	1.15	1.27	1.03	0.009	Ruim
<i>GLRX3</i>	1.14	1.26	1.03	0.0091	Ruim
<i>GSR</i>	1.13	1.24	1.03	0.0086	Ruim
<i>TXNL4A</i>	1.13	1.24	1.03	0.0128	Ruim
<i>MT1X</i>	1.11	1.22	1.01	0.0313	Ruim
<i>MT1A</i>	1.14	1.33	0.97	0.1112	ns
<i>MT1H</i>	1.10	1.22	0.99	0.0872	ns
<i>MT1G</i>	1.09	1.20	0.99	0.0731	ns
<i>CBR3</i>	1.09	1.19	0.99	0.0819	ns

Tabela Suplementar 1 – Resultados Resumidos da Análise OSluca de Genes Relacionados ao Estresse Oxidativo como Potenciais Preditores de Sobrevida em Pacientes com Câncer de Pulmão

(conclusão)

Gene	Combined HR	CI 95% upper	CI 95% lower	Adj. p-valor	OS
<i>SOD1</i>	1.08	1.19	0.98	0.1008	ns
<i>GPX1</i>	1.08	1.19	0.97	0.1759	ns
<i>PRDX4</i>	1.07	1.18	0.98	0.1464	ns
<i>GLRX</i>	1.07	1.18	0.97	0.1592	ns
<i>MPO</i>	1.07	1.17	0.97	0.1790	ns
<i>TXNDC8</i>	1.05	1.20	0.92	0.4292	ns
<i>PRDX2</i>	1.04	1.15	0.95	0.4045	ns
<i>TXNDC12</i>	1.04	1.18	0.92	0.5243	ns
<i>PRDX3</i>	1.04	1.14	0.94	0.4637	ns
<i>NXNL1</i>	1.03	1.18	0.91	0.6071	ns
<i>TMX3</i>	1.02	1.17	0.89	0.755	ns
<i>SOD2</i>	1.02	1.11	0.93	0.6661	ns
<i>PRDX6</i>	1.02	1.12	0.92	0.7363	ns
<i>TXNDC2</i>	1.01	1.14	0.90	0.8371	ns
<i>TXNL1</i>	0.95	1.05	0.87	0.3274	ns
<i>NME8</i>	0.95	1.08	0.84	0.4408	ns
<i>CRB1</i>	0.95	1.05	0.86	0.3088	ns
<i>ERP44</i>	0.95	1.05	0.85	0.3129	ns
<i>MT1M</i>	0.95	1.05	0.86	0.2753	ns
<i>MT1B</i>	0.94	1.11	0.80	0.4630	ns
<i>TXN2</i>	0.94	1.04	0.85	0.2131	ns
<i>NME9</i>	0.92	1.06	0.80	0.2665	ns
<i>TXNRD2</i>	0.92	1.02	0.83	0.0989	ns
<i>TXNDC17</i>	0.92	1.05	0.81	0.2140	ns
<i>PRDX5</i>	0.89	1.01	0.79	0.0682	ns
<i>SELENOP</i>	0.88	1.12	0.70	0.3064	ns
<i>GPX5</i>	0.89	0.98	0.81	0.0191	Bom
<i>TXNIP</i>	0.88	0.98	0.80	0.0158	Bom
<i>MSRA</i>	0.86	0.95	0.78	0.0026	Bom
<i>GPX4</i>	0.85	0.94	0.77	0.0017	Bom
<i>GPX3</i>	0.85	0.94	0.77	0.0014	Bom
<i>EPHX1</i>	0.84	0.93	0.76	0.0007	Bom
<i>TXNDC5</i>	0.84	0.96	0.74	0.0109	Bom
<i>SOD3</i>	0.81	0.89	0.73	<0.0001	Bom
<i>TMX4</i>	0.79	0.88	0.70	<0.0001	Bom
<i>CAT</i>	0.73	0.81	0.66	<0.0001	Bom
<i>TXNDC11</i>	0.69	0.79	0.61	<0.0001	Bom

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: HR: hazard ratio; CI: interval de confiança; OS (overall survival); ns: *non-significant*.

As tabelas suplementares 2, 3, 4, 5 e 6, em seguida, complementam os dados referentes aos resultados presente no tópico 6.3 - *TXNRD1* é Regulada Positivamente em Tumores que Abrigam Mutações KEAP1/NRF2 e se Correlaciona com a Expressão do *Regulon* NRF2.

Tabela Suplementar 2 – Top-50 Genes Correlacionados com a Expressão de mRNA *TXNRD1* em Coortes de CPCNP Provenientes do TCGA

(continua)

LUAD - TCGA				LUSC - TCGA			
Gene	ensembl_gene_id	R ² estimate	p-valor	Gene	ensembl_gene_id	R ² estimate	p-valor
<i>SRXN1</i>	ENSG0000027130 3	0.763175	2.32E-114	<i>SRXN1</i>	ENSG0000027130 3	0.833641	1.17E-143
<i>GCLM</i>	ENSG0000002390 9	0.755591	7.39E-111	<i>OSGIN1</i>	ENSG0000014096 1	0.821175	7.50E-136
<i>NMRAL2P</i>	ENSG0000017165 8	0.709097	6.80E-92	<i>AL033397.1</i>	ENSG0000023168 3	0.816806	2.94E-133
<i>UGDH</i>	ENSG0000010981 4	0.70353	7.14E-90	<i>ME1</i>	ENSG0000006583 3	0.808475	1.69E-128
<i>TRIM16L</i>	ENSG0000010844 8	0.685093	1.67E-83	<i>CYP4F3</i>	ENSG0000018652 9	0.790338	6.63E-119
<i>GSR</i>	ENSG0000010468 7	0.678865	1.85E-81	<i>SLC7A11</i>	ENSG0000015101 2	0.789361	2.05E-118
<i>NEIL3</i>	ENSG0000010967 4	0.663757	1.06E-76	<i>AC005336.1</i>	ENSG0000026705 6	0.786495	5.40E-117
<i>ME1</i>	ENSG0000006583 3	0.649622	1.70E-72	<i>TALDO1</i>	ENSG0000017715 6	0.785155	2.45E-116
<i>GCLC</i>	ENSG0000000108 4	0.646608	1.25E-71	<i>PTGR1</i>	ENSG0000010685 3	0.776648	2.85E-112
<i>PGD</i>	ENSG0000014265 7	0.645691	2.30E-71	<i>TRIM16L</i>	ENSG0000010844 8	0.774796	2.07E-111
<i>G6PD</i>	ENSG0000016021 1	0.643937	7.24E-71	<i>AKR1C1</i>	ENSG0000018713 4	0.77365	6.99E-111
<i>CYP4F3</i>	ENSG0000018652 9	0.643823	7.80E-71	<i>CYP4F11</i>	ENSG0000017190 3	0.77267	1.97E-110
<i>AKR1C2</i>	ENSG0000015163 2	0.640506	6.70E-70	<i>G6PD</i>	ENSG0000016021 1	0.767228	5.63E-108
<i>ABCC2</i>	ENSG0000002383 9	0.636632	7.99E-69	<i>NQO1</i>	ENSG0000018101 9	0.765732	2.60E-107
<i>NR0B1</i>	ENSG0000016929 7	0.629591	6.61E-67	<i>MAFG</i>	ENSG0000019706 3	0.761673	1.55E-105
<i>HTATIP2</i>	ENSG0000010985 4	0.622774	4.27E-65	<i>GSR</i>	ENSG0000010468 7	0.761521	1.80E-105
<i>SLC7A11</i>	ENSG0000015101 2	0.62122	1.09E-64	<i>GPAT3</i>	ENSG0000013867 8	0.758056	5.53E-104
<i>AL033397.1</i>	ENSG0000023168 3	0.617402	1.06E-63	<i>RIT1</i>	ENSG0000014362 2	0.752368	1.35E-101
<i>NQO1</i>	ENSG0000018101 9	0.614753	5.06E-63	<i>PGD</i>	ENSG0000014265 7	0.75068	6.70E-101
<i>PTGR1</i>	ENSG0000010685 3	0.614615	5.49E-63	<i>GCLM</i>	ENSG0000002390 9	0.733214	5.16E-94
<i>SELENOI</i>	ENSG0000013801 8	0.612091	2.39E-62	<i>KIAA0319</i>	ENSG0000013726 1	0.724493	8.94E-91
<i>AC005336.1</i>	ENSG0000026705 6	0.611284	3.82E-62	<i>NMRAL2P</i>	ENSG0000017165 8	0.718976	8.63E-89
<i>AC089983.1</i>	ENSG0000025773 2	0.608837	1.57E-61	<i>AKR1C3</i>	ENSG0000019613 9	0.715365	1.62E-87
<i>AP003119.1</i>	ENSG0000025463 2	0.60168	9.08E-60	<i>AKR1C7P</i>	ENSG0000021526 7	0.714763	2.63E-87
<i>UCHL1</i>	ENSG0000015427 7	0.600223	2.05E-59	<i>AC145207.8</i>	ENSG0000026476 9	0.711034	5.14E-86
<i>OSGIN1</i>	ENSG0000014096 1	0.59655	1.56E-58	<i>NR0B1</i>	ENSG0000016929 7	0.708058	5.33E-85

Tabela Suplementar 2 – Top-50 Genes Correlacionados com a Expressão de mRNA
TXNRD1 em Coortes de CPCNP Provenientes do TCGA
 (conclusão)

LUAD - TCGA				LUSC - TCGA			
Gene	ensembl_gene_id	R ² estimate	p-valor	Gene	ensembl_gene_id	R ² estimate	p-valor
<i>AKR1B10</i>	ENSG00000198074	0.587276	2.37E-56	<i>PANX2</i>	ENSG00000073150	0.706848	1.37E-84
<i>TRIM16</i>	ENSG00000221926	0.585427	6.31E-56	<i>CES1</i>	ENSG00000198848	0.704477	8.56E-84
<i>CYP4F11</i>	ENSG00000171903	0.583055	2.20E-55	<i>SELENOI</i>	ENSG00000138018	0.700632	1.61E-82
<i>AKR1C1</i>	ENSG00000187134	0.574868	1.52E-53	<i>TKT</i>	ENSG00000163931	0.698341	9.04E-82
<i>MAFG</i>	ENSG00000197063	0.571141	1.00E-52	<i>LINC02561</i>	ENSG00000224034	0.697754	1.40E-81
<i>PRDX1</i>	ENSG00000117450	0.570399	1.46E-52	<i>NECAB2</i>	ENSG00000103154	0.694293	1.83E-80
<i>AKR1C3</i>	ENSG00000196139	0.569197	2.67E-52	<i>CABYR</i>	ENSG00000154040	0.691075	1.94E-79
<i>ABCB6</i>	ENSG00000115657	0.566078	1.26E-51	<i>SCN9A</i>	ENSG00000169432	0.690036	4.12E-79
<i>TSKU</i>	ENSG00000182704	0.559501	3.14E-50	<i>EID3</i>	ENSG00000255150	0.686606	4.86E-78
<i>NUP37</i>	ENSG00000075188	0.559065	3.88E-50	<i>TXN</i>	ENSG00000136810	0.68247	9.11E-77
<i>TXN</i>	ENSG00000136810	0.558184	5.94E-50	<i>TMEM116</i>	ENSG00000198270	0.674502	2.25E-74
<i>PPP2R2C</i>	ENSG00000074211	0.551812	1.24E-48	<i>FECH</i>	ENSG00000066926	0.673768	3.71E-74
<i>ACTR6</i>	ENSG00000075089	0.544875	3.14E-47	<i>AL121758.1</i>	ENSG00000270299	0.673581	4.22E-74
<i>GPX2</i>	ENSG00000176153	0.544764	3.30E-47	<i>PRDX1</i>	ENSG00000117450	0.669948	4.87E-73
<i>PSMD14</i>	ENSG00000115233	0.543521	5.85E-47	<i>MAP1B</i>	ENSG00000131711	0.66993	4.93E-73
<i>AL121758.1</i>	ENSG00000270299	0.542387	9.83E-47	<i>JAKMIP3</i>	ENSG00000188385	0.669459	6.75E-73
<i>IDH1</i>	ENSG00000138413	0.541019	1.83E-46	<i>AKR1B10</i>	ENSG00000198074	0.667801	2.04E-72
<i>TDP2</i>	ENSG00000111802	0.539357	3.89E-46	<i>SOST</i>	ENSG00000167941	0.659407	4.87E-70
<i>AC026785.3</i>	ENSG00000249199	0.534637	3.24E-45	<i>TRIM16</i>	ENSG00000221926	0.657575	1.57E-69
<i>TALDO1</i>	ENSG00000177156	0.534216	3.90E-45	<i>GCLC</i>	ENSG00000001084	0.657482	1.67E-69
<i>AKR1B15</i>	ENSG00000227471	0.533596	5.14E-45	<i>AKR1C2</i>	ENSG00000151632	0.653552	2.00E-68
<i>AIFM2</i>	ENSG00000042286	0.532422	8.63E-45	<i>DIRAS2</i>	ENSG00000165023	0.648796	3.86E-67
<i>AC145207.8</i>	ENSG00000264769	0.532168	9.66E-45	<i>AKR1B10P1</i>	ENSG00000213606	0.641216	3.88E-65

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Tabela Suplementar 3 – Análise de Enriquecimento de Vias dos 50 Principais Genes Correlacionados Com TXNRD1 em Tumores de CPCNP do TCGA
(continua)

Tipo de Tumor	Termo	Overlap	P-valor	Ajuste d P-valor	Odd s Ratio	Combine d Score	Genes-in-pathway
LUAD	Glutathione metabolism	7/51	3.61E-11	5.13E-09	75.4	1813.0	G6PD;GPX2;GCLC;IDH1;GSR;PGD;GCLM
LUAD	Metapathway biotransformation	7/174	2.11E-07	1.50E-05	19.7	303.5	AKR1B10;AKR1C1;GSR;CYP4F3;AKR1C3;AKR1C2;CYP4F11
LUAD	Benzo(a)pyrene metabolism	3/9	1.15E-06	5.44E-05	216.8	2965.0	AKR1C1;AKR1C3;AKR1C2
LUAD	Keap1-Nrf2 pathway	3/13	3.88E-06	1.38E-04	130.1	1620.2	NQO1;GCLC;GCLM
LUAD	Metabolism	14/1615	2.15E-05	5.32E-04	4.6	49.3	NQO1;G6PD;IDH1;GSR;CYP4F3;TALDO1;PGD;CYP4F11;UGDH;GCLC;AKR1B10;ME1;GCLM;NUP37
LUAD	Biological oxidations	5/139	2.25E-05	5.32E-04	16.8	179.9	UGDH;GCLC;CYP4F3;CYP4F11;GCLM
LUAD	Pentose phosphate pathway	3/27	3.88E-05	6.88E-04	54.1	550.0	G6PD;TALDO1;PGD
LUAD	Oxidative stress	3/27	3.88E-05	6.88E-04	54.1	550.0	NQO1;GCLC;GSR
LUAD	TGF-beta regulation of extracellular matrix	8/565	6.27E-05	9.90E-04	6.8	65.7	UCHL1;G6PD;AKR1B10;AKR1C1;ME1;AKR1C3;AKR1C2;SLC7A11
LUAD	Glutathione biosynthesis and recycling	2/11	3.19E-04	0.004514	94.3	759.1	GCLC;GCLM
LUAD	Steroid hormone biosynthesis	3/56	3.50E-04	0.004514	24.5	194.9	AKR1C1;AKR1C3;AKR1C2
LUAD	Arachidonic acid metabolism	3/58	3.88E-04	0.00459	23.6	185.3	GPX2;CYP4F3;AKR1C3
LUAD	Selenium pathway	3/60	4.29E-04	0.004682	22.8	176.5	PRDX1;GSR;TXN
LUAD	Phase II of biological oxidations: conjugation	3/71	7.03E-04	0.007126	19.1	138.5	UGDH;GCLC;GCLM
LUAD	Sulfation biotransformation reaction	2/17	7.81E-04	0.007395	56.6	404.6	G6PD;GSR
LUAD	Nucleotide di- and triphosphate biosynthesis and interconversion	2/18	8.77E-04	0.007787	53.0	373.2	GSR;TXN
LUAD	Drug metabolism: cytochrome P450	3/83	0.001106	0.009242	16.2	110.3	AKR1C1;AKR1C3;AKR1C2
LUAD	Amino acid metabolism	4/195	0.001318	0.010395	9.2	61.0	NQO1;GCLC;PSMD14;GCLM
LUAD	Sulfur amino acid metabolism	2/24	0.001568	0.011719	38.5	248.9	GCLC;GCLM
LUAD	Glutathione conjugation	2/25	0.001702	0.012082	36.9	235.1	GCLC;GCLM
LUAD	Carbohydrate metabolism	4/235	0.002601	0.01759	7.6	45.2	G6PD;TALDO1;PGD;NUP37
LUAD	BDNF signaling pathway	4/261	0.003788	0.024452	6.8	38.0	UGDH;NQO1;AKR1C1;AKR1C3
LUAD	ABC transporters	2/47	0.005925	0.03658	18.8	96.5	ABCC2;ABCB6
LUAD	Oncostatin M	4/311	0.007012	0.041489	5.7	28.2	ABCC2;AKR1B10;AKR1C1;AKR1C3
LUAD	TAp63 pathway	2/55	0.008039	0.045659	16.0	77.1	NQO1;GPX2
LUSC	Glutathione metabolism	5/51	1.54E-07	1.11E-05	49.2	771.2	G6PD;GCLC;GSR;PGD;GCLM
LUSC	Metapathway biotransformation	7/174	2.11E-07	1.11E-05	19.7	303.5	AKR1B10;AKR1C1;CYP4F3;GSR;AKR1C3;AKR1C2;CYP4F11
LUSC	Pentose phosphate pathway	4/27	5.35E-07	1.87E-05	77.0	1112.2	G6PD;TALDO1;PGD;TKT
LUSC	Benzo(a)pyrene metabolism	3/9	1.15E-06	3.02E-05	216.8	2965.0	AKR1C1;AKR1C3;AKR1C2
LUSC	Keap1-Nrf2 pathway	3/13	3.88E-06	8.16E-05	130.1	1620.2	NQO1;GCLC;GCLM
LUSC	Metabolism	14/1615	2.15E-05	3.77E-04	4.6	49.3	NQO1;G6PD;FECH;CYP4F3;GSR;TALDO1;PGD;CYP4F11;GCLC;AKR1B10;ME1;TKT;GCLM;CES1
LUSC	Oxidative stress	3/27	3.88E-05	5.82E-04	54.1	550.0	NQO1;GCLC;GSR

Tabela Suplementar 3 – Análise de Enriquecimento de Vias dos 50 Principais Genes Correlacionados Com TXNRD1 em Tumores de CPCNP do TCGA (conclusão)

Tipo de Tumor	Termo	Overlap	P-valor	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes-in-pathway
LUSC	Glutathione biosynthesis and recycling	2/11	3.19E-04	0.003751	94.3	759.1	GCLC;GCLM
LUSC	Steroid hormone biosynthesis	3/56	3.50E-04	0.003751	24.5	194.9	AKR1C1;AKR1C3;AKR1C2
LUSC	Biological oxidations	4/139	3.71E-04	0.003751	13.0	103.1	GCLC;CYP4F3;CYP4F11;GCLM
LUSC	TGF-beta regulation of extracellular matrix	7/565	4.25E-04	0.003751	5.8	45.0	G6PD;AKR1B10;AKR1C1;ME1;AKR1C3;AKR1C2;SLC7A11
LUSC	Selenium pathway	3/60	4.29E-04	0.003751	22.8	176.5	PRDX1;GSR;TXN
LUSC	Sulfation biotransformation reaction	2/17	7.81E-04	0.006309	56.6	404.6	G6PD;GSR
LUSC	Nucleotide di- and triphosphate biosynthesis and interconversion	2/18	8.77E-04	0.00658	53.0	373.2	GSR;TXN
LUSC	Drug metabolism: cytochrome P450	3/83	0.001106	0.007745	16.2	110.3	AKR1C1;AKR1C3;AKR1C2
LUSC	Sulfur amino acid metabolism	2/24	0.001568	0.01029	38.5	248.9	GCLC;GCLM
LUSC	Glutathione conjugation	2/25	0.001702	0.01051	36.9	235.1	GCLC;GCLM
LUSC	Carbohydrate metabolism	4/235	0.002601	0.015174	7.6	45.2	G6PD;TALDO1;PGD;TKT

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Tabela Suplementar 4 – Análise de Enriquecimento de Fatores de Transcrição dos 100 Principais Genes Correlacionados com TXNRD1 em Tumores de CPCNP do TCGA

Tipo do Tumor	Termo	Overlap	P-valor	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes-in-pathway
LUAD	Nrf2 26677805 Chip-Seq MACROPHAGESS Mouse	18//1331	9.31E-10	4.94E-07	8.2	171.4	NQO1;ABCC2;SRXN1;PSMD14;IDH1;GSR;OSGIN1;TALDO1;SLC7A11;PGD;PTGR1;TSKU;GCLC;PRDX1;MAFG;TRIM16;GCLM;HTATIP2
LUAD	NFE2L2 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	15//1055	1.79E-08	3.16E-06	8.0	143.1	NQO1;ABCC2;SRXN1;ABCB6;IDH1;OSGIN1;TALDO1;SLC7A11;PGD;PTGR1;TSKU;GCLC;PRDX1;MAFG;GCLM
LUAD	NRF2 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	15//1055	1.79E-08	3.16E-06	8.0	143.1	NQO1;ABCC2;SRXN1;ABCB6;IDH1;OSGIN1;TALDO1;SLC7A11;PGD;PTGR1;TSKU;GCLC;PRDX1;MAFG;GCLM
LUAD	GATA6 25053715 ChIP-Seq YYC3 Human	13//2000	8.04E-04	0.085198	3.3	23.3	NQO1;ABCC2;SRXN1;TRIM16L;ABCB6;AKR1C1;IDH1;AKR1C3;PGD;PTGR1;TSKU;MAFG;HTATIP2
LUAD	SOX2 27498859 Chip-Seq STOMACH Mouse	13//2000	8.04E-04	0.085198	3.3	23.3	NQO1;GPX2;ABCC2;ABCB6;ACTR6;IDH1;GSR;SLC7A11;PGD;PTGR1;UGDH;GCLM;HTATIP2
LUSC	Nrf2 26677805 Chip-Seq MACROPHAGESS Mouse	17//1331	7.52E-09	3.92E-06	7.5	140.9	NQO1;SRXN1;DIRAS2;GSR;OSGIN1;TALDO1;SLC7A11;PTGR1;PGD;RIT1;GCLC;CABYR;PRDX1;MAFG;TRIM16;TKT;GCLM
LUSC	NFE2L2 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	14//1055	1.41E-07	2.45E-05	7.3	114.6	NQO1;SRXN1;DIRAS2;OSGIN1;TALDO1;SLC7A11;PTGR1;PGD;GCLC;PRDX1;MAFG;TKT;GCLM;CES1
LUSC	NRF2 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	14//1055	1.41E-07	2.45E-05	7.3	114.6	NQO1;SRXN1;DIRAS2;OSGIN1;TALDO1;SLC7A11;PTGR1;PGD;GCLC;PRDX1;MAFG;TKT;GCLM;CES1
LUSC	RELA 24523406 ChIP-Seq FIBROSARCOMA Human	8//1182	0.007532	0.826195	3.1	15.3	NQO1;G6PD;GCLC;TRIM16L;FECH;AKR1C1;MAFG;GCLM
LUSC	CJUN 26792858 Chip-Seq BT549 Human	11//2000	0.007929	0.826195	2.6	12.6	NQO1;AKR1B10;TRIM16L;AKR1C1;DIRAS2;SCN9A;ME1;AKR1C2;SLC7A11;TXN;TKT
LUSC	GATA6 25053715 ChIP-Seq YYC3 Human	10//2000	0.021359	0.999705	2.3	8.9	PANX2;NQO1;EID3;SRXN1;TRIM16L;AKR1C1;MAFG;AKR1C3;PTGR1;PGD

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Tabela Suplementar 5 – Principais Genes com a Melhor Correlação com a Expressão da Assinatura NRF2 em Tumores de CPCNP das Coortes do TCGA

LUAD			LUSC		
Gene symbol	R ² estimate	p-value	Gene symbol	R ² estimate	p-value
<i>SRXN1</i>	0.88	2.93E-196	<i>SRXN1</i>	0.93	6.72E-241
<i>TRIM16L</i>	0.86	5.66E-177	<i>ME1</i>	0.91	3.24E-208
<i>GSR</i>	0.85	1.06E-168	<i>TRIM16L</i>	0.90	3.41E-203
<i>NQO1</i>	0.83	2.18E-155	<i>SLC7A11</i>	0.89	2.03E-188
<i>GCLM</i>	0.83	2.34E-149	<i>TXNRD1</i>	0.87	1.93E-174
<i>AKR1C3</i>	0.81	5.67E-141	<i>GCLM</i>	0.87	2.19E-174
<i>TXNRD1</i>	0.80	4.66E-135	<i>AKR1C3</i>	0.87	2.53E-172
<i>ME1</i>	0.77	1.23E-119	<i>NQO1</i>	0.87	5.41E-170
<i>PRDX1</i>	0.76	3.94E-115	<i>GSR</i>	0.85	1.59E-151
<i>ABCB6</i>	0.74	1.99E-105	<i>TXN</i>	0.83	5.46E-143
<i>PIR</i>	0.74	2.04E-105	<i>PANX2</i>	0.80	1.73E-125
<i>TXN</i>	0.73	9.45E-101	<i>PRDX1</i>	0.80	1.03E-124
<i>SLC7A11</i>	0.71	4.46E-92	<i>GCLC</i>	0.78	7.17E-114
<i>GCLC</i>	0.70	2.33E-78	<i>TKT</i>	0.78	1.64E-112
-	-	-	<i>MAFG</i>	0.77	1.66E-110
-	-	-	<i>NECAB2</i>	0.76	4.80E-105
-	-	-	<i>PIR</i>	0.74	2.73E-95
-	-	-	<i>GSTM3</i>	0.72	2.11E-88
-	-	-	<i>FECH</i>	0.70	1.33E-82
-	-	-	<i>SLC3A2</i>	0.70	2.13E-82
-	-	-	<i>ABCB6</i>	0.70	8.96E-82

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

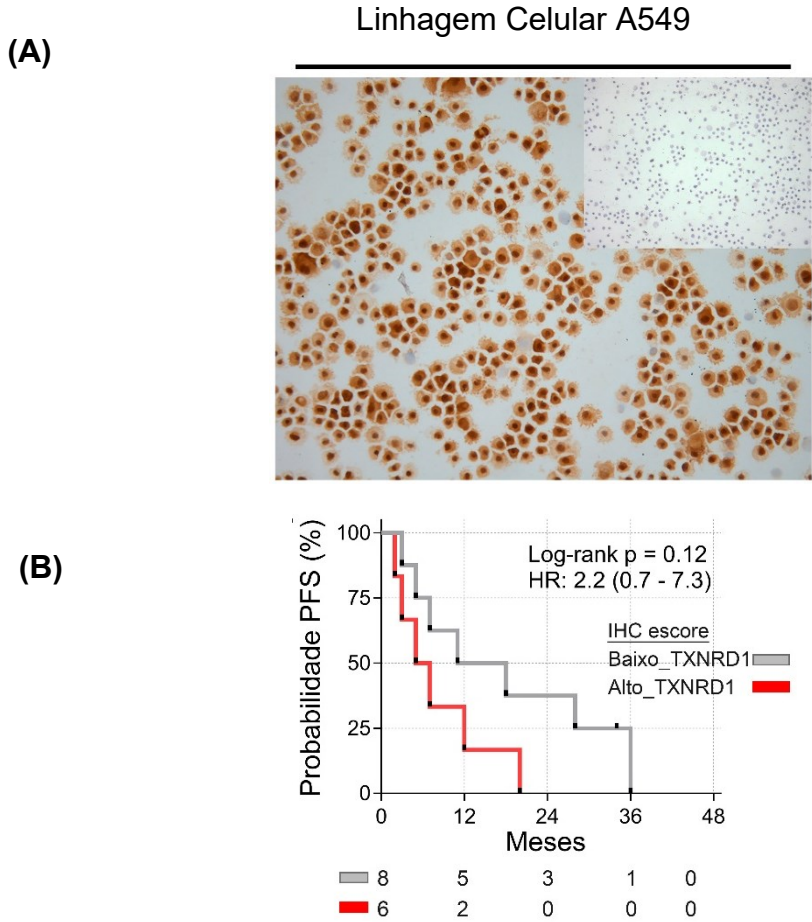
Tabela Suplementar 6 – Fatores de Transcrição Associados a Genes bem Correlacionados ($R^2 \geq 0,7$) com a Expressão da Assinatura Gênica NRF2 em Tumores de CPCNP das Coortes do TCGA

Tipo do Tumor	Nome	P-valor	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
LUAD	<i>Nrf2</i> 26677805 ChIP-Seq MACROPHAGESS Mouse	3.68E-08	1.44E-05	25.41	435.01
LUAD	<i>NFE2L2</i> 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	1.32E-07	1.72E-05	24.12	382.06
LUAD	<i>NRF2</i> 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	1.32E-07	1.72E-05	24.12	382.06
LUAD	<i>RELA</i> 24523406 ChIP-Seq FIBROSARCOMA Human	0.000913	0.08864	8.88	62.13
LUAD	<i>EKLF</i> 21900194 ChIP-Seq ERYTHROCYTE Mouse	0.001131	0.08864	8.44	57.28
LUAD	<i>NANOG</i> 18692474 ChIP-Seq MEFs Mouse	0.001425	0.09309	6.81	44.62
LUAD	<i>STAT3</i> 1855785 ChIP-Seq MESCes Mouse	0.006694	0.1804	9.31	46.59
LUSC	<i>NFE2L2</i> 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	1.81E-09	2.74E-07	19.95	401.61
LUSC	<i>NRF2</i> 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	1.81E-09	2.74E-07	19.95	401.61
LUSC	<i>Nrf2</i> 26677805 ChIP-Seq MACROPHAGESS Mouse	1.20E-09	2.74E-07	18.86	387.4
LUSC	<i>RELA</i> 24523406 ChIP-Seq FIBROSARCOMA Human	1.48E-05	0.001679	9.86	109.62
LUSC	<i>EKLF</i> 21900194 ChIP-Seq ERYTHROCYTE Mouse	0.000185	0.01683	7.61	65.38
LUSC	<i>GATA6</i> 25053715 ChIP-Seq YYC3 Human	0.000608	0.04597	5.56	41.15

Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

A figura suplementar 1 complementa os dados referentes aos resultados presente no tópico 6.2 - Níveis Elevados de Tiorredoxina Redutase-1 Predizem a Recorrência de Câncer De Pulmão: Resultados de uma Coorte de Pacientes com CPCNP.

Figura Suplementar 1 – IHC da Linhagem Celular A549 *KEAP1* Mutante e PFS dos Tecidos de Câncer de Pulmão



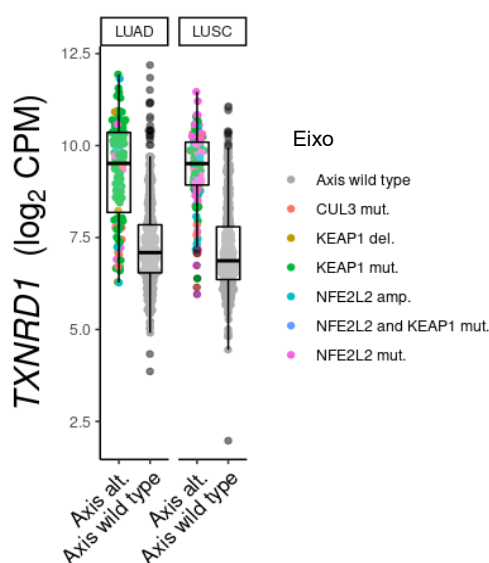
Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: (A) IHC de TXNRD1 na linhagem celular A549 *KEAP1* mutante com seu controle negativo no canto direito da figura. Na seção de Materiais e Métodos está descrito com mais detalhes como foram realizadas as IHC. (B) Gráfico de Kaplan-Meier representando PFS em nossa coorte de pacientes com CPCNP. Pacientes com doença não ressecável foram dicotomizados em alto-TXNRD1 *versus* baixo-TXNRD1, conforme determinado pelo escore de IHC de TXNRD1 em tumores de pulmão. O valor de p do teste de log-rank, o *hazard ratio* (HR) e o intervalo de confiança de 95%, e o número de indivíduos em risco (# *at risk*) são mostrados.

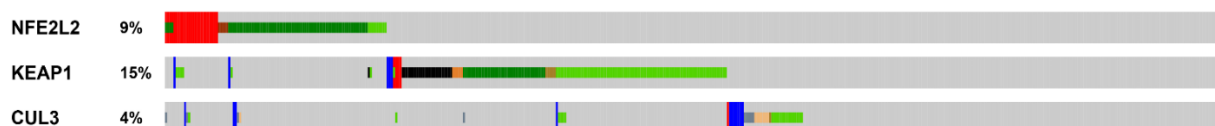
A figura suplementar 2, complementa os dados referentes aos resultados presente no tópico 6.3 - TXNRD1 é Regulada Positivamente em Tumores que Abrigam Mutações KEAP1/NRF2 e se Correlaciona com a Expressão do *Regulon* NRF2.

Figura Suplementar 2 – Mutações no Eixo da Via NRF2 estão Associadas a Níveis Elevados de TXNRD1 e a Distribuição de Alterações Genéticas na Via NRF2 em Tumores de CPCNP do Banco de Dados TCGA

(A)



(B)

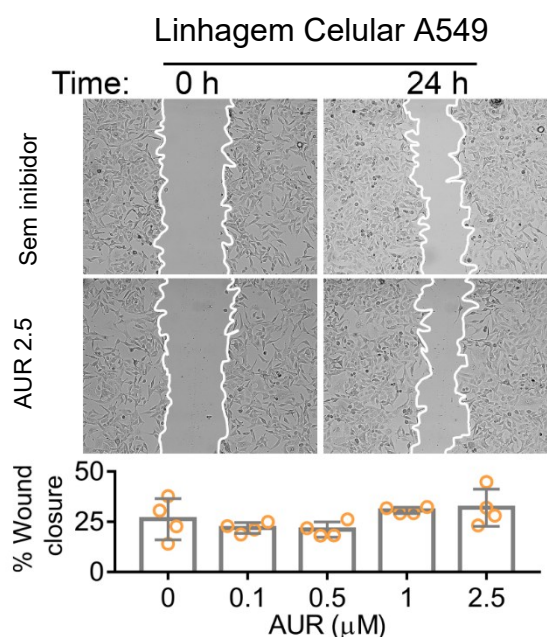


Fonte: Adaptado de DELGOBO et al., 2021.

Legenda: Em (A) Expressão de TXNRD1 (log2 CPM) em tumores LUSC e LUAD *wild-type* ou com mutações ativadoras da via NRF2. O *box plot* "Axis alt." inclui amostras de CPCNP do TCGA com mutação em *KEAP1* e/ou *NFE2L2* e/ou *CUL3*, bem como amplificações em *NFE2L2* e deleções homozigóticas no gene *KEAP1*. (B) Oncoprint do cBioPortal - TCGA mostrando que as alterações somáticas (mutações, amplificação/deleção) não coocorrem na maioria dos pacientes com CPCNP. A cor azul representa *deep deletion*, a cor vermelha demonstra as amplificações, em preto temos as mutações truncadas, verde mutação *missense* e assim por diante. Os dados foram obtidos do Pan-Lung Cancer (TCGA, Nat Genet 2016). N = 1144 pacientes/amostras disponíveis no cBioPortal (cbioportal.org). Fonte: cBioPortal - TCGA, 2016.

A figura suplementar 3, complementa os dados referentes aos resultados presente no tópico 6.4 Resistência à inibição de TXNRD1 mediada por NRF2/GSH e o papel fundamental de NRF2 na sobrevivência de células de câncer de pulmão mutantes de KEAP1.

Figura Suplementar 3 – Efeito da Auranofina na Migração da Linhagem Celular A549 no Ensaio *Scratching*



Fonte: Adaptado de DELGOBO *et al.*, 2021.

Legenda: Células A549 (5×10^4) foram semeadas em placas de 24 poços, e após 48 horas, a monocamada de células foi riscada com a ponta de uma pipeta de 200 μL , para criar uma “ferida”. As células foram lavadas com PBS 1x para remover as células flutuantes e tratadas com auranofina em diferentes concentrações. Fotos foram tiradas no tempo 0 (pré-tratamento) e 24 horas após a incubação com auranofina usando um microscópio de contraste de fase ajustado para um aumento de 100x. A área da “ferida” pré- e pós-tratamento foi quantificada usando o *software ImageJ* e expressa como porcentagem de fechamento da “ferida”.

ANEXO A – ARTIGO

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,g}, 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^{e,f}, 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 Passo Fundo (UPF), Faculdade de Medicina, Passo 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), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

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

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

^g Laboratório de Bioengenharia Tecidual, Diretoria de Metrologia Aplicada às 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 *PIK3CA* 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.

* Corresponding author. Departamento de Farmacologia – Centro de Ciências Biológicas (CCB) – UFSC, Lab 204 (labcancer.paginas.ufsc.br), Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil.

E-mail address: alfeu.zanotto@ufsc.br (A. Zanotto-Filho).

¹ These authors share senior authorship.

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

Received 17 August 2021; Received in revised form 10 October 2021; Accepted 17 October 2021

Available online 19 October 2021

0891-5849/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO B – ARTIGOS EM COLABORAÇÃO

Artigos publicados durante o período do doutorado.

1. Falchetti, M.; **DELGOBO, Marina**; Zancanaro, H.; Almeida, K.; Nascimento das Neves, R.I.; Santos, B.; Stefanos, N. M.; Bishop, A.; Santos-Silva, M. C.; Zannotto-Filho, A. Omics-based identification of an NRF2-related auranofin resistance signature in cancer: Insights into drug repurposing. Computers in Biology and Medicine. V. 152, P. 106347, 2023.
2. Agnes, J. P.; Santos, V. W.; Nascimento das Neves, R.; Gonçalves, R. M.; **DELGOBO, Marina**; Girardi, C. S.; Lückemeyer, D. D.; Ferreira, M. A.; Júnior, S. J. M.; Lopes, S. C.; Spiller, F.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C. F.; Prediger, R. D.; Ferreira, J.; Zannotto-Filho, A. Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress and Inflammation. Journal of Pain, V. 22, P. 1, 2021.
3. Gonçalves, R. M.; **DELGOBO, Marina**; Agnes, J. P.; Nascimento das Neves, R.; Falchetti, M.; Casagrande, T.; Garcia, A. P. V.; Vieira, T. C.; Somensi, N.; Bruxel, M. A.; Mendes, D. A. G. B.; Rafacho, A.; Báfica, A.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C. F.; Cassali, G. D.; Bishop, A. J. R.; Zannotto-Filho, A. Cox-2 Promotes Mammary Adipose Tissue Inflammation, Local Estrogen Biosynthesis, and Carcinogenesis in High-Sugar/Fat Diet Treated Mice. Cancer Letters, V. 502, P. 44-57, 2021.
4. Neves, B. J.; Agnes, J. P.; Gomes, M. N.; Henriques, M. R. D; Gonçalves, R. M.; **DELGOBO, Marina**; Ribeiro De Souza Neto, L.; Senger, M. R.; Silva-Junior, F. P.; Ferreira, S. B.; Zannotto-Filho, A; Andrade, C. H. Efficient Identification of Novel Anti-Glioma Lead Compounds by Machine Learning Models. European Journal of Medicinal Chemistry, V. 189, P. 111981, 2020.
5. **DELGOBO, Marina**; Agnes, Jonathan Paulo; Goncalves, Rosângela Mayer; Zamoner, Ariane; Parisotto, Eduardo Benedetti; Santos, Vitória Wibbelt; Zannotto-Filho, Alfeu. N-Acetylcysteine And Alpha-Lipoic Acid Improve Antioxidant Defenses And Decrease Oxidative Stress, Inflammation And Serum Lipid Levels In Ovariectomized Rats Via Estrogen-Independent Mechanisms. Journal Of Nutritional Biochemistry, V. 67, P. 190-200, 2019.
6. Gonçalves, R. M.; Agnes, J. P.; **DELGOBO, Marina**; De Souza, P. O.; Thomé, M. P.; Heimfarth, Lenz, G.; Moreira, J. C. F.; Zannotto-Filho, A. Late Autophagy Inhibitor Chloroquine Improves Efficacy of the Histone Deacetylase Inhibitor Saha and Temozolomide in Gliomas. Biochemical Pharmacology, V. 163, P. 440-450, 2019.