



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

Guilherme Nicácio Vieira

Avaliação dos efeitos farmacológicos de ML385: a inibição da via NRF2/KEAP1 e suas consequências

Florianópolis
02 de agosto 2024

Guilherme Nicácio Vieira

Avaliação dos efeitos farmacológicos de ML385: a inibição da via NRF2/KEAP1 e suas consequências

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

Orientador(a): Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Florianópolis
2024

Vieira, Guilherme Nicácio

Avaliação dos efeitos farmacológicos de ML-385: : a
inibição da via NRF2/KEAP1 e suas consequências /
Guilherme Nicácio Vieira ; orientador, Alfeu Zanotto-
Filho, 2024.

55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Câncer. 3. Terapia-alvo. 4.
Farmacoterapia. I. Zanotto-Filho, Alfeu. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

Guilherme Nicácio Vieira

Avaliação dos efeitos farmacológicos de ML385: a inibição da via NRF2/KEAP1 e suas consequências

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 02 de Agosto de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcelo Farina, Dr.
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Áurea Elizabeth Linder, Dra.
Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. José Eduardo da Silva-Santos, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, à CAPES e à Universidade Federal de Santa Catarina por cederem todo suporte necessário para a realização desta dissertação, incluindo minha Bolsa de Pesquisa. Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho por todos os ensinamentos, orientações e experiências compartilhadas comigo, também agradecer aos membros da banca examinadora que dispôs do seu tempo para avaliar este trabalho.

Agradeço profundamente todo meu núcleo familiar, meus pais, Suzi e Ramon, por sempre me ensinarem a não desistir, por me incentivarem e por fazer o possível e o impossível para eu ter a oportunidade de fazer essa pós-graduação, e que ao longo desses 24 anos da minha vida, deram tudo do melhor para que eu pudesse me tornar a pessoa que sou hoje. À minha irmã Amanda, uma mulher guerreira, mestre e doutora, vencedora de enormes dificuldades da vida e que serviu de inspiração e incentivo para minha jornada após a faculdade. À minha namorada, Paola, que durante esses quase 7 anos de relacionamento sempre esteve do meu lado, me ajudando de todas as formas possíveis, e sua família, Luciano e Raquel, que também me acompanharam durante toda a jornada, e me deram todo o suporte necessário. Ainda agradeço à minha prima, Yasmim, por ser praticamente uma irmã e me ajudar durante meu processo. Agradeço aos meus colegas de laboratório por me acompanharem, ajudarem e deixar todo esse processo mais leve. Amo vocês.

Gostaria de agradecer meus entes queridos que me deixaram durante meu processo de formação, minha avó Dona Preta, meus tios Robson e Marinês, meu amado cachorro Bob, e o senhor Neuroci e a senhora Nilvana. Saibam que onde quer estejam, os seus ensinamentos, influências e desejos ainda seguem sob mim, e que nunca esquecerei de todos os momentos que foram compartilhados comigo.

Por fim, gostaria de agradecer a mim mesmo, que mesmo passando por diversas adversidades, principalmente problemas de saúde, superei a mim mesmo e me mostrei capaz de realizar mais esse sonho.

RESUMO

O câncer de pulmão é um dos tipos de tumor mais epidemiologicamente relevantes atualmente, sendo a segunda maior causa de mortalidade global. O câncer de pulmão engloba dois tipos: o Carcinoma de Células Pequenas e o Carcinoma de Células Não-pequenas. O principal fator determinante do prognóstico tumoral são as mutações, que são os principais definidores da progressão e tratamento da doença. Dentre essas mutações, no Carcinoma de Células Não-pequenas se destaca a mutação na via NRF2/KEAP1, uma das principais vias do sistema antioxidante, reguladora de proteínas com essa função, protegendo as células de danos oxidativos. Algumas mutações específicas possuem tratamento-alvo específico e alguns tipos de tumor também podem ser tratados com imunoterapia. Os tumores que não possuem terapia específica são tratados com remoção cirúrgica quando possível, e com quimioterapia clássica. Os tumores mutantes em NRF2/KEAP1 não possuem tratamento-alvo, e possuem um mau prognóstico quando comparado aos outros tipos de câncer. Há pouco tempo, descobriu-se drogas capazes de inibir especificamente essa via, como o ML385. Foi demonstrado na literatura que esse composto era capaz de inibir o NRF2 de forma seletiva, demonstrando um efeito antitumoral, mas sem definir quais mecanismos dessa via envolvidos nesse processo. O foco desse estudo foi explorar esses mecanismos antitumorais *in vitro* derivados da inibição pelo ML385 em células de câncer de pulmão A549 com mutação de perda de função em KEAP1. A droga apresentou um efeito na diminuição de densidade celular promissor em tratamento de 6 dias de duração, em todas as concentrações testadas, mas não apresentou alterações morfológicas características de morte celular. Ainda, no ensaio de formação de colônias, a droga foi capaz de reduzir o número de células por colônias, apesar de não reduzir o número total de colônias. Foram explorados possíveis mecanismos de morte e ciclo celular, avaliando apoptose e autofagia, através da avaliação de caspase-3 e LC3 A/B I/II, e a droga não alterou a concentração total dessas proteínas, e não foi capaz de parar o ciclo celular em nenhuma das suas fases. Ainda se avaliou a produção de ERO e de GSH, da qual o ML385 aumentou a produção de ERO, e diminuiu a concentração de GSH, demonstrando que o efeito de inibição de NRF2 estava presente. Os achados nesse trabalho sugerem que apoptose, autofagia e alterações no ciclo celular não são os mecanismos responsáveis pelo efeito antitumoral, sendo possível que outros mecanismos como ferroptose e senescência sejam os responsáveis, sendo necessária a avaliação de mecanismos, bem como de outras estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: farmacoterapia; terapia-alvo; mutação; antitumoral;

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most epidemiologically significant types of tumors today, being the second leading cause of global mortality. Lung cancer includes two types: Small Cell Carcinoma and Non-Small Cell Carcinoma. The main determinant factor of tumor prognosis is mutations, which are the primary definers of disease progression and treatment. Among these mutations, in Non-Small Cell Carcinoma, the mutation in the NRF2/KEAP pathway stands out. This pathway is one of the main antioxidant systems, regulating proteins with this function and protecting cells from oxidative damage. Some specific mutations have specific targeted therapies, and some types of tumors can also be treated with immunotherapy. Tumors that do not have specific therapy are treated with surgical removal when possible, and with classical chemotherapy. Tumors with NRF2/KEAP1 mutations do not have targeted therapy and have a worse prognosis compared to other types of cancer. Recently, drugs capable of specifically inhibiting this pathway, such as ML385, have been discovered. Literature has shown that this compound can selectively inhibit NRF2, demonstrating an antitumor effect, but without defining the mechanisms involved in this process. The focus of this study was to explore these antitumor mechanisms in vitro of ML385 in A549 lung cancer cells with loss-of-function mutation in KEAP1. The drug showed a promising effect in reducing cell density with a 6-day treatment duration at all tested concentrations but did not show morphological changes characteristic of cell death. Additionally, in the colony formation assay, the drug was able to reduce the number of cells per colony, although it did not reduce the total number of colonies. Possible mechanisms of death and cell cycle were explored, evaluating apoptosis and autophagy through the assessment of caspase-3 and LC3 A/B I/II. The drug did not alter the total concentration of these proteins and was not able to stop the cell cycle in any of its phases. Furthermore, the production of ROS and GSH was evaluated, and ML385 increased ROS production and decreased GSH concentration, demonstrating that the NRF2 inhibition effect was present. The findings in this work suggest that apoptosis, autophagy, and cell cycle alterations are not the mechanisms responsible for the antitumor effect, and it is possible that other mechanisms such as ferroptosis and senescence are responsible, requiring further evaluation of these mechanisms as well as other therapeutic strategies.

Keywords: pharmacotherapy; targeted therapy; mutation; antitumor;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo da via NRF2/KEAP1	17
Figura 2. Oncoprint dos principais genes mutados em câncer de pulmão ...	20
Figura 3. Características do ML385 e interação com a via NRF2/KEAP1	23
Figura 4. Efeito do ML385 sobre a viabilidade celular em 3 dias de tratamento	30
.....	
Figura 5. Efeito do ML385 sobre a viabilidade celular em 6 dias de tratamento	32
.....	
Figura 6. Efeito do ML385 sobre a formação de colônias	33
Figura 7. Avaliação do mecanismo de morte celular do ML385 por <i>immunoblotting</i>	35
Figura 8. Avaliação do efeito do ML385 sobre as Caspase 3/7	38
Figura 9. Efeito do ML385 na progressão do ciclo celular das células A549, quando incubadas por 3 dias.	40
Figura 10. Efeito do ML385 na progressão do ciclo celular das células A549, quando incubadas por 6 dias.	41
Figura 11. Efeito do ML385 sobre a produção de EROs e concentração de GSH.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do ML385 nas diferentes fases do ciclo celular das células A549 (3 dias).....	40
Tabela 2. Efeito do ML385 nas diferentes fases do ciclo celular das células A549 (6 dias).....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALK	Receptor Tirosina Quinase de Linfoma Anaplásico
ARE	Elementos de Resposta Antioxidante
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
Bak	Antagonista homólogo à Bcl-2
Bax	Proteína 4 do tipo Bcl-2
Bcl2	Proteína Associada a Linfoma de células B 2
Bcr-Abl	Gene fusão entre Bcr e Abl
BRAF	Proteína Quinase Serina/Treonina do proto-oncogene Braf
BSO	Butionina Sulfomixina
CDK	Ciclina Dependente de Quinases
CKIs	Inibidores de Ciclinas Dependentes de Quinases
DCFH	Dicloro-diidro-fluorosceína
DMEM	<i>Dulbecco's Medium Eagle Modified</i> ,
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Fas/FasL	Proteína Fas/Ligante de Fas
GCLC	Subunidade Catalítica de Ligase Glutamato/Cisteína
GCLM	Subunidade Modificadora de Ligase Glutamato/Cisteína
GPx/GR	Glutathione Peroxidase/Glutathione Redutase
GPx4	Glutathione Peroxidase-4
GSH	Glutathione Livre
GSTA-2	Glutathione S-transferase Alfa-2
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
HO-1	Hemeoxigenase-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KEAP1	Proteína 1 Associada a ECH do tipo Kelch
KRAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
LC3 A/B	Proteína 1A/1B associada ao microtúbulo de cadeia leve 3
NFE2L2	Fator nuclear derivado de eritrócito 2 do tipo 2
NHS	<i>National Health System</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NQO-1	NADPH Quinona Oxidase-1
NRF2	Fator Nuclear Eritróide 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salina, do inglês
PD-1	Proteína de Morte Celular Programada 1
PD-L1	Ligante da Proteína de Morte Celular Programada 1
PIK3CA	Subunidade Catalítica Alfa da Fosfatidilinositol-4,5-
bisfosfato 3-quinase	
PTEN	Homólogo de Fosfatase e Tensina Deletado no
Cromossomo 10	
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
ROS1	Receptor Tirosina Quinase do Proto-oncogene ROS1
SFB	Soro Fetal Bovino
sMaf	Proteína <i>small</i> Maf
SRB	Sulforrodamina B

STK11	Serina/Treonina Quinase 11
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TP53	Proteína Tumoral 53
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao Fator de
Necrose Tumoral	
TXNRD1	Tiorredoxina Redutase 1
xCT	Transportador Cistina/Glutamato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer de pulmão.....	15
1.2	A via KEAP1/NRF2 no Câncer de Pulmão	16
1.3	Tratamentos para o Câncer de pulmão	18
1.4	Inibidores de NRF2 e ML385	21
2.	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivos específicos	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Cultura Celular	25
3.2	Ensaio SRB.....	25
3.3	Ensaio de proliferação clonogênica.....	26
3.4	<i>Immunoblot</i>	26
3.5	Análise de Ciclo Celular	27
3.6	Avaliação das espécies reativas de oxigênio (ERO)	28
3.7	Avaliação da atividade de Caspase-3/7 e quantificação de Glutathiona livre (GSH) por quimioluminescência.....	28
3.8	Delineamento experimental e planejamento estatísticos	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Viabilidade Celular	29
4.2	Ensaio clonogênico	32
4.3	Avaliação do mecanismo de morte celular	34
4.4	Avaliação do efeito do ML385 sobre o ciclo celular	38
4.5	Avaliação do efeito sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO e glutathiona livre (GSH)).....	42
5.	CONCLUSÃO	44

1. INTRODUÇÃO

O câncer engloba um grande grupo de doenças que podem afetar praticamente todos os tecidos do corpo humano, tendo como uma das características a divisão celular exacerbada de células fisiologicamente anormais, e é a segunda maior causa de mortalidade global, com cerca de 10 milhões de mortes no ano de 2020 (Organização Mundial da Saúde (OMS), 2022; Sung *et. al.*, 2021). Os principais tipos de câncer em homens são de pulmão, colorretal e próstata, e nas mulheres o de mama, colorretal e pulmão (OMS, 2022).

Dentre esses tumores mais epidemiologicamente relevantes, destacamos o câncer de pulmão. Dados reportam que em 2020 o câncer de pulmão correspondeu ao câncer de maior prevalência em homens, e o terceiro câncer de maior prevalência em mulheres, sendo o segundo em maior prevalência no geral, e o segundo em maior taxa de mortalidade (Sung *et. al.*, 2021), sendo considerado o tipo de câncer mais letal ao redor do mundo (OMS, 2023).

Essas alterações genéticas podem se derivar de muitas situações, como de erros causados pela replicação celular, fatores ambientais que podem levar ao dano no DNA (raios ultravioletas, poluição atmosférica, substâncias presentes no cigarro, microrganismos como o vírus HPV, e fatores genéticos hereditários que podem ativar, desativar ou alterar genes pró-tumorais (National Cancer Institute - NIH, 2022). A expressão ou ativação de genes pró-tumorais pode desencadear um ganho de função, perda de função, ou uma dominância cromossômica negativa em proteínas e funções celulares das células afetadas (Li *et. al.*, 2019; Bernards, 2014).

Em um processo normal, células envelhecidas ou danificadas sofrem um processo de apoptose, onde sofrem morte celular programada, entretanto no processo tumoral, as células anormais continuam se replicando. Essa replicação é mediada principalmente por alterações celulares importantes, e que proporcionam capacidades funcionais chaves para esse tipo de doença, sendo eles: sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, evasão da destruição imune, ativação da imortalidade replicacional, inflamação promotora tumoral, instabilidade genômica e mutações, resistência à morte celular, desregulação do metabolismo celular, ativação de mecanismos de invasão e metástase, e indução e acesso ao sistema vascular (Hanahan, 2022). Patologicamente, na prática clínica, o câncer é dividido em dois tipos: os malignos e benignos, sendo os malignos os que apresentam

as características citadas anteriormente, e os benignos, são tumores com melhor prognóstico, geralmente situados em um local bem definido e com baixa chance de invasão e/ou metástase (NIH, 2021).

Apesar de produzir diferenças significativas no metabolismo e na bioquímica celular, o processo de formação tumoral não produz células diferentes das encontradas em um organismo humano, situação diferente de um processo infeccioso bacteriano, por exemplo, onde há a presença de células reconhecidamente não humanas. Essas alterações no maquinário aumentam a probabilidade de malignidade, são bons marcadores de diferenciação das células saudáveis, além de serem possíveis alvos terapêuticos mais específicos para o tratamento de câncer (Waarts *et. al.*, 2022).

Algumas mutações são mais conhecidas e utilizadas, como os marcadores hormonais estrógeno e progesterona e suas terapias específicas para câncer de mama, mas para outros tipos tumorais se conhece pouquíssimo, ou não se conhece alvos específicos. Dentre essas, se destaca a via redox de NRF2, da qual cerca de 25% dos tumores de pulmão apresentam mutação nos genes *NFE2L2*, gene codificador do Fator nuclear derivado de eritrócito do tipo 2 (NRF2, do inglês *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) e de genes codificadores de proteína-1 associada à ECH do tipo Kelch (*KEAP1*, do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), que proporcionam uma maior atividade do sistema antioxidante das células tumorais pela ativação exacerbada de NRF2, ou através do bloqueio da degradação do mesmo (Hayes & McMahon, 2009).

O sistema Redox é um importante sistema de regulação da homeostase. É responsável por muitas respostas metabólicas celulares, e inclusive como ativação e produção de espécies reativas para defesa do organismo (Das & White, 2002). Células mutantes em *KEAP1/NRF2* possuem uma maior proteção contra essas espécies reativas através da ativação excessiva de NRF2 e/ou degradação excessiva de *KEAP1*. Além disso, esse estado redox alterado por causa dessas mutações permite uma maior replicação das células tumorais, e ainda possibilitar essas células a produzirem bombas de efluxo e enzimas citoprotetoras (Homma *et. al.*, 2009). A via de NRF2 é sabidamente um alvo terapêutico, onde sua inibição aumenta a sensibilidade à quimioterapia e às espécies reativas (Shibata *et. al.*, 2008), e ainda alguns trabalhos sugerem que há uma correlação entre as vias e mecanismos de

compensação nesse sistema antioxidante, propondo que somente a inibição de NRF2 não seja suficiente para um tratamento eficaz (Roh *et. al.*, 2017).

O câncer ainda apresenta uma característica bem peculiar: a formação de um ambiente que favorece o próprio câncer, sendo chamada de microambiente tumoral. Esse fator se caracteriza pela interação entre células cancerosas e células do estroma, como por exemplo células do sistema imune (macrófagos e linfócitos, principalmente), fibroblastos, células do endotélio vascular e algumas outras células, e tem como característica a modulação fenotípica de células do estroma através da sinalização celular mediada por citocinas, fatores de crescimento, enzimas, glicoproteínas e proteoglicanos, e tudo isso forma a matriz extracelular do tumor (Bozyk *et. al.*, 2022). A via de sinalização KEAP1/NRF2 também faz parte desse microambiente tumoral diminuindo a resposta de dano celular pelas espécies reativas de oxigênio, no caso de mutantes para essa via, com uma superexpressão de proteínas antioxidantes. Mas pouco se conhece em como essa mutação na via regula a resposta imune nos tumores.

1.1 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é uma doença tumoral com origem nos tecidos pulmonares, envolvendo diferentes fatores etiológicos. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que em 2023 o câncer de pulmão foi o terceiro mais incidente em homens com 18.020 novos casos, e o quarto em mulheres, com 14.540 novos casos. Em nível global, foi em 2020, o primeiro mais incidente em homens (1,4 milhão de novos casos) e o terceiro em mulheres (770 mil novos casos), além de ser o mais mortal entre homens e o segundo entre as mulheres (Sung *et. al.*, 2021). Apesar da grande heterogeneidade na origem da doença, tendo envolvimento de fatores ambientais e genéticos, aproximadamente 85% dos casos possuem associação com o tabagismo (tabagistas ativos, passivos ou ex-tabagistas), e apesar de uma forte luta contra a propaganda do tabagismo, a favor diminuição da adesão e cessação do mesmo, ainda é um fator importante na origem da doença (INCA, 2022).

A doença pode ser dividida em dois tipos: carcinoma pulmonar de células pequenas, uma forma mais rara da doença, e o Carcinoma de Células Não-Pequenas, e dentro desse grupo sendo subdividido em: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (ou carcinoma epidermóide) e carcinoma de grandes células. O carcinoma pulmonar de células não pequenas tem entre 80 e 85% dos diagnósticos no Reino

Unido (Dados do *National Health System*, NHS), e 81% nos Estados Unidos (Dados da Sociedade Americana de Oncologia (*American Society of Oncology/ASCO*)). Após a realização do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), iniciado em 2006, e que sequenciou aproximadamente 11 mil tumores, pelo menos no seu subprojeto *PanCancer Atlas*, o diagnóstico molecular foi associado ao diagnóstico histológico citado anteriormente. A abordagem molecular permite entender mais especificamente o que acontece em cada tipo de tumor, que mesmo sendo histologicamente igual, pode apresentar características diferentes no que se refere ao perfil de mutações em oncogenes e supressores tumorais, assinaturas mutacionais, alterações de números de cópias no genoma, fusões gênicas e aberrações cromossômicas, entre outras. O conhecimento da biologia molecular tumoral permite não apenas entender melhor a biologia do câncer, mas também permite a identificação de marcadores para diagnóstico e prognóstico, assim como possíveis alvos terapêuticos para personalização.

1.2 A via KEAP1/NRF2 no Câncer de Pulmão

O estresse oxidativo é um conceito que é englobado dentro do sistema redox de homeostase. O sistema redox controla a produção de espécie reativas pelas mitocôndrias e diferentes enzimas, e sua inibição pelo sistema antioxidante, sendo que o desbalanço entre a produção e acúmulo de espécies reativas e a capacidade das células de detoxificar esses produtos reativos é chamado de estresse oxidativo (Pizzino *et. al.*, 2017). O desbalanço oxidativo acontece em situações específicas, como em resposta à fatores fisiológico, como aumento da atividade metabólica mitocondrial e ativação de componentes citotóxicos do sistema imune, ou à estímulos exógenos, como radiação ultravioleta ou ionizante, e resposta a compostos químicos reativos, tendo como consequência o dano a biomoléculas. (Pizzino *et. al.*, 2017; Sies, 2020). Atualmente, se classifica em dois tipos: o eustresse e o distresse. O primeiro é a forma fisiológica do estresse oxidativo, a resposta e sinalização normal das espécies reativas, enquanto o distresse é a resposta mais abrupta das espécies reativas, normalmente a fatores exógenos, que leva ao dano tecidual. As principais respostas celulares aos produtos reativos são as enzimas heme-oxigenase-1 (HO-1), o par glutaciona peroxidase (GPx)/glutaciona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TXNRD1), que são majoritariamente reguladas pela via de KEAP1/NRF2 (Pizzino *et. al.*, 2017; Sies, 2020).

Figura 1. Mecanismo da via NRF2/KEAP1

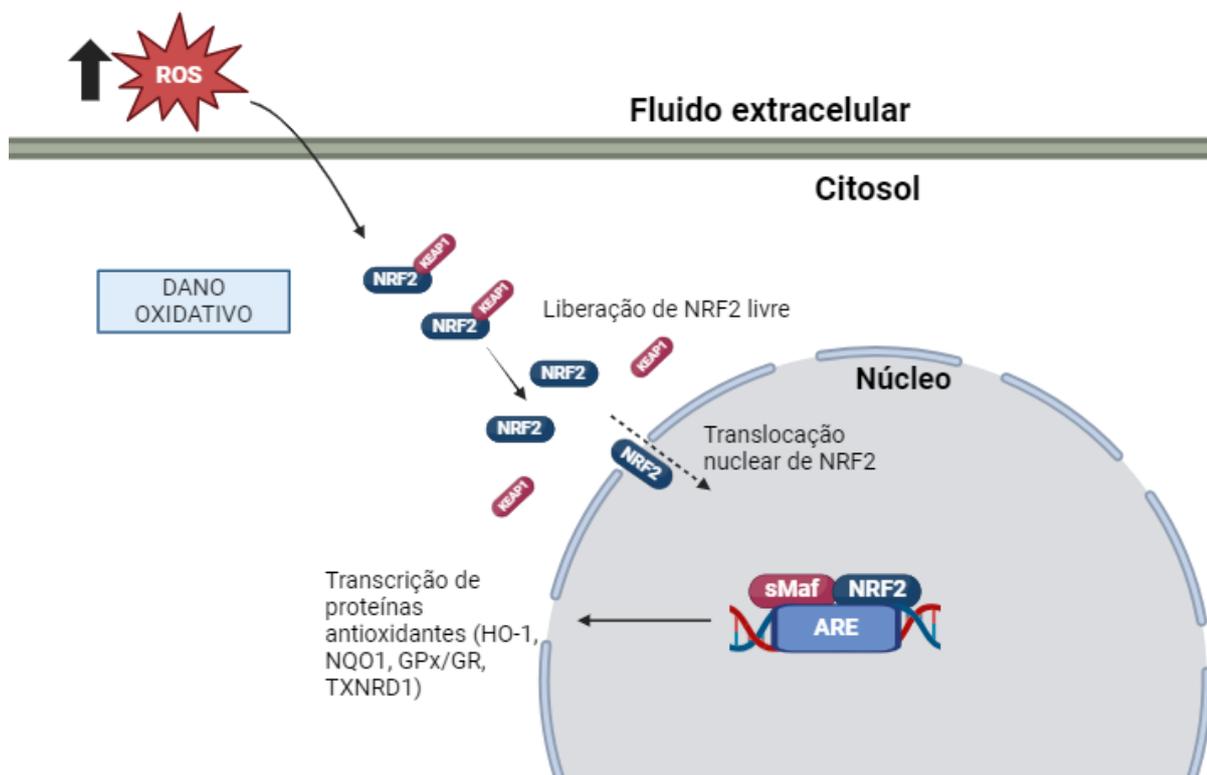


Figura 1. Mecanismo da via NRF2/KEAP1, demonstrando a regulação da transcrição de NRF2 por KEAP1. Após a liberação do fator de transcrição, ele se transloca para o núcleo, se ligando a sMaf, e posteriormente ao elemento de resposta antioxidante (ARE), dando início ao processo de transcrição de proteínas antioxidantes. Fonte: Autor, 2024

O fator nuclear derivado de eritrócito do tipo 2 (NRF2) é um fator de transcrição que regula o elemento de resposta antioxidante (ARE) situado no promotor de diversos genes, como a NAD(P)H quinona oxidase 1 (*NQO1*), Glutathione S-transferase A2 (*GSTA2*), Tiorredoxina redutase-1 (*TXNRD1*), genes das síntese de glutathione (Glutamato-cisteína ligase; *GCLM* e *GCLC*) e do transportador de cistina xCT (*SLC7A11*) entre outros, e é regulada pela proteína KEAP1, ubiquitinizada no seu domínio n-terminal pela mesma (Nguyen *et. al.*, 2009; Saha *et. al.*, 2020). Em condições fisiológicas, o NRF2 fica ligado a KEAP1, levando para uma degradação a nível proteossômico. Ao receber um estímulo químico (como oxidantes e eletrófilos) que modificam resíduos cisteína sensores redox em KEAP1, a proteína KEAP1 se dissocia do NRF2 permitindo seu acúmulo celular e entrada no núcleo celular, se heterodimerizando com proteínas Maf pequenas (*small Maf*, sMaf), e se ligando ao ARE, iniciando então a transcrição de enzimas antioxidantes e de detoxificação (Nguyen *et. al.*, 2009; Saha *et. al.*, 2020) (Figura 1).

No câncer é comum haver uma descompensação do sistema redox, gerando uma concentração elevada de espécies reativas constantemente. Esse efeito é gerado pelo metabolismo aberrante das células tumorais, e a via de KEAP1/NRF2 pode ter efeitos diferentes dependendo do estágio do câncer (Sánchez-Ortega *et. al.*, 2021). Um dos possíveis efeitos do NRF2 é na iniciação do tumor, sendo um supressor da iniciação tumoral, inibindo principalmente a angiogênese, além de promover fenótipos celulares imunes antitumorais. Entretanto, o lado o qual é mais explorado é o lado da atividade pró-tumoral, onde alguns tipos de câncer apresentam mutações nessa via de KEAP1/NRF2, com as mais importantes mutações sendo as de perda de função de KEAP1 e de ganho de função ou amplificação em NRF2. Ainda pode atuar na reprogramação celular, atuando no metabolismo de glicose, via das pentoses e aminoácidos, na evasão imune (supressão da resposta imune), e controlando genes de proliferação e diferenciação celular (Sánchez-Ortega *et. al.*, 2021).

Um dos achados na literatura sugere um aumento da expressão nuclear de NRF2 em 26% dos casos avaliados, mesmo com poucas mutações em *KEAP1/NFE2L2* (gene de transcrição de NRF2), e esse achado culminou em um desfecho pior para os pacientes, além de possuir um possível papel no mecanismo de resistência à quimioterapia de derivados de platina (Solis *et. al.*, 2010).

1.3 Tratamentos para o Câncer de pulmão

Uma vez diagnosticada a neoplasia maligna pulmonar, a primeira escolha terapêutica é, geralmente e se possível, a retirada cirúrgica do tumor e do entorno, muitas vezes uma lobectomia. Dado que a maioria dos diagnósticos acontecem em estágios com comprometimento de linfonodos adjacentes ou distantes (estadiamentos II e III), a a quimioterapia adjuvante (pós-cirúrgica) se faz necessária na maior parte dos casos. Em estadiamento IV, metastático, a terapia farmacológica (ou imunoterapia) sistêmica é a escolha, podendo vir acompanhada de radioterapia para controle de algumas lesões. A quimioterapia citotóxica mais usada envolve agentes modificadores do DNA, principalmente os agentes derivados de platina, a qual foi demonstrado eficácia na sobrevida global dos pacientes em 1988 (Novello *et. al.*, 2016). Os derivados de platina apresentam efeito “tipo-alquilante” de DNA - dado que adicionam platina e não grupamentos alquil diretamente à dupla fita. Ao reagir com os nucleotídeos no DNA, eles promovem quebras de fita, assim como inibem a etapas de síntese de DNA na fase S e produção de RNA por diferentes polimerases, o que

culmina em parada no ciclo celular e apoptose (Novello *et. al.*, 2016; El-Khateeb *et. al.*, 1999). Sendo assim, na maior parte dos casos, compostos de platina, especialmente a cisplatina, em associação com um segundo fármacos de diferente mecanismo, como vinorelbina, gemcitabina, pemetrexede ou docetaxel, compõem a primeira linha de tratamento de carcinomas pulmonares (Novello *et. al.*, 2016).

Dentro da quimioterapia clássica há muitos problemas e limitações no seu uso. Os principais problemas são a não-seletividade do tratamento, ocasionando em grandes efeitos adversos sistêmicos. Como a maioria das quimioterapias são citotóxicas não-seletivas, elas acabam causando morte em células saudáveis altamente replicativas, como células mucosas, de folículos capilares e células mielóides. Isso faz com que os efeitos adversos sejam muito sentidos pelos pacientes, principalmente causando náuseas, enjôos, vômitos, perda de pelos e mielossupressão, fazendo com que pessoas tratadas com quimioterapia sejam mais suscetíveis a infecções oportunistas. Outro problema bem comum é a resistência adquirida à quimioterapia, mediada principalmente pela exposição às drogas. As células tumorais expostas à quimioterapia podem apresentar mudança nas estruturas células, incluindo os receptores e proteínas, alteração no metabolismo celular e/ou de drogas que necessitam ser metabolizadas (e.g. 5-fluoroacila), ou ainda na excreção de drogas (e.g. inserção de bombas de efluxo na membrana celular) (Raguz e Yague 2008; Chakraborty e Rahman, 2012). Essas alterações fazem com que as células tumorais se tornem resistentes a terapia, fazendo com que seja necessário a troca dos fármacos.

Atualmente, fármacos e imunobiológicos com mecanismo de ação diferente dos quimioterápicos citotóxicos também se tornaram parte tanto da primeira linha de terapia quanto em pacientes cujo câncer apresentou progressão após primeira ou segunda linhas citotóxicas. Dentre estes novos fármacos, destacam-se as terapia-alvo e as imunoterapias com inibidores do ponto de restrição (*checkpoints*) imunológico PD-1/PD-L1. Particularmente relevante para este estudo, a terapia-alvo baseia-se no uso de moduladores (geralmente inibidores) farmacológicos de proteínas cuja atividade está exacerbada nas células tumorais em relação aos tecidos saudáveis. Neste contexto, os maiores sucessos têm sido obtidos com fármacos que atuam sobre a hiperativação de proteínas codificadas por oncogenes. Um dos pré-requisitos para uso de uma terapia-alvo direcionada para uma proteína com ativação aberrante em um determinado é a confirmação histológica ou molecular da presença do alvo na amostra

tumoral. Assim, a terapia-alvo escolhida vai estar relacionada ao fenótipo e genótipo apresentado um dado tumor. Por exemplo, carcinomas pulmonares com mutação EGFR podem se beneficiar de inibidores da autoativação deste receptor tirosina cinase, como o Afatinibe, Erlotinibe e Gefitinibe (Gainor *et. al.*, 2016); Para mutantes da via ALK, pode se escolher os inibidores Alectinibe, Ceritinibe e Crizotinibe; para mutantes de BRAF, Dabrafenibe e Trametinibe; e para mutantes de KRAS, o Sotorasibe, aprovado em 2022 pela ANVISA (Skoulidis *et. al.*, 2021). Tumores com amplificação de HER2 pode-se optar pelo anticorpo anti-HER2 fármaco-conjugado trastuzumabe-deruxtecan. No campo das imunoterapias, o Nivolumabe, pembrolizumab e atezolizumab são os anticorpos com eficácia comprovada em carcinomas com expressão positiva de PD-L1 em células tumorais.

A figura 2 ilustra a distribuição das principais alterações genéticas determinadas em coortes de câncer de pulmão sequenciadas no projeto The Cancer Genome Atlas (TCGA), o principal consórcio de oncogenômica, e um “divisor de águas” na elucidação dos novos alvos para terapias-alvo em diversos tipos tumorais. A figura é um *oncoprint* feito através do cBioPortal (cbioportal.org), utilizando dados do TCGA de uma coorte de *Pan-lung cancer* com 1144 amostras, dos quais foram escolhidos 10 genes (*KEAP1*, *NFE2LE*, *TP53*, *ALK*, *KRAS*, *BRAF*, *ROS1*, *EGFR*, *PTEN*, *PIK3CA*) e suas alterações. Cada uma das cores representa uma aberração genética presente em cada proteína, e cada risco presente na linha cinza representa uma das amostras presentes na coorte. Metade desses genes escolhidos já possuem terapia-alvo, mesmo com uma frequência de mutações menores, como por exemplo *ALK* com 5%, *ROS1* com 6% e *BRAF* 7%.

Figura 2. Oncoprint dos principais genes mutados em câncer de pulmão

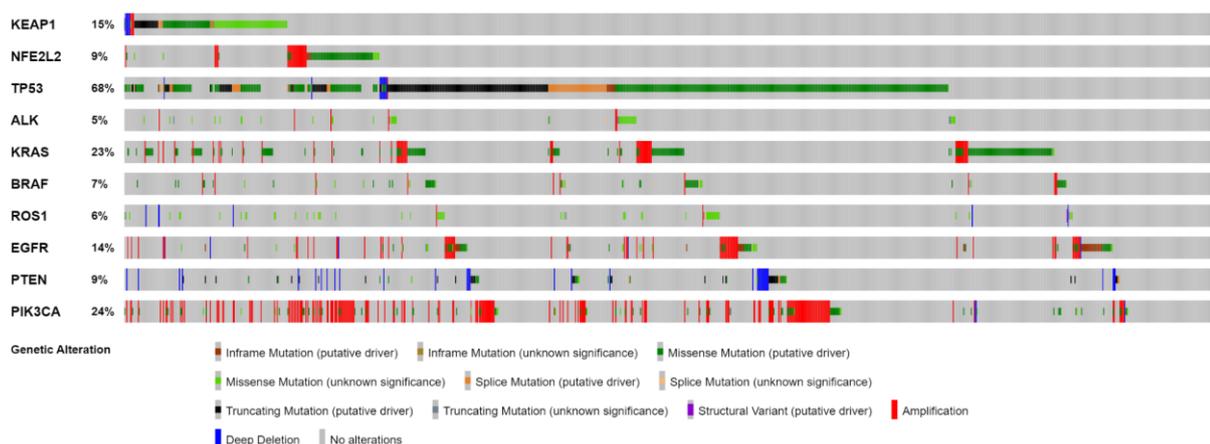


Figura 2. *Oncoprint* de uma amostra de *Pan-lung cancer* do TCGA de 1144 amostras do ano de 2016, demonstrando as 10 mutações escolhidas e suas frequências dentro desta corte. Essa figura demonstra a heterogeneidade das mutações no câncer de pulmão, demonstrando que as mutações de *KEAP1* e *NFE2L2* não se sobrepõem às outras mutações. Cada risco significa um tipo de aberração genética. Fonte: Autor, 2024.

Com isso, é possível notar que 15% e 9% das amostras apresentam mutações em *KEAP1* e *NFE2L2* (gene de NRF2), respectivamente. Ainda, tais mutações são mutualmente exclusivas, ou seja, não co-ocorrem nos mesmos pacientes (sem sobreposições de linhas nas amostras), assim como não co-ocorrem com as alterações em outros genes como *EGFR*, *ALK* e *BRAF*. Dado que não existe terapia-alvo para tumores com *NFE2L2/KEAP1* mutantes, a maior parte destes pacientes será submetida a protocolos de a quimioterapia padrão como escolha de tratamento. Apesar da imunoterapia ser uma opção de tratamento para tumores de células não-pequenas, ainda não há uma relação bem estabelecida de resposta à imunoterapia e mutações-chave como em *NFE2L2* ou *KEAP1*, apesar de alguns estudos sugerirem que mutações nessas vias tendem à baixa resposta de imunoterapia (Tanaka e Morise, 2022; Li *et. al.*, 2024). Assim, pacientes com mutações na via de NRF2 são uma proporção importante dos diagnósticos de câncer de pulmão ainda desprovidos de terapias modernas eficazes com perfil de efeitos adversos mais favorável.

1.4 Inibidores de NRF2 e ML385

Diferentes tipos de pesquisa para o descobrimento de inibidores ou interferentes da via NRF2/*KEAP1* seguem sendo feitas, dentre elas estão a pesquisa com compostos naturais, interferentes com oncogenes que interagem funcionalmente com a via, o uso de RNA de interferência (RNAi) contra o NRF2 ou seus reguladores, regulação positiva da supressão de *KEAP1*, e a triagem de fármacos em bancos de dados e em estudos computacionais (Panieri e Saso, 2019).

Dentre as drogas mais conhecidas como inibidores desta via estão a luteolina, trigonelina e ML385. Tanto a luteolina quanto a trigonelina são derivados de composto natural, sendo a primeira um flavonóide e a segunda um alcalóide, e possuem alvos diferentes dentro da via. A luteolina atua diretamente no fator de transcrição NRF2, diminuindo assim a sua transcrição, conseqüentemente diminuindo a quantidade de RNAm de NRF2 e os níveis de proteína transcritos (Tang *et. al.*, 2011; Chian *et. al.*, 2014). Já a trigonelina atua no sistema de importação nuclear do NRF2, diminuindo a

translocação do NRF2 do citoplasma para o núcleo, diminuindo assim a quantidade de NRF2 dentro do núcleo e assim também diminuindo a transcrição de proteínas (Arlt *et. al.*, 2013). Embora tais compostos modulem a via de NRF2, mecanismos farmacodinâmicos como, por exemplo, a proteína-alvo, o sítio de interação dos fármacos no receptor/alvo farmacológico, e o tipo de interação (agonismo/antagonismo) não foram determinados.

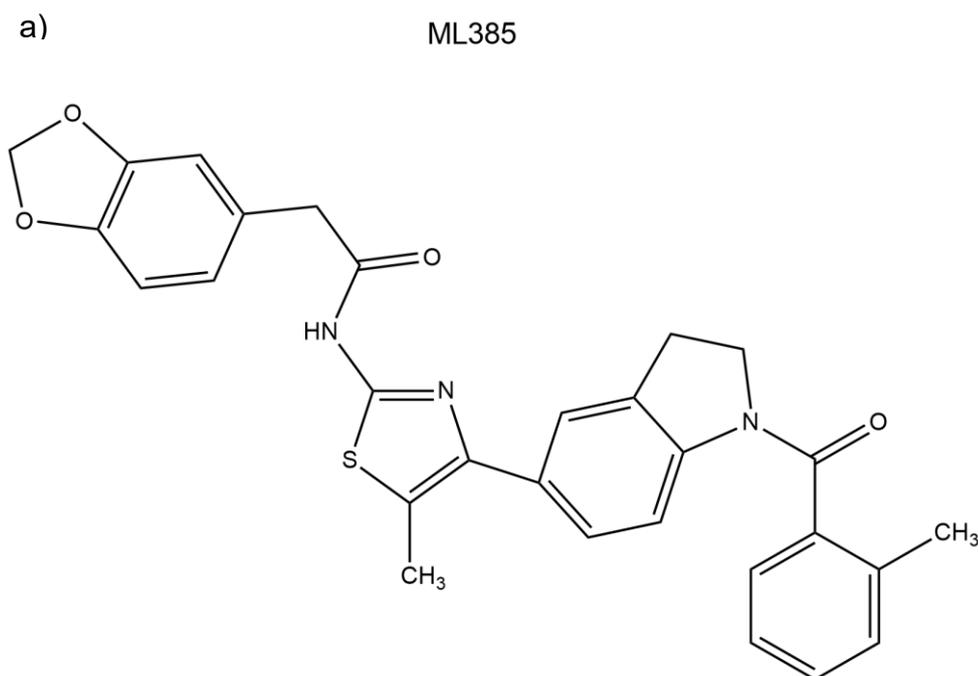
Por outro lado, o ML385 é um fármaco descoberto através de uma triagem para inibidores de NRF2 do tipo HTS (*high throughput screening*) em uma biblioteca e repositório molecular de milhares pequenas moléculas (MLSMR) em linhagem com expressão do construto ARE-luciferase (Singh *et. al.*, 2016). A estrutura molecular é principalmente de anéis tiazólicos e indólicos, sendo o substituinte orto no grupo benzoila o principal responsável pelo efeito de inibição do NRF2 (Figura 3a) (Singh *et. al.*, 2016). Esses anéis de indol e tiazol são grupos orgânicos que vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos, pelos seus grandes espectros de ação. O tiazol é um anel heterocíclico contendo cinco átomos de carbono, um átomo de enxofre e outro de nitrogênio, do qual já se relataram que compostos derivados dele possuíam atividades antibacterianas, anti-inflamatórias, cardiovasculares, antitumorais e muitas outras, sendo inclusive presente em drogas já utilizadas na prática clínica oncológica, como no Dasatinibe, um inibidor de tirosina quinase da fusão Bcr-Abl em leucemia mieloide crônica, no Daprafenibe, um inibidor específico de B-Raf mutante, e algumas outras drogas (Sharma *et. al.*, 2020). O grupo indol é um grupamento heterocíclico, contendo um anel benzênico ligado a um anel pirrólico. São estruturas também altamente reativas, também já possuindo atividades farmacológicas previamente descritas, sendo essa estrutura presente em medicamentos antitumorais utilizados na clínica, como a vincristina, vinblastina e alectinibe, um inibidor seletivo para Carcinoma pulmonar de células não-pequenas mutantes em *ALK* (Dhuguru & Skouta, 2020).

No seu estudo de descoberta, os pesquisadores demonstraram que o ML385 se liga a Neh1, no domínio Cap 'N' Collar Basic Leucine Zipper (CNC-bZIP) de NRF2, a fração responsável pela ligação de DNA, promovendo assim o bloqueio da ligação do complexo NRF2-MAFG (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene*) com a sequência ARE (*Antioxidant Response Element*) reduzindo assim o potencial transcricional do complexo NRF2-MAFG-ARE (Figura 3b e 3c) (Singh *et. al.*, 2016). Em ensaios clonogênicos, quando utilizado em combinação com compostos de

platina, doxorrubicina ou taxol, o ML385 aumentou a toxicidade destes quimioterápicos em linhagens de câncer de pulmão, em comparação com quimioterápicos isolados, assim como aumentou o efeito da carboplatina em modelos não-clínicos de implante tumoral em roedores (Singh *et. al.*, 2016). Ainda, foi feita a análise farmacocinética do ML385, apresentando uma meia-vida de 2,82 horas depois de injeção intraperitoneal em camundongos, além de apresentar um bom perfil de toxicidade hepática (Singh *et. al.*, 2016).

Entretanto, apesar de ter sua farmacodinâmica bem definida, e alguns efeitos avaliados no seu estudo de descoberta (Singh *et. al.*, 2016), os efeitos secundários relacionados a inibição de NRF2 pelo ML385 ainda não são conhecidos, com isso em vista, decidimos avaliar de que forma essa droga exerce efeitos antitumorais em células *KEAP1/NFE2L2* mutantes, avaliando se o efeito antitumoral da droga está relacionado a citotoxicidade, efeito antiproliferativo, modulação do ciclo celular, ou indução de apoptose e outros tipos de morte celular.

Figura 3. Características do ML385 e interação com a via NRF2/KEAP1



2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ML385 sobre a densidade celular e morfologia em cultivos A549 *in vitro*;
- Determinar o efeito do ML385 sobre a proliferação clonal e formação de colônias em ensaios de exposição prolongada;
- Avaliar o impacto do ML385 sobre o ciclo celular, marcadores de apoptose e autofagia em células A549;
- Quantificar os níveis celulares de glutathiona e espécies reativas de oxigênio em células KEAP1 mutantes tratadas com ML385

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

A linhagem celular utilizada foi a A549 (*KEAP1* mutada), proveniente da ATCC, e cedida pelo Dr. André Báfica (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFSC). As células foram mantidas em meio DMEM High Glucose (*Dulbecco's modified eagle's medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia, Brasil) e 1% de antibiótico:antimicótico (1:1) (A5955, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 37°C e 5% CO₂ em estufa umidificada. O ML385 foi obtido da Sigma-Aldrich (#SML1833), e dissolvido em solução de 25 mM em DMSO puro.

3.2 Ensaio SRB

A densidade celular ao final dos tratamentos foi feita utilizando a sulforodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich, S1402, Darmstadt, Alemanha) (Lin *et. al.*, 1999; Papazisis *et. al.*, 1997; Vichai & Kirtikara, 2006). O método foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do fármaco através de concentrações pré-estabelecidas em um protocolo de 3 dias ou 6 dias. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de 6×10^3 células/poço para o tratamento de 3 dias, e 1×10^4 células/poço para o tratamento de 6 dias, e foram tratadas nas concentrações de 100, 50, 25, 10, 5 e 1 μM um dia após o plaqueamento. Ao final do tratamento, as células foram fixadas nas placas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, coradas pelo SRB e então reveladas por Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 10 mmol/L (pH 10.5) e lidos no espectrofotômetro (Infinite M200 Tecan, Tecan Trading AG, Switzerland) no comprimento de onda 510 nm (Vichai & Kirtikara, 2006; Orellana & Kasinski, 2016).

3.3 Ensaio de proliferação clonogênica

O ensaio clonogênico foi feito para avaliar a capacidade das células de formar colônias em presença do tratamento por tempo prolongado.. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços, com 250 células por poço, e foram tratadas com concentrações de 25, 10 e 5 μM quando havia colônias de pelo menos 4 células uniformemente pelo poço, e três dias depois tratadas novamente. Então, após dois tratamentos (9 dias), retirou-se o meio de cultura e lavou-se com tampão fosfato salina (PBS) 1x as células foram fixadas em metanol 100% gelado a 4°C por 20 minutos. Após remover a solução de metanol, as colônias foram incubadas com cristal violeta 0,5% m/v em 25% metanol/H₂O_d por 10 minutos, lavadas com água da torneira e secas em temperatura ambiente (Crowley *et. al.*, 2016). Uma imagem foi adquirida de cada poço em campo claro em um estereomicroscópio, com zoom de 0,5x (SZX16®, Olympus, Tóquio, Japão). As colônias foram ressuspensas em 30% ácido acético/H₂O_d e lidas no espectrofotômetro (Infinite M200 Tecan, Tecan Trading AG, Switzerland) no comprimento de onda de 585 nm.

3.4 Immunoblot

Para avaliar o mecanismo de morte celular, foi realizada a técnica de *Immunoblotting* para avaliação da expressão proteica de Caspase-3 clivada, e LC3 A/B I/II (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3). Para os tratamentos foram plaqueadas 5×10^4 células, em placas de 6 poços, tratadas com as concentrações de 25, 10 e 5 μM , e coletadas 6 dias depois. As células foram coletadas diretamente por raspagem em tampão Laemmli 5x, sendo os volumes de coletas ponderados de acordo com a confluência celular ao final dos tratamentos. Como grupo comparador, foi utilizado o quimioterápico etoposídeo nas concentrações de 10 e 25 μM , do qual foram coletadas como poço único, pela grande citotoxicidade do fármaco.

As células lisadas e seu conteúdo foram colocadas primeiramente em gel de agarose 15% (10% SDS dodecilsulfato de sódio), com a corrida acontecendo em 15 mA/gel até chegar ao gel de empacotamento, e então aumentada para 20 mA/gel. Transferiu-se o conteúdo do gel para membranas de PVDF por 1h30min/gel, em sistema semisseco (200 mA/20V). As membranas foram coradas com *Ponceau* para verificar a eficácia da transferência, e após a verificação foram descoradas com TTBS (Solução salina tamponada com Tris e Tween 20) 1x, e bloqueadas com TTBS 1x com

5% de leite desnatado. Após o bloqueio da membrana, incubou-se *overnight* e à 4°C as membranas com anticorpos primários anti-Caspase-3 (Cell signaling technology, #9664s, Massachusetts, EUA) anti-LC3 A/B (Cell signaling technology, #4108, Massachusetts, EUA), anti-beta-actina (Cell signaling technology, #8457, Massachusetts, EUA), diluídos 1:1000 em tampão TTBS 1X com 5% de albumina, e com anticorpos secundários de coelho (*Goat anti-rabbit*, sc-2004, Santa Cruz Technology, California, USA) conjugados com peroxidase de rabanete (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*) na diluição de 1:10000 e revelados. A avaliação das proteínas foi calculada ponderando pela quantidade de beta-actina.

3.5 Análise de Ciclo Celular

A fim de avaliar o efeito do composto ML385 nas diferentes fases do ciclo celular, foi utilizado o kit comercial PI/RNase Solution (Immunostep®, Espanha). Esse kit contém iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*), composto que apresenta a capacidade de intercalar os ácidos nucleicos. O iodeto de Propídio tem a capacidade de emitir diferentes intensidades de fluorescência de acordo com a quantidade de DNA presente nas células, o que varia ao longo das fases do ciclo celular (Pozarowski; Darzynkiewicz, 2004).

Para isso as células A549 (1×10^5 células/poço para 3 dias e $5,0 \times 10^4$ células/poço para 6 dias) foram incubadas com diferentes concentrações de ML385 (0, 5, 10 ou 25 μM) pelo período de 3 e 6 dias em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO_2 . Foi utilizado como grupo comparador 25 μM de etoposídeo. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 200 μL de etanol 70% pelo período de 30 min a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS com adição de 2% de albumina sérica bovina (BSA) com finalidade de evitar ligações inespecíficas. Por fim, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento celular foi ressuspenso com 300 μL de PI com RNase, e a suspensão foi incubada por 15 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente. Os doublets foram excluídos após a realização de “gates” no canal PE (largura x área) e adquiridos 10.000 eventos em ciclo celular (storage gate) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o software BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®).

3.6 Avaliação das espécies reativas de oxigênio (ERO)

A avaliação do efeito do ML385 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio foi feita utilizando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Cayman Chemical, 85155, Michigan, EUA). A avaliação foi feita utilizando fluorescência medida em espectrofotômetro. Para avaliação por espectrofotometria, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, em densidade de 1×10^3 células/poço, tratadas no dia seguinte com as concentrações de 25, 10 e 5 μM do ML385, e mantidas por 6 dias. No dia da leitura, um grupo foi incubado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1 mM por 1h, e todos os grupos foram incubados com DCFH 10 μM por 1h em DMEM sem soro fetal bovino, e então medidas no espectrofotômetro (Infinite M200 Tecan, Tecan Trading AG, Switzerland) com excitação em 485nm e emissão em 532nm. Como os tratamentos em 6 dias com o ML385 causam alguma alteração na viabilidade celular, os dados obtidos na fluorescência do espectrofotômetro foram normalizados por um teste de densidade celular por SRB, realizado junto na mesma placa, seguindo o mesmo protocolo de tratamento e quantificação do ensaio de DCF acima descrito.

3.7 Avaliação da atividade de Caspase-3/7 e quantificação de Glutathiona livre (GSH) por quimioluminescência

A avaliação de Caspase-3/7 foi realizada utilizando o kit Caspase-3/7-GLO® (Promega, G8091, Wisconsin, EUA). A avaliação de glutathiona foi feita utilizando o kit GSH-Glo™ (Promega, V6911, Wisconsin, EUA).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 1 a $1,5 \times 10^5$ células/poço, para um tratamento com duração de 6 dias. Em um dos experimentos as células foram tratadas um dia após o plaqueamento, com as concentrações de 25, 10 e 5 μM , e no sexto dia foram lavadas com PBS 1x e avaliadas de acordo com o protocolo padrão do fabricante. Após isso, a leitura de luminescência foi realizada em luminômetro (Infinite M200 Tecan, Tecan Trading AG, Switzerland).

3.8 Análise estatística

Os experimentos foram rodados com um n amostral de 3 ou 4. Para a comparação de dados entre 3 ou mais grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey para avaliação da diferença entre

os grupos utilizando o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade Celular

Foi realizado uma curva concentração-efeito para avaliar o efeito do ML385 sobre a viabilidade celular de células A549 com mutação em KEAP1, com tratamento de 3 e 6 dias, sendo nesse e em todos os experimentos posteriores, utilizados uma concentração de tratamento para cada grupo (tratamento não cumulativo). As figuras 4 e 5 demonstram o efeito do composto nesses dois tempos, respectivamente. As células A549 quando tratadas com o ML385 por 3 dias apresentaram uma diminuição na viabilidade celular estatisticamente significativa somente na concentração de 100 μ M quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto nas outras concentrações a diminuição da média não mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo controle (Figura 4, a). As figuras 4 b) e c) são imagens representativas dos poços, sendo a b) em aumento de 100x para representar melhor a morfologia das células, e em c) em 40x para representar melhor a confluência dos poços.

Figura 4. Efeito do ML385 sobre a viabilidade celular em 3 dias de tratamento

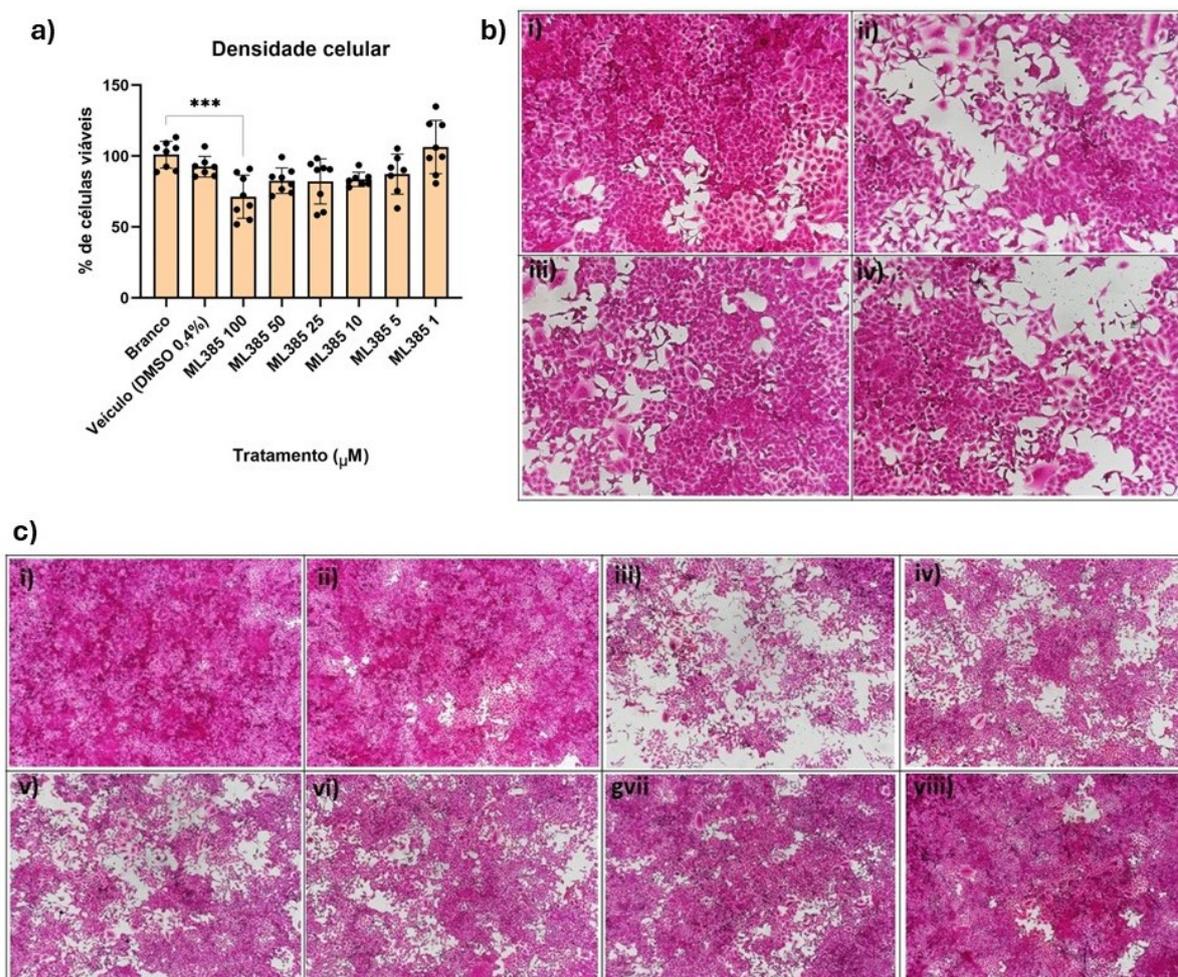


Figura 4. a) As células A549 (6×10^3 células/poço para 3 dias) foram incubadas pelo período de 3 dias com diferentes concentrações 100, 50, 25, 10, 5 e 1 μM de ML385, e o grupo branco representa células sem nenhum tratamento, e o grupo veículo apresenta DMSO 0,4% (dilúente do fármaco na maior concentração). Os gráficos representam a média \pm DP de pelo menos dois experimentos independentes ($n=2$; 1 em triplicata ou 1 em quadruplicata), analisados por ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$). b) Imagens ilustrativas para demonstrar a morfologia das células após o tratamento de 3 dias, sendo i) controle, ii) ML385 25 μM , iii) ML385 10 μM , iv) ML385 5 μM . Fotos tiradas em microscópio invertido no aumento de 100x. c) Imagens ilustrativas para demonstrar a confluência dos poços após o tratamento de 3 dias, sendo i) controle, ii) DMSO 0,4%, iii) ML385 100 μM , iv) ML385 50 μM , v) ML385 25 μM , vi) ML385 10 μM , vii) ML385 5 μM , viii) ML385 1 μM . Fotos tiradas em microscópio invertido no aumento de 40x. Fonte: Autor, 2024

Normalmente, os ensaios de avaliação de citotoxicidade e/ou proliferação celular são levados por 3 dias, entretanto, foi demonstrado que o maior efeito de inibição do ML385 nos níveis de NRF2 transcritos são após 72 h (Singh *et. al.*, 2016), portanto optou-se por avaliar a citotoxicidade em 6 dias.

Na figura 5 a), as células A549, quando tratadas com o inibidor ML385 por 6 dias, apresentaram uma diminuição na viabilidade celular estatisticamente significativa em todas as concentrações quando comparado ao grupo controle ($p <$

0,05), demonstrando um efeito concentração-resposta entre as concentrações de 1 à 10 μM , apresentando um platô no efeito a partir dessa concentração. As figuras 5 b) e c) são imagens representativas dos poços, sendo a b) em aumento de 100x para representar melhor a morfologia das células, e em c) em 40x para representar melhor a confluência dos poços.

Já é sabido na literatura que o aumento da expressão de NRF2 pode levar a alterações metabólicas, como a reprogramação da via glicolítica, podendo levar ao aumento da proliferação celular através da regulação de genes ligado ao metabolismo da glicose (Murakami & Motohashi, 2015). Além disso, essa via parece ser capaz de inibir indiretamente as formas de morte celular programada, como a apoptose, através da regulação de glutathione-peroxidase 4 (GPx4) e tioredoxina redutase 1 (TRXR1), principalmente pelo papel de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (Jenkins & Gouge, 2021). Como demonstrado na figura 4a), as concentrações que demonstraram boa eficácia na inibição do NRF2, como a de 10 e 5 μM no estudo de Singh *et. al.*, (2016), também foram capazes de diminuir a quantidade de células nos poços após 6 dias de tratamento. Esse resultado foi o que levou a pensar nas possibilidades de como a droga estava interferindo nas células, de forma que ela poderia estar causando ou morte celular, ou a pausa/desaceleração da proliferação decorrente da inibição de NRF2. Além disso, as imagens 3b. e 4b, que demonstram melhor as morfologias celulares, sugerem que algumas células possuem morfologias diferente das encontradas nos grupos controle negativo, sendo maiores e com formatos irregulares, típicas de células senescentes. Entretanto, em nenhuma das condições, mesmo em tempo de 6 dias (Figura 5 b)), as culturas apresentaram morfologias de morte celular, como a formação de corpos apoptóticos ou presença de células soltas no meio de cultivo, indicando que o efeito do ML385 deva ser majoritariamente antiproliferativo e não-citotóxico, pelo menos nas condições testadas no modelo.

Figura 5. Efeito do ML385 sobre a viabilidade celular em 6 dias de tratamento

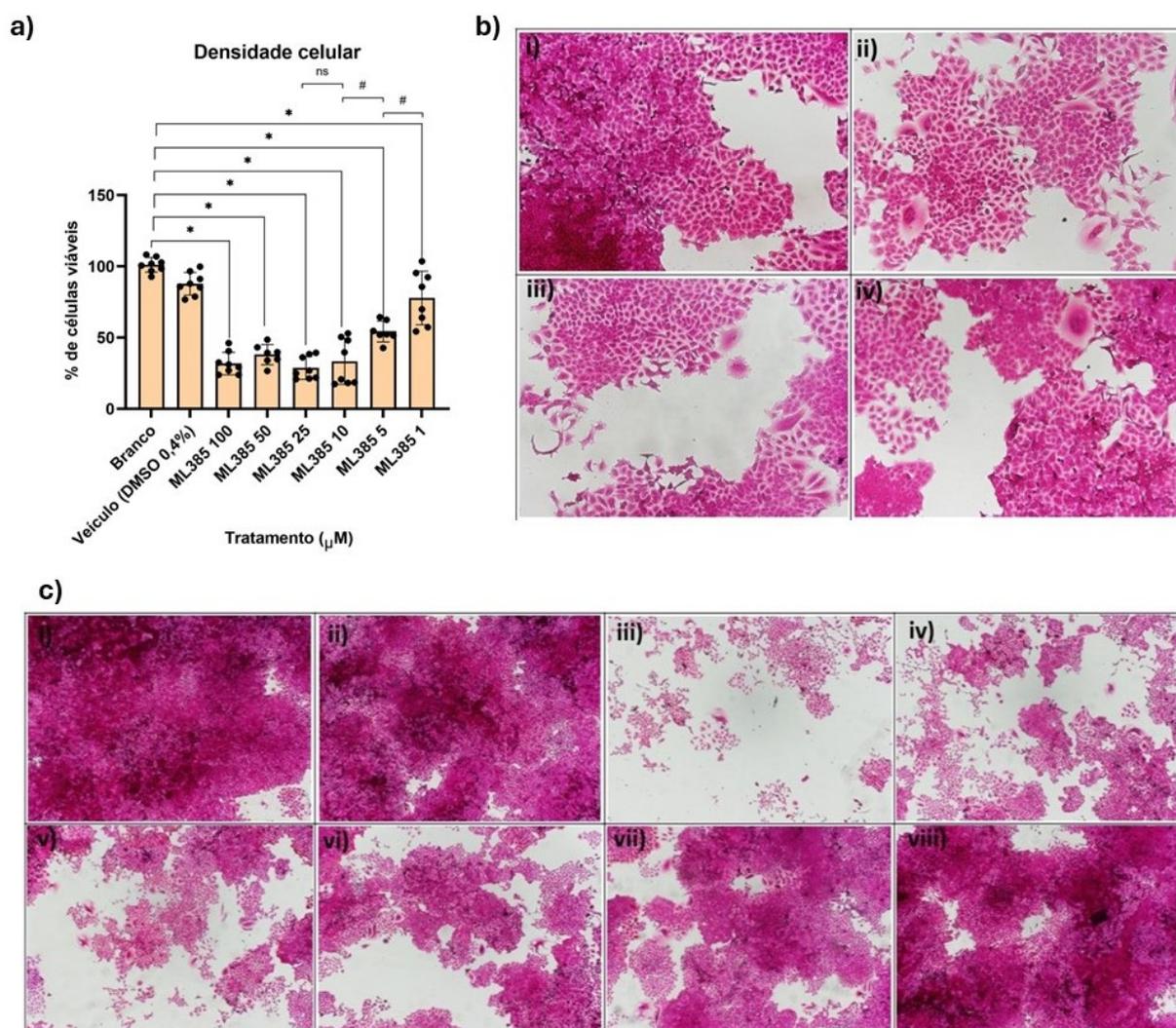


Figura 5. a) As células A549 (1×10^3 células/poço para 3 dias) foram incubadas pelo período de 6 dias com diferentes concentrações 100, 50, 25, 10, 5 e 1 μM de ML385, e o grupo controle representa células sem nenhum tratamento, ou DMSO 0,4% (diluinte do fármaco equivalente à concentração mais alta). Os gráficos representam a média \pm DP de pelo menos dois experimentos independentes, analisados por ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$ comparação com grupo controle; # $p < 0,05$, comparação entre tratamentos). b) Imagens ilustrativas para demonstrar a morfologia das células após o tratamento de 6 dias, sendo i) controle, ii) ML385 25 μM , iii) ML385 10 μM , iv) ML385 5 μM . Fotos tiradas em microscópio invertido no aumento de 100x. c) Imagens ilustrativas para demonstrar a confluência dos poços após o tratamento de 6 dias, sendo i) controle, ii) DMSO 0,4%, iii) ML385 100 μM , iv) ML385 50 μM , v) ML385 25 μM , vi) ML385 10 μM , vii) ML385 5 μM , viii) ML385 1 μM . Fotos tiradas em microscópio invertido no aumento de 40x. Fonte: Autor, 2024

4.2 Ensaio clonogênico

Este ensaio foi realizado para verificar o efeito do ML385 sobre a formação de colônias das células A549. Utilizando dados do ensaio SRB prévio, e dados do seu estudo de descoberta (Singh *et al.*, 2016) se definiu as concentrações utilizadas de 10 e 5 μM para serem utilizadas nesse experimento.

O efeito proeminente do ML385 no ensaio clonogênico não se demonstrou na redução do número de colônias. Como demonstrado pela figura 6) a), o efeito da droga se provou mais relevante foi no tamanho das colônias formadas, isto é, na quantidade de células/colônia. Baseado nisso, avaliou-se a absorvância do corante cristal violeta em cada poço, de modo a estimar o efeito do ML385 sobre a massa celular presente ao final dos tratamentos. A figura 6) b) representa a avaliação de absorvância de cada poço, onde foi demonstrado efeito do ML385 na diminuição da densidade celular em ambas as concentrações avaliadas (10 e 5 μM), quando comparado ao grupo branco ($p < 0,05$).

Figura 6. Efeito do ML385 sobre a formação de colônias

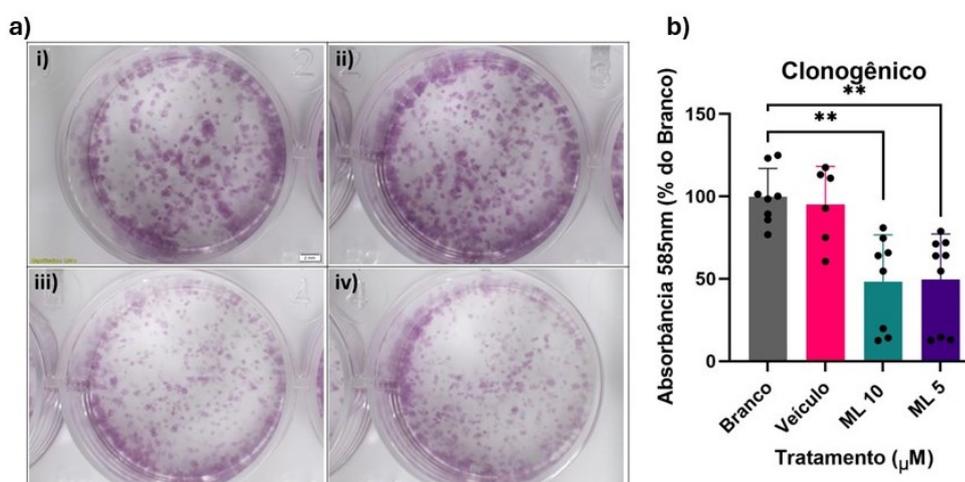


Figura 6. a) As células A549 (250 células/poço) foram tratadas a cada 3 dias (total 9 dias de crescimento de colônias), e então fixadas e coradas no poço. Sendo as representações i) controle, ii) DMSO 0,4%, iii) ML385 10 μM , iv) ML 5 μM . b) Demonstra a avaliação quantitativa de absorvância do cristal violeta de cada poço, sendo os grupos controle, DMSO, ML 10 μM e ML 5 μM , do qual ambos os tratamentos apresentaram diferença estatística com o grupo controle ($p < 0,05$). Os gráficos representam a média \pm DP de pelo menos dois experimentos independentes ($n=2$, em triplicata ou quadruplicata), analisados por ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024.

Os resultados obtidos no ensaio de formação de colônias (Figura 6) também ajudaram a endossar a hipótese de que o bloqueio de NRF2 pelo ML385 poderia estar resultando em desaceleração da proliferação ou alterações metabólicas levando a outras formas celulares como a quiescência ou senescência. O fato de o número de colônias não ter diminuído significativamente dá suporte ao observado nos experimentos apresentados nas figuras 4 e 5. Esses dados corroboram achados da literatura, em que o efeito antitumoral do ML385, em ensaio de viabilidade por MTT, foi maior em células KEAP1 mutantes (A549) quando comparados com células Calu3

(KEAP1 funcional/não-mutante), embora o nível de redução de viabilidade tenha sido de aproximadamente 30% em 3 dias de tratamento em A549 (Delgobo *et. al.*, 2021). Essa possibilidade de afetar a velocidade de proliferação celular também corrobora com outros achados da literatura, que sugerem que a mutação em NRF2/KEAP1 podem levar ao aumento da proliferação celular por conta da reprogramação metabólica da via glicolítica (Wang *et. al.*, 2018).

4.3 Avaliação do mecanismo de morte celular

Baseado nos dados acima descritos, optou-se por avaliar os possíveis mecanismos de morte celular do ML385 em 6 dias de tratamento, nas concentrações de 25, 10 e 5 μM , as quais possuíam efeito de diminuição da quantidade de células e estavam de acordo com os estudos seminais de inibição de NRF2 pelo ML385 (Singh *et. al.*, 2016). Utilizamos o etoposídeo (pool de amostras nas concentrações de 10 e 25 μM) como comparativo, um quimioterápico bloqueador de topoisomerase II, e possivelmente ligante de cromatina, com efeito citotóxico. A topoisomerase II é uma proteína que é importante para a quebra de DNA de fita dupla para futura replicação, e o bloqueio de uma parte das reações da topoisomerase causa um bloqueio no processo de replicação e reparo de DNA, promovendo apoptose (Montecucco *et. al.*, 2015). A figura 7 apresenta em a) e b) proteínas relacionadas a mortes celulares, com a caspase-3 clivada relacionada à apoptose e a LC3 A/B I e II à autofagia. Em ambas as proteínas avaliadas, o tratamento com ML385, nas concentrações de 25, 10 e 5 μM , não demonstrou diferença significativa quando comparado ao controle negativo (células não tratadas), enquanto o etoposídeo demonstrou uma diferença significativa na quantidade de LC3 A/B I e II, quando comparado ao controle negativo. A figura 7) c) é uma representação dos *immunoblottings* realizados.

Figura 7. Avaliação do mecanismo de morte celular do ML385 por *immunoblotting*

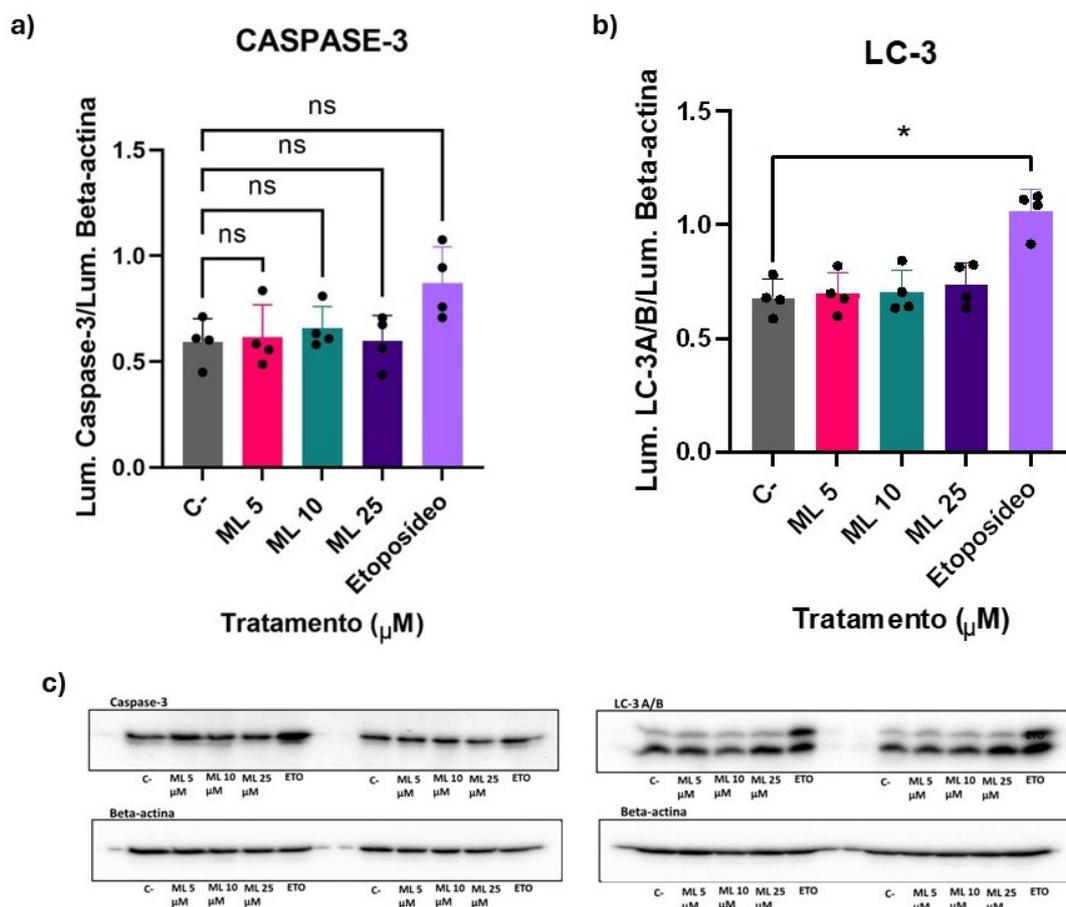


Figura 7. Dois dias após o plaqueamento (5×10^4 células/poço), as células foram tratadas com ML385 e controles, e coletadas após 6 dias de exposição aos fármacos. A figura a) demonstra o efeito dos tratamentos do ML385 em concentrações de 25, 10 μM e 5 μM , além do etoposídeo, sobre a proteína caspase-3-clivada, dos quais nenhum tratamento apresentou diferença estatística com o grupo controle ($p > 0,05$). A figura b) demonstra o efeito dos tratamentos do ML385 em concentrações de 25, 10 μM e 5 μM , além do etoposídeo, sobre a proteína LC3 A/B I/II, sendo o etoposídeo (C+) o único tratamento que apresentou diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). A figura c) é a figura representativa dos *immunoblotting* realizados. Os gráficos representam a média \pm DP de pelo menos dois experimentos independentes, analisados por ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

Para confirmação do mecanismo de morte celular, foi realizado o kit Caspase-3/7-GLO® (Promega, G8091, Wisconsin, EUA), sendo avaliado após a incubação com ML385 nas mesmas concentrações utilizadas no *immunoblot*. A figura 7 representa os resultados da avaliação de Caspase 3/7 por luminescência em células tratadas com o ML385 por 6 dias, das quais nenhuma apresentou diferença significativa quando comparada ao controle negativo. O etoposídeo (pool de amostras de concentrações de 10 e 25 μM) não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle negativo.

A escolha de avaliar as proteínas Caspase-3 clivada e LC3 A/B I/II se deu por serem marcadores clássicos e fáceis de serem avaliados para apoptose e autofagia.

A caspase-3 é uma procaspase presente nas vias intrínseca (iniciada pela mitocôndria) e extrínseca (iniciada por receptores de membrana) de apoptose, sendo ativada por sinais que desencadeiem abertura de poros de permeabilidade transitória e liberação de citocromo c pelas mitocôndrias, em mecanismo mediado por caspase-9, ou pela ativação de receptores de membrana (ex: TRAIL e interação Fas/FasL) e ativação de caspase-3 dependente de caspase-8. Os padrões de resposta podem ser diferentes, ativando proteínas da família Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma protein-2*) como Bax (*Bcl2-like protein-4*) e Bak (*Bcl2 homologous antagonist killer*), ou ainda outras caspases, como caspase-8 e caspase-9, e que no final levarão classicamente à uma ativação da via caspase-3, após a clivagem da procaspase-3. Após essa ativação serão formados os corpos apoptóticos e se iniciará o processo de morte celular em si (Porter & Jänicke, 1998; Yu *et. al.*, 2023; Holdenrieder & Stieber, 2004).

Já se descreveu na literatura que a via NRF2/KEAP1 é capaz de promover a superexpressão de Bcl-2, uma das proteínas responsáveis pela sinalização anti apoptótica. A superexpressão de NRF2, decorrente de mutações como amplificação de do gene *NFE2L2*, ou a perda de função em *KEAP1*, caso presente na linhagem A549, ocasionaria na diminuição da ativação do fator pro-apoptótico Bax, inibindo a liberação de citocromo-c pela mitocôndria e diminuição na fragmentação de DNA, além do aumento da expressão de Bcl-2, promovendo maior resistência a apoptose, radioterapia e quimioterapia (Niture & Jaiswal, 2012; Stepkowski & Kruszewski, 2011).

A proteína LC3 A/B I/II participa do processo de autofagia, particularmente durante a etapa de formação e maturação de autofagossomos, e fusão de autofagossomos com os lisossomos, sendo degradadas junto ao autolisossomo (Tanida, 2010). A via do NRF2/KEAP1 se correlaciona diretamente com a via da proteína p62, um substrato do processo autofágico. A proteína p62 é fosforilada em resposta ao estresse oxidativo, o que aumenta sua afinidade pela proteína KEAP1, o que leva à translocação de NRF2 para o núcleo, levando a produção de elementos antioxidantes responsivos (ARE) e, ainda, a transcrição de genes pró-autofágicos (Kapuy *et. al.*, 2018; Jiang *et. al.*, 2018). Em casos de células tumorais com deficiência no mecanismo de morte celular por apoptose, o aumento da autofagia pode promover a resistência celular e manutenção da viabilidade de células tumorais. Entretanto, o aumento de morte celular do tipo II, resultante do excesso de autofagia, pode ser

promovido pelo aumento da morte celular por apoptose, podendo então apresentar efeitos ambíguos no câncer (Mathew *et. al.*, 2007; Su *et. al.*, 2013).

Com isso, se esperava que a inibição com o ML385 fosse aumentar a expressão de caspase-3, mas como visto nas figuras 7 e 8, em todas as concentrações testadas a concentração da proteína não teve diferença quando comparado ao controle negativo, corroborando com os dados morfológicos das culturas A549, em que a morfologia celular não apresentou características de morte celular. Além disso, não houve nenhuma diferença em LC3 (figura 7), sendo que ambas diminuição ou aumento poderiam ser correlacionados ao aumento da morte celular, dependendo do contexto celular (Mizushima & Yoshimori, 2007). Potencialmente com um tratamento combinado onde houvesse morte celular diferente de apoptose, é possível que o bloqueio de NRF2 junto à outra quimioterapia pudesse diminuir as concentrações de LC3, promovendo uma menor resistência dessas células cancerosas. Entretanto, é possível que outros mecanismos de morte celular estejam envolvidos na inibição pelo ML385, como ferroptose, tipo de morte celular mediada por ferro, do qual o NRF2 possui um papel importante na peroxidação lipídica, regulando enzimas como GPx4, HO-1 (hemeoxigenase-1), e transportadores como xCT/SL7A11 (*cystine/glutamate transporter*) (Dodson *et. al.*, 2019), ou ainda senescência, do qual a superativação de NRF2 pode proteger as células tumorais, principalmente pelo controle da produção de ERO (Yuan *et. al.*, 2020). Ainda, dados prévios (Singh *et. al.*, 2016), demonstraram que apesar do ML385 não aumentar a atividade de caspase 3/7, a sua combinação com outras quimioterapias ele foi capaz de aumentar os níveis de caspase-3 ativada.

Figura 8. Avaliação do efeito do ML385 sobre as Caspase 3/7

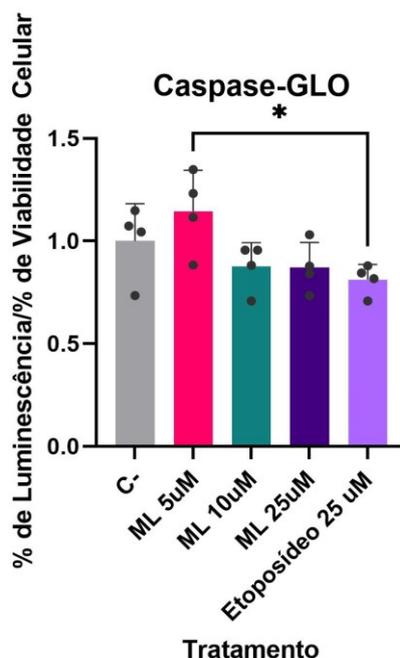


Figura 8. Após o plaqueamento ($1,0 \times 10^3$ células/poço), as células foram tratadas no dia seguinte, e avaliadas após 6 dias do tratamento através do kit Caspase-glo®. Com as mesmas concentrações de ML385 utilizadas no *immunoblotting*, não foi demonstrado diferença significativa entre nenhum dos tratamentos quando comparado ao controle negativo. Os gráficos representam a média \pm DP de pelo menos dois experimentos independentes, analisados por ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

4.4 Avaliação do efeito do ML385 sobre o ciclo celular

O efeito do ML385 na progressão do ciclo celular das células A549 foi avaliado após a incubação com ML385 com diferentes concentrações, pelo período de 3 e 6 dias. As Tabelas 1 e 2 e as Figuras 9 e 10 mostram a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. As células A549 quando tratadas com as diferentes concentrações de ML385 não apresentaram diferença significativa entre as fases do ciclo celular, quando comparadas ao controle negativo (células sem tratamento). Já nas células tratadas com o etoposídeo (pool de amostras de concentrações de 10 e 25 μ M), apresentou diferença significativa nas fases G0/G1 e G2/M quando comparadas ao controle negativo após 3 e 6 dias de tratamento. O efeito do etoposídeo foi caracterizado por uma interrupção/desaceleração na fase G2/M do ciclo celular, com aproximadamente 80% da população celular presente nesta fase, o que sugere que a mitose foi impedida com a inibição das topoisomerases.

O desenvolvimento de fármacos antitumorais envolve a procura de drogas que além de serem citotóxicas, possam atuar afetando o ciclo celular. Esse é um

processo finamente regulado, e responsável pela divisão celular. Proteínas como as ciclinas e as CDKs (ciclinas dependentes de quinases, do inglês: *cyclin-dependent kinase*) são as principais responsáveis pela progressão do ciclo celular entre as fases G1, S, G2 e M, e as CKIs (inibidores de ciclinas dependentes de quinases, do inglês: *cyclin-dependent kinases inhibitors*) são as principais inibidoras das CDKs, parando o ciclo em algumas partes do ciclo (Wiman & Zhivotovski, 2017). O ciclo celular é dividido em 4 fases, sendo essas a G1, S, G2 e M. A fase G1 (*Gap 1*) corresponde principalmente a fase de estímulos para síntese de DNA, a fase S (síntese) refere-se a fase de síntese de DNA, a fase G2 (*Gap 2*) é o intervalo entre a síntese completa de DNA e a mitose, e a fase M corresponde a mitose em si, onde há formação dos fusos mitóticos e separação das cromátides (Israels & Israels, 2000).

Alterações no ciclo celular são comuns em tumores. Aberrações genéticas como amplificação gênica ou alteração funcional de proteínas de entrada ou progressão do ciclo, ou ainda perda de proteínas que fazem paradas no ciclo celular são as principais alterações. Terapias indutoras de parada ou desaceleração do ciclo celular, ou ainda que possam retornar as proteínas de parada do ciclo à sua atividade normal são desejáveis hoje (Jingwen *et. al.*, 2017). A Via do NRF2 parece desempenhar um papel importante nas vias presentes no ciclo celular, além de regular diretamente alguns genes do ciclo (Murakami & Motohashi, 2015). O ML385, inibidor da via do NRF2 não demonstrou nenhuma capacidade de interromper ou desacelerar o ciclo celular (figura 9 e 10), mesmo quando se leva as células em um tempo prolongado, diferente do controle positivo utilizado, o etoposídeo, que é um inibidor da topoisomerase II, enzima importante na fase M para separação das cromátides irmãs, o que justifica a parada/desaceleração no ciclo em G2/M (figuras 9 e 10) (Barry *et. al.*, 1993).

Entretanto, apesar de evidências sugerirem que a ferroptose também promove a parada/desaceleração no ciclo celular (Lin *et. al.*, 2016), a senescência pode ser um dos efeitos presentes ao tratar com o ML385, pois o efeito pode aparecer em G1/G2 (Kumari & Jat, 2021), estados em que estão a maioria das células tratadas com ML385 nas figuras 9 e 10.

Figura 9. Efeito do ML385 na progressão do ciclo celular das células A549, quando incubadas por 3 dias.

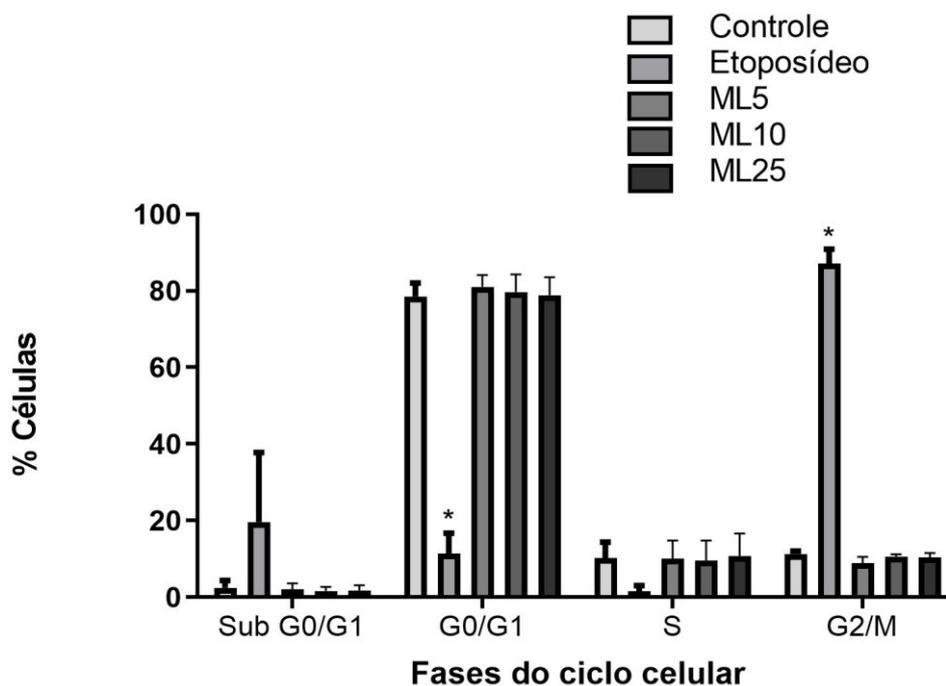


Figura 9. As células A549 (1×10^5 células/poço) foram incubadas pelo período de 3 dias com diferentes concentrações 5, 10 ou 25 uM de ML385, ou 25 uM de etoposídeo (controle positivo), já o grupo controle representa células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão representadas como G0/G1, S e G2/M. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II e analisadas no software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes, avaliados por ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

Tabela 1. Efeito do ML385 nas diferentes fases do ciclo celular das células A549 (3 dias).

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Sub G0/G1 (%)
Controle	78,5 \pm 3,2	10,2 \pm 4,2	11,3 \pm 0,7	2,43 \pm 1,96
Etoposídeo	11,4 \pm 5,3	1,5 \pm 1,5	87,1 \pm 3,8	19,6 \pm 18,2
ML5	81,05 \pm 3,05	10,1 \pm 4,7	8,85 \pm 1,65	2,05 \pm 1,55
ML10	79,7 \pm 4,6	9,65 \pm 5,15	10,65 \pm 0,55	1,60 \pm 1,09

ML25	78, 85 ± 4,65	10,8 ± 5,8	10,35 ± 1,15	1,75 ± 1,32
------	------------------	---------------	-----------------	----------------

Tabela 1. As células A549 (1×10^5 células/poço) foram incubadas pelo período de 3 com diferentes concentrações 5, 10 ou 25 μM de ML385, ou 25 μM de etoposídeo (controle positivo), já o grupo controle representa células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão representadas como G0/G1, S e G2/M. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS CantoTM II e analisadas no software InFinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes avaliados por ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

Figura 10. Efeito do ML385 na progressão do ciclo celular das células A549, quando incubadas por 6 dias.

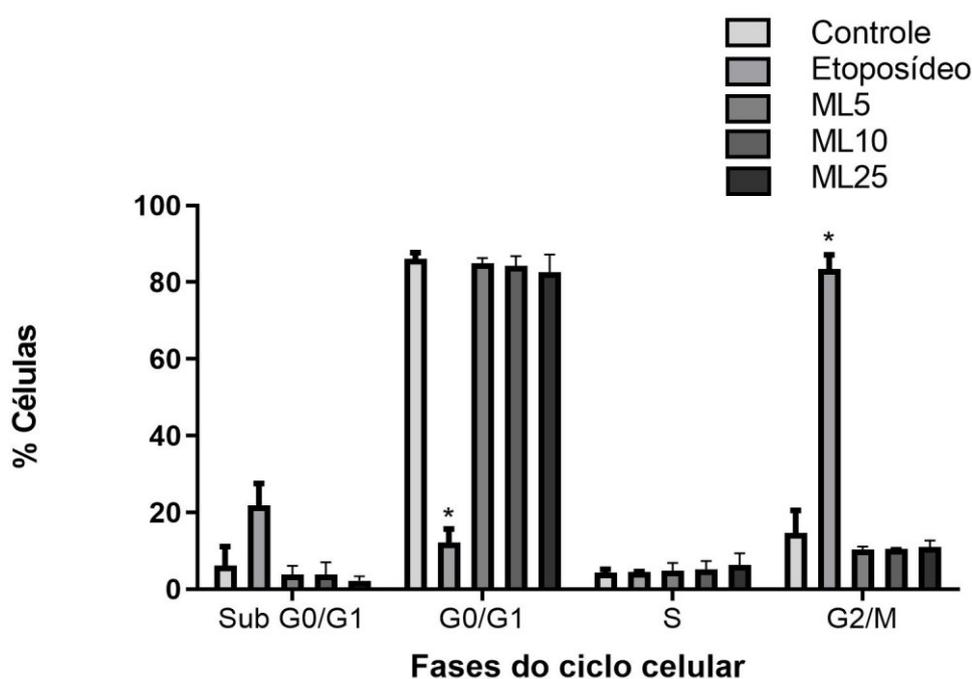


Figura 10. As células A549 ($5,0 \times 10^4$ células/poço) foram incubadas pelo período de 6 dias com diferentes concentrações 5, 10 ou 25 μM de ML385, ou 25 μM de etoposídeo (controle positivo), já o grupo controle representa células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão representadas como G0/G1, S e G2/M. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS CantoTM II e analisadas no software InFinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes, avaliados por ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

Tabela 2. Efeito do ML385 nas diferentes fases do ciclo celular das células A549 (6 dias).

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Sub G0/G1 (%)
Controle	86 ± 1,7	4,35 ± 0,85	14,65 ± 5,85	6,2 ± 4,9

Etoposídeo	12,1 5 ± 3,55	4,45 ± 0,15	83,4 ± 3,7	21,75 ± 5,75
ML5	84,8 5 ± 1,45	4,75 ± 2,15	10,4 ± 0,7	3,85 ± 2,25
ML10	84,2 ± 2,50	5,2 ± 2,20	10,5 ± 0,30	3,91 ± 3,08
ML25	82,5 5 ± 4,65	6,35 ± 3,05	11 ± 1,7	2,18 ± 1,22

Tabela 2. As células A549 ($5,0 \times 10^4$ células/poço) foram incubadas pelo período de 6 dias com diferentes concentrações 5, 10 ou 25 μM de ML385, ou 25 μM de etoposídeo (controle positivo), já o grupo controle representa células sem nenhum tratamento. As fases do ciclo celular estão representadas como G0/G1, S e G2/M. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II e analisadas no software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos®). Os gráficos representam a média \pm EPM de pelo menos dois experimentos independentes, avaliados por ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

4.5 Avaliação do efeito sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO e glutathiona livre (GSH))

Por último, foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio e a de glutathiona livre, ambas estão correlacionadas à via do NRF2/KEAP1, principal alvo do ML385. Após 6 dias de tratamento, as concentrações de 25, 10 e 5 μM de ML385 apresentaram diferença significativa em relação à produção/acúmulo de ERO quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) por meio do ensaio de DCFH (Figura 11 a)). Corroborando os dados de ERO, a figura demonstra a diminuição da quantidade de glutathiona livre nas células em todas as concentrações testadas, com diferença significativa quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Foi utilizado um controle positivo, a butionina sulfoximina (BSO), um conhecido inibidor da enzima glutamato cisteína ligase, codificada pelos genes *GCLC* e *GCLM*, dois genes alvo clássicos de NRF2, e enzima marcapasso da síntese de GSH (Bailey, 1998). O BSO depletou a maior parte da glutathiona livre na célula, quando comparado às células não tratadas ($p < 0,05$) (Figura 11 b)).

Figura 11. Efeito do ML385 sobre a produção de EROs e concentração de GSH

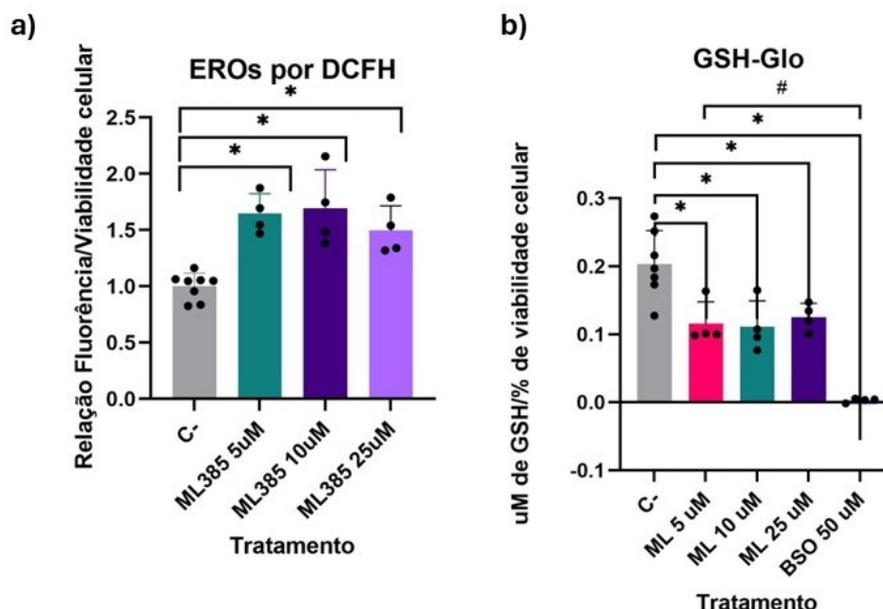


Figura 11. As células A549 (1×10^3 células/poço) foram incubadas concentrações de 5, 10 ou 25 μM de ML385, para ambos os experimentos, enquanto pro controle positivo para avaliação de GSH foi BSO 50 μM . A figura a) é referente à avaliação da produção de EROs pelas células, e todas as concentrações do tratamento experimental foram capazes de aumentar significativamente a produção de EROs quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). A figura b) representa a quantificação de GSH nas células, e todos tratamentos experimentais e o controle positivo foram capazes de diminuir a concentração de GSH nas células, quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). Os gráficos representam a média \pm DP de pelo menos dois experimentos independentes, analisados por ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey. Fonte: Autor, 2024

O ML385 foi capaz de reduzir a quantidade de glutathione livre, de forma não concentração-dependente, corroborando com dados da literatura (Singh *et. al.*, 2016; Delgobo *et. al.*, 2021), da mesma forma que foi capaz de aumentar a produção de ERO. Esses resultados são esperados, de forma que demonstram que a inibição de NRF2 pelo ML385 foi eficaz, diminuindo, portanto, a quantidade de NRF2 intranuclear e a consequente transcrição de proteínas de síntese de glutathione (Abdul-Aziz *et. al.*, 2015) que, por sua vez, diminui a quantidade de GSH e consequentemente aumenta a quantidade de ERO (Huber *et. al.*, 2007). Esse aumento de ERO e diminuição de GSH poderiam estar associados a um nível de estresse celular compatível com a viabilidade, porém suficiente para desacelerar a taxa de proliferação celular sem causar citotoxicidade, o que poderia explicar nossos achados experimentais. Esse nível baixo de desbalanço redox pode ser também explicar o porquê a combinação de ML385 com quimioterápicos citotóxicos, tipicamente causadores de estresse oxidativo, promoveu efeitos quimiosensibilizadores nos modelos *in vitro* e *in vivo* do estudo que caracterizou inicialmente o composto (Singh *et. al.*, 2016). Ainda, temos a

limitação de não termos avaliado o quanto da atividade de NRF2 foi inibida pelo ML385, nas concentrações utilizadas no nosso modelo. Estudos preliminares ainda não publicados do nosso grupo demonstraram que a concentração de 25 uM, por 72 h em células A549, inibiu aproximadamente 60-70% da expressão do mRNA para *TXNRD1*, *GCLM* e *SLC7A11* (genes alvo de NRF2) o que sugere que, a depender do tempo de meia-vida destas proteínas, uma depleção massiva das mesmas não esteja ocorrendo em nosso modelo de 3 a 6 dias de tratamento. Experimentos com exposição mais prolongada com monitoramento da atividade de NRF2 e de algum gene alvo marcador são necessários para inferir a relação entre grau de inibição do alvo farmacológico e efeito antitumoral do ML385, e possivelmente outros inibidores dessa via. O uso de outra linhagem com mutação em KEAP1 também pode ser útil, de modo a comparar os fenótipos e eventualmente caracterizar o impacto que comutações clássicas que ocorrem em tumores KEAP1 mutantes, como *KRAS* e *STK11*, possuem no efeito dos inibidores de NRF2.

5. CONCLUSÃO

O ML385 é um potencial fármaco, ou pelo menos um primeiro protótipo, para o tratamento de tumores com mutação na via de NRF2, principalmente por possuir seletividade e mecanismo de ação bem definidos. Os dados obtidos neste projeto permitem concluir que o efeito antitumoral através da inibição do NRF2 pelo ML385 não está relacionado a indução de morte celular apoptótica, á alterações no ciclo celular, e a indução de autofagia. Esses não parecem ser as respostas celulares secundárias à inibição dessa via, ao passo que um desbalanço redox, como observado na via de GSH e produção de ERO, podem estar associadas a uma menor taxa de proliferação nas células tratadas com ML385. Os dados sugerem que outros mecanismos de morte celular como a ferroptose, tipicamente associada ao desbalanço redox, ou eventos de senescência celular podem ser os responsáveis pela diminuição da densidade de células tumorais observada nos ensaios de SRB e clonogenicidade, além disso, é possível que a inibição isolada de NRF2 com o ML385 gere mecanismos compensatórios, promovendo assim a homeostase dessas células, ou que ainda necessite exposições mais prolongadas para obtenção de efeito citotóxico. Ai inibição do NRF2 pode proporcionar uma diminuição na produção de fatores de crescimento, promovidos pela própria via do NRF2, sendo esse um dos possíveis mecanismos de ação antitumoral (He *et. al.*, 2020). Por outro lado, a

capacidade de causar estresse celular em nível baixo poderia ser explorada em estratégias envolvendo tratamentos combinados com fármacos citotóxicos, o que corrobora com achados na literatura (Singh *et. al.*, 2016; Delgobo *et. al.*, 2021). Em médio prazo, os dados deste estudo ajudam a determinar os mecanismos de resposta celular à inibição de NRF2 pelo ML385, avaliando o potencial farmacológico de inibidores de NRF2, principalmente pela caracterização dos seus efeitos secundários e os possíveis ajustes necessários para o uso de terapia-alvo baseadas na inibição dessa via.

REFERÊNCIAS

A ARLT,; SEBENS, S; KREBS, S; GEISMANN, C; GROSSMANN, M; KRUSE, M-L; SCHREIBER, S; SCHÄFER, H. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. **Oncogene**, [S.L.], v. 32, n. 40, p. 4825-4835, 29 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.493>.

ABDUL-AZIZ, Amina; MACEWAN, David J.; BOWLES, Kristian M.; RUSHWORTH, Stuart A.. Oxidative Stress Responses and NRF2 in Human Leukaemia. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2015, p. 1-7, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/454659>

ARANDA, A.; SEQUEDO, L.; TOLOSA, L.; QUINTAS, G.; BURELLO, E.; CASTELL, J.V.; GOMBAU, L.. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 954-963, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.016>.

BAILEY, Howard H. L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 111-112, p. 239-254, abr. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2797\(97\)00164-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00164-6).

BARRY, Michael A.; REYNOLDS, Jason E.; EASTMAN, Alan.. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. **Cancer research**. [S.L.] v. 53 (10 Suppl.), p 2349-2357.

BERNARDS, René. Finding effective cancer therapies through loss of function genetic screens. **Current Opinion In Genetics & Development**, [S.L.], v. 24, p. 23-29, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.007>.

BOZYK, Aleksandra; WOJAS-KRAWCZYK, Kamila; KRAWCZYK, Paweł; MILANOWSKI, Janusz. Tumor Microenvironment—A Short Review of Cellular and Interaction Diversity. **Biology**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 929, 18 jun. 2022. MDPI AG.

CÂNCER, Instituto Nacional de.. Câncer de Pulmão. **Instituto Nacional de Câncer - INCA**, [S.L.], 18 jul. 2022. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>.

CÂNCER, Instituto Nacional de.. Estatísticas de Câncer. **Instituto Nacional de Câncer - INCA**, [S.L.], 23 jun. 2022. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>.

CHAKRABORTY, Sajib; RAHMAN, Taibur. The difficulties in cancer treatment. **Ecancermedicalsecience**, [S.L.], v. 6, n. 16, p. 1-5, nov. 2012. Ecancer Global Foundation. <http://dx.doi.org/10.3332/ecancer.2012.ed16>.

CHIAN, Song; THAPA, Ruby; CHI, Zhexu; WANG, Xiu Jun; TANG, Xiuwen. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. **Biochemical**

And Biophysical Research Communications, [S.L.], v. 447, n. 4, p. 602-608, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.039>.

CROWLEY, Lisa C.; CHRISTENSEN, Melinda E.; WATERHOUSE, Nigel J.. Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, [S.L.], v. 2016, n. 8, p. 721-724, ago. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot087171>.

DELGOBO, Marina; GONÇALVES, Rosângela Mayer; DELAZERI, Marco Antônio; FALCHETTI, Marcelo; ZANDONÁ, Alessandro; NEVES, Raquel Nascimento das; ALMEIDA, Karoline; FAGUNDES, Adriane Cristina; GELAIN, Daniel Pens; DHUGURU, Jyothi; SKOUTA, Rachid. Role of Indole Scaffolds as Pharmacophores in the Development of Anti-Lung Cancer Agents. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 1615, 1 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25071615>.

DAS, Kumuda C.; WHITE, Carl W.. Redox systems of the cell: possible links and implications. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 99, n. 15, p. 9617-9618, 16 jul. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.162369199>.

DODSON, Matthew; CASTRO-PORTUGUEZ, Raul; ZHANG, Donna D.. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. **Redox Biology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-7, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2019.101107>.

EL-KHATEEB, Mahmoud; APPLETON, Trevor G.; GAHAN, Lawrence R.; CHARLES, Bruce G.; BERNERS-PRICE, Susan J.; BOLTON, Ann-Maree. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [S.L.], v. 77, n. 1-2, p. 13-21, out. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134\(99\)00146-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134(99)00146-4).

ENKINS, Tabitha; GOUGE, Jerome. Nrf2 in Cancer, Detoxifying Enzymes and Cell Death Programs. **Antioxidants**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1-20, 25 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10071030>.

FRACASSO, João Isidro. Thioredoxin reductase-1 levels are associated with NRF2 pathway activation and tumor recurrence in non-small cell lung cancer. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 177, n. 1, p. 58-71, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.020>.

FRANKEN, Nicolaas A P; RODERMOND, Hans M; STAP, Jan; HAVEMAN, Jaap; VAN BREE, Chris. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 5, p. 2315-2319, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

GAINOR, Justin F.; DARDAEI, Leila; YODA, Satoshi; FRIBOULET, Luc; LESHCHINER, Ignaty; KATAYAMA, Ryohei; DAGOGO-JACK, Ibiayi; GADGEEL, Shirish; SCHULTZ, Katherine; SINGH, Manrose. Molecular Mechanisms of Resistance

to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1118-1133, 1 out. 2016. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0596>.

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

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>

HAYES, John D.; MCMAHON, Michael. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 176-188, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2008.12.008>.

HE, Feng; ANTONUCCI, Laura; YAMACHIKA, Shinichiro; ZHANG, Zechuan; TANIGUCHI, Koji; UMEMURA, Atsushi; HATZIVASSILIOU, Georgia; ROOSE-GIRMA, Merone; REINA-CAMPOS, Miguel; DURAN, Angeles. NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 1182-1195, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2020.01.023>.

HOLDENRIEDER, S.; STIEBER, P.. Apoptotic markers in cancer. **Clinical Biochemistry**, [S.L.], v. 37, n. 7, p. 605-617, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.003>.

HOMMA, Shinsuke; ISHII, Yukio; MORISHIMA, Yuko; YAMADORI, Tadahiro; MATSUNO, Yosuke; HARAGUCHI, Norihiro; KIKUCHI, Norihiro; SATOH, Hiroaki; SAKAMOTO, Tohru; HIZAWA, Nobuyuki. Nrf2 Enhances Cell Proliferation and Resistance to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 15, n. 10, p. 3423-3432, 15 maio 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2822>.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000500046>.

INSTITUTE, National Cancer. The Genetics of Cancer. National Cancer Institute, 17 ago. 2022. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics#:~:text=Genetic%20changes%20that%20cause%20cancer,way%20cells%20grow%20and%20multiply>.

INSTITUTE, National Cancer. What's cancer?. National Cancer Institute, 11 out. 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition>.

ISRAELS, E.D.; ISRAELS, L.G.. The Cell Cycle. **The Oncologist**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 510-513, 1 dez. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>.

JAMIL, Sarwat; LAM, Irene; MAJD, Maryam; TSAI, Shu-Huei; DURONIO, Vincent. Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53. **Cancer Cell International**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-11, 7 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12935-015-0231-z>.

JINGWEN, Bai; YAOCHEN, Li; GUOJUN, Zhang. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 348-362, 2017. China Anti-cancer Association. <http://dx.doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0033>.

KAPUY, Orsolya; PAPP, Diána; VELLAI, Tibor; BÁNHEGYI, Gábor; KORCSMÁROS, Tamás. Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. **Antioxidants**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 1-17, 5 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox7030039>.

KUMARI, Ruchi; JAT, Parmjit. Mechanisms of Cellular Senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 9, p. 1-24, 29 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>.

LI, Jinghan; SHI, Daiwang; LI, Siyi; SHI, Xiang; LIU, Yu; ZHANG, Yi; WANG, Gebang; ZHANG, Chenlei; XIA, Tian; PIAO, Hai-Long. KEAP1 promotes anti-tumor immunity by inhibiting PD-L1 expression in NSCLC. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 1-14, 27 fev. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-024-06563-3>.

LI, Yongsheng; ZHANG, Yunpeng; LI, Xia; YI, Song; XU, Juan. Gain-of-Function Mutations: an emerging advantage for cancer biology. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 659-674, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2019.03.009>.

LIN, Renyu; ZHANG, Ziheng; CHEN, Lingfeng; ZHOU, Yunfang; ZOU, Peng; FENG, Chen; WANG, Li; LIANG, Guang. Dihydroartemisinin (DHA) induces ferroptosis and causes cell cycle arrest in head and neck carcinoma cells. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 381, n. 1, p. 165-175, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.033>.

LIN, Zhi Xiu; HOULT, J.R.S; RAMAN, Amala. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 141-150, ago. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00199-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00199-8).

LOEB, Lawrence A. *et al.* Errors in DNA Replication as a Basis of Malignant Changes. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 34, n. 1, p. 2311-2321, set. 1974.

MATHEW, Robin; KARANTZA-WADSWORTH, Vassiliki; WHITE, Eileen. Role of autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 961-967, dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2254>.

MIZUSHIMA, Noboru; YOSHIMORI, Tamotsu. How to Interpret LC3 Immunoblotting. **Autophagy**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 542-545, 26 nov. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.4600>.

MONTECUCCO, Alessandra; ZANETTA, Francesca; BIAMONTI, Giuseppe. Molecular mechanisms of etoposide. **Excli Journal**; **14**: Doc95; ISSN 1611-2156, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 95-108, jan. 2015. IfADo - Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors. <http://dx.doi.org/10.17179/EXCLI2014-561>.

MURAKAMI, Shohei; MOTOHASHI, Hozumi. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 88, n. 2, p. 168-178, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030>.

MURAKAMI, Shohei; MOTOHASHI, Hozumi. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 88, p. 168-178, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030>.

NGUYEN, Truyen; NIOI, Paul; PICKETT, Cecil B.. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 284, n. 20, p. 13291-13295, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r900010200>.

NIE, Qing; HU, Yue; YU, Xiao; LI, Xiao; FANG, Xuedong. Induction and application of ferroptosis in cancer therapy. **Cancer Cell International**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-19, 7 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12935-021-02366-0>.

NITURE, Suryakant K.; JAISWAL, Anil K.. Nrf2 Protein Up-regulates Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Prevents Cellular Apoptosis. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 287, n. 13, p. 9873-9886, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.312694>.

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

ORELLANA, Esteban; KASINSKI, Andrea. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. **Bio-Protocol**, [S.L.], v. 6, n. 21, p. 1-9, nov. 2016. Bio-Protocol, LLC. <http://dx.doi.org/10.21769/bioprotoc.1984>.

ORGANIZATION, World Health.. Cancer. **World Health Organization (WHO)**, [S.L.], 3 fev. 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

PANIERI, Emiliano; SASO, Luciano. Potential Applications of NRF2 Inhibitors in Cancer Therapy. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2019, p. 1-34, 11 abr. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/8592348>.

PAPAZISIS, K.T; GEROMICHALOS, G.D; DIMITRIADIS, K.A; KORTSARIS, A.H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 208, n. 2, p. 151-158, out. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00137-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00137-3).

PIZZINO, Gabriele; IRRERA, Natasha; CUCINOTTA, Mariapaola; PALLIO, Giovanni; MANNINO, Federica; ARCORACI, Vincenzo; SQUADRITO, Francesco; ALTAVILLA, Domenica; BITTO, Alessandra. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8416763>.

PORTER, Alan G; JÄNICKE, Reiner u. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 99-104, 28 jan. 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 301-11, 2004.

RAGUZ, S; YAGÜE, E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 387-391, 29 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604510>.

ROH, Jong-Lyel; KIM, Eun Hye; JANG, Hyejin; SHIN, Daiha. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. **Redox Biology**, [S.L.], v. 11, p. 254-262, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.010>.

SAHA, Sarmistha; BUTTARI, Brigitta; PANIERI, Emiliano; PROFUMO, Elisabetta; SASO, Luciano. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 22, p. 1-31, 23 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25225474>.

SÁNCHEZ-ORTEGA, Miriam; CARRERA, Ana Clara; GARRIDO, Antonio. Role of NRF2 in Lung Cancer. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1-28, 24 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10081879>.

SHARMA, Prabodh Chander; BANSAL, Kushal Kumar; SHARMA, Archana; SHARMA, Diksha; DEEP, Aakash. Thiazole-containing compounds as therapeutic targets for cancer therapy. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 188, p. 112016, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112016>.

SHIBATA, Tatsuhiro; KOKUBU, Akiko; GOTOH, Masahiro; OJIMA, Hidenori; OHTA, Tsutomu; YAMAMOTO, Masayuki; HIROHASHI, Setsuo. Genetic Alteration of Keap1 Confers Constitutive Nrf2 Activation and Resistance to Chemotherapy in

Gallbladder Cancer. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 135, n. 4, p. 1358-1368, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.082>.

SIES, Helmut. Oxidative Stress: concept and some practical aspects. **Antioxidants**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1-6, 10 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9090852>

SINGH, Anju; VENKANNAGARI, Sreedhar; OH, Kyu H.; ZHANG, Ya-Qin; ROHDE, Jason M.; LIU, Li; NIMMAGADDA, Sridhar; SUDINI, Kuladeep; BRIMACOMBE, Kyle R.; GAJGHATE, Sachin. Small Molecule Inhibitor of NRF2 Selectively Intervenes Therapeutic Resistance in KEAP1-Deficient NSCLC Tumors. **Acs Chemical Biology**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 3214-3225, 17 out. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.6b00651>.

SKOULIDIS, Ferdinandos; LI, Bob T.; DY, Grace K.; PRICE, Timothy J.; FALCHOOK, Gerald S.; WOLF, Jürgen; ITALIANO, Antoine; SCHULER, Martin; BORGHAEI, Hossein; BARLESI, Fabrice. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 384, n. 25, p. 2371-2381, 24 jun. 2021. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2103695>.

SOLIS, Luisa M.; BEHRENS, Carmen; DONG, Wenli; SURAOKAR, Milind; OZBURN, Natalie C.; MORAN, Cesar A.; CORVALAN, Alejandro H.; BISWAL, Shyam; SWISHER, Stephen G.; BEKELE, B. Nebiyou. Nrf2 and Keap1 Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Association with Clinicopathologic Features. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 16, n. 14, p. 3743-3753, 14 jul. 2010. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-3352>

STĘPKOWSKI, Tomasz M.; KRUSZEWSKI, Marcin K.. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 50, n. 9, p. 1186-1195, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.033>.

SU, Minfei; MEI, Yang; SINHA, Sangita. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. **Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 2013, p. 1-14, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/102735>.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

TANAKA, Ichidai; MORISE, Masahiro. Current Immunotherapeutic Strategies Targeting the PD-1/PD-L1 Axis in Non-Small Cell Lung Cancer with Oncogenic Driver Mutations. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-15, 27 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010245>.

TANG, Xiuwen; WANG, Hongyan; FAN, Longfang; WU, Xiaoyuan; XIN, Ai; REN, Huanyu; WANG, Xiu Jun. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 50, n. 11, p. 1599-1609, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.008>

TANIDA, Isei. Autophagy basics. **Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 1-11, 22 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x>.

VICHAJ, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 1112-1116, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.

WAARTS, Michael R.; STONESTROM, Aaron J.; PARK, Young C.; LEVINE, Ross L.. Targeting mutations in cancer. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 132, n. 8, p. 1-11, 15 abr. 2022. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci154943>.

WANG, Yan-Yang; CHEN, Juan; LIU, Xiao-Ming; ZHAO, Ren; ZHE, Hong. Nrf2-Mediated Metabolic Reprogramming in Cancer. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2018, n. 1, p. 1-7, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9304091>.

WIMAN, K. G.; ZHIVOTOVSKY, B.. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 281, n. 5, p. 483-495, 4 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12609>.

YAN, Ge; ELBADAWI, Mohamed; EFFERTH, Thomas. Multiple cell death modalities and their key features (Review). **World Academy Of Sciences Journal**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 39-48, 11 mar. 2020. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/wasj.2020.40>.

YU, Lina; ZHU, Guanxiong; ZHANG, Zeyu; YU, Yang; ZENG, Liting; XU, Zidan; WENG, Jinlong; XIA, Junyi; LI, Jiang; PATHAK, Janak L.. Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. **Journal Of Nanobiotechnology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-26, 12 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-023-01969-1>.

YUAN, Huan; XU, Yan; LUO, Yi; WANG, Nuo-Xin; XIAO, Jian-Hui. Role of Nrf2 in cell senescence regulation. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 476, n. 1, p. 247-259, 11 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-020-03901-9>.

ZHANG, Cheng-Cheng; LI, Chen-Guang; WANG, Yao-Feng; XU, Li-Hui; HE, Xian-Hui; ZENG, Qiong-Zhen; ZENG, Chen-Ying; MAI, Feng-Yi; HU, Bo; OUYANG, Dong-Yun. Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis

in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation. **Apoptosis**, [S.L.], v. 24, n. 3-4, p. 312-325, 1 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-019-01515-1>.