



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA - TRABALHO FINAL

RUI MIGUEL FERREIRA GOMES

***Avaliação do potencial terapêutico de moduladores do NRF2  
em doentes com Leucemia Linfocítica Crónica***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA EM HEMATOLOGIA

Trabalho realizado sob orientação:  
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO  
MESTRE JOSÉ PEDRO CARDA

ABRIL/2021



# **Avaliação do potencial terapêutico de moduladores do NRF2 em doentes com Leucemia Linfocítica Crónica**

Rui Gomes<sup>a</sup>, Raquel Alves<sup>b</sup>, Joana Jorge<sup>b</sup>, Bárbara Marques<sup>b</sup>, Ana Cristina Gonçalves<sup>b</sup>, José Pedro Carda<sup>b, c</sup>, Ana Bela Sarmiento-Ribeiro<sup>b, c</sup>

- a. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC), Portugal;
- b. Laboratório de Oncobiologia e Hematologia (LOH), Clínica Universitária de Hematologia e Biologia Molecular Aplicada, FMUC, Coimbra, Portugal;
- c. Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário De Coimbra, Coimbra, Portugal;

Autor correspondente:

Ana Bela Sarmiento-Ribeiro  
absarmiento@fmed.uc.pt

## RESUMO

A leucemia linfocítica crónica (LLC) caracteriza-se pela proliferação e acumulação de linfócitos B monoclonais, sendo a leucemia com maior prevalência nos países ocidentais. O stresse oxidativo desempenha um papel fundamental na ativação de vias inflamatórias que levam à transformação de uma célula normal numa célula tumoral facilitando a sobrevivência, proliferação e resistência à terapêutica. Nessa linha, o NRF2 surge como o principal regulador do stresse oxidativo, tendo-se verificado que os seus níveis se encontram aumentados em células de LLC. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois moduladores do NRF2, Brusatol e ML385, em linfócitos de sangue periférico de doentes de LLC. Foram isoladas, por gradiente de ficol, células mononucleares de 13 doentes com LLC. As células foram incubadas com Brusatol (5, 10, 25, 50 e 100 nMol) e ML385 (5, 10, 25, 50 e 100 µMol) e o efeito citotóxico dos fármacos foi avaliado por *Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay* (FMCA) às 24h e 48h. Avaliamos a morte celular por apoptose através de citometria de fluxo após 24h de incubação com 100nM de Brusatol e 100µM de ML385, recorrendo à anexina V. Realizamos a análise dos resultados para o total da população (n=13) e por grupos de estágio de risco, inicial (n=8) – Binet A e B e avançado (n=5) – Binet C. O ensaio FMCA revelou um efeito citotóxico superior do Brusatol comparativamente ao ML385. O efeito do Brusatol na diminuição da taxa de sobrevivência das células é essencialmente dependente da dose e estágio da doença, tendo-se observado uma diminuição mais acentuada da sobrevivência em doentes em estágio avançado. Apesar de o ML385 não ter demonstrado um efeito significativo na diminuição da sobrevivência celular, este é mais acentuado às 48h nos doentes de estágio avançado. Por citometria de fluxo verificou-se que os compostos induziram morte celular por apoptose, sendo o efeito do Brusatol mais evidente. Nas células tratadas com Brusatol observou-se um aumento de 68,14% de linfócitos B neoplásicos em apoptose, e de 34,19% na presença de ML385, não se verificando toxicidade significativa nos linfócitos B e T normais, comparativamente ao controlo. Os nossos resultados revelaram que o Brusatol induz a morte celular em células de LLC, com baixa citotoxicidade para as células normais, evidenciando o seu possível potencial terapêutico, sobretudo em doentes em estágio avançado. Este estudo realçou ainda o possível envolvimento do NRF2 no desenvolvimento e progressão da doença de LLC, tal como sugerido em estudos anteriores.

**PALAVRAS-CHAVE:** “LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA”, “KEAP1-NRF2”, “CULTURAS PRIMÁRIAS”, “STRESSE OXIDATIVO”, “NOVAS TERAPÊUTICAS”

## **ABSTRACT**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the proliferation and accumulation of monoclonal B lymphocytes, being the most prevalent leukemia in western countries. Oxidative stress plays a fundamental role in the activation of inflammatory pathways that lead to the transformation of a normal cell into a tumor cell, helping the survival, proliferation and resistance to the treatment. Thus, NRF2 emerge as the master regulator of oxidative stress, having already been verified that its levels are increased in LLC cells. The aim of this study was to evaluate de effect of two NRF2 modulators, Brusatol and ML385, on peripheral blood lymphocytes from CLL patients. Mononuclear cells from 13 patients with CLL were isolated by ficol gradient. Cells were incubated with Brusatol (5, 10, 25, 50 e 100 nMol) or ML385 (5, 10, 25, 50 e 100 µMol) and the cytotoxic effect of the drugs was evaluated by Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA) at 24h and 48h. We evaluated the cell death by apoptosis by flow cytometry after 24h of incubation with 100nM Brusatol and 100µM ML385, using annexin V. The analysis of the results was carried out for the total of the samples (n=13) and for groups of stage, initial (n=8) - Binet A and B, and advanced (n=5) - Binet C. The FMCA assay revealed a higher cytotoxic effect of Brusatol compared to ML385. The effect of Brusatol in decreasing the survival rate of cells is essentially dependent on the dose and stage of the disease, with a more pronounced decrease in survival in patients in advanced stage. Despite the fact that in cells incubated with ML385, no significant effect was observed in decreasing cell survival, this is more pronounced at 48h in advanced stage patients. By flow cytometry it was found that the compounds induced cell death by apoptosis, being the effect of Brusatol more evident. In cells treated with Brusatol, there was an increase of 68.14% of neoplastic B lymphocytes in apoptosis, and of 34.19% in the presence of ML385, with no significant toxicity in normal B and T lymphocytes, compared to the control. Our results revealed that Brusatol induces cell death in CLL cells, with low cytotoxicity for normal cells, showing its possible therapeutic potential, especially in patients at advanced stage. Thus, this study highlighted the possible involvement of NRF2 in the development and progression of LLC disease, as suggested in previous studies.

**KEYWORDS:** "CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA", "KEAP1-NRF2", "PRIMARY CULTURES", "OXIDATIVE STRESS", "NEW THERAPIES"

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma patologia maligna indolente caracterizada pela proliferação e acumulação de linfócitos B monoclonais maduros no sangue, na medula óssea e nos gânglios linfáticos.[1-4] A imunofenotipagem clássica destas células evidencia uma expressão elevada dos marcadores de superfície CD5, CD19 e CD23 e baixa expressão de CD20. [5] A LLC é a leucemia com maior prevalência nos países ocidentais.[1-4] De acordo com a Sociedade Europeia de Oncologia Médica, esta patologia apresenta uma incidência de 4,2 casos por 100.000 habitantes anualmente, valor este que tende a aumentar com a idade.[1] A idade ao diagnóstico é, em média, de 72 anos, sendo mais prevalente no sexo masculino. Embora a maioria dos casos sejam esporádicos, sabe-se que uma história familiar de LLC positiva representa um aumento do risco de seis a nove vezes, evidenciando uma componente hereditária. [1, 6]

A etiologia subjacente à gênese da LLC permanece desconhecida, no entanto, diversos estudos apontam para a preponderância dos fatores genéticos em detrimento dos fatores ambientais.[3, 6-8]

Atualmente, a suspeita de um doente com LLC surge principalmente após sucessivos controlos analíticos onde se observa uma linfocitose persistente e monoclonal.[3, 4] Apenas uma minoria dos doentes, cerca de 5 a 10%, apresenta sintomatologia como sintomas B (perda de peso involuntária  $\geq 10\%$  nos últimos 6 meses, febre superior a  $38^{\circ}\text{C}$  e suores noturnos), fadiga, infecções de repetição, entre outros.[3] Ao exame físico é possível objetivar, em cerca de 50 a 90%, a presença de adenopatias principalmente nas regiões, cervical, axilar e supraclavicular.[3]

O diagnóstico é estabelecido pela contagem de linfócitos B monoclonais, com o imunofenótipo característico de LLC, superior a  $5 \times 10^9$  por litro no sangue periférico durante pelo menos três meses.[1, 2, 9] Atualmente, dois sistemas de estadiamento clínico são amplamente aceites para a LLC, os sistemas de Binet e Rai.[1-3, 9] Estas ferramentas utilizam critérios clínico-analíticos e são importantes para estratificação do risco e prognóstico dos doentes, como podemos ver na Tabela 1.[1-3] O estadiamento de Rai, criado em 1975, foi posteriormente modificado passando a apresentar três grupos de risco e tem em consideração a presença de adenomegalias, hepatoesplenomegália e os valores de plaquetas e hemoglobina.[1-3] Já o sistema de estadiamento de Binet, que surgiu em 1981, é baseado na avaliação de cinco regiões de tecidos linfoides (gânglios cervicais, axilares, inguinal, baço e fígado) potencialmente envolvidos e na existência de anemia ou trombocitopenia.[1-3]

**Tabela 1-** Sistemas de estadiamento para LLC e correspondentes grupos de prognóstico. (adaptado de Eichhorst *et al*). [1]

Rai		Binet		Prognóstico
<b>0</b>	Linfocitose > 5 x 10 <sup>9</sup> /l	<b>A</b>	Hb ≥ 100 g/l Plaquetas ≥ 100 x 10 <sup>9</sup> /l < 3 regiões linfoides envolvidas <sup>a</sup>	Baixo risco
<b>I</b>	Linfocitose e linfadenopatia	<b>B</b>	Hb ≥ 100 g/l Plaquetas ≥ 100 x 10 <sup>9</sup> /l ≥ 3 regiões linfoides envolvidas <sup>a</sup>	Risco intermédio
<b>II</b>	Linfocitose e hepatomegalia e/ou esplenomegália com ou sem linfadenopatia			
<b>III</b>	Linfocitose e Hb < 110g/l (6,83 mmol/l) com ou sem linfadenopatia/organomegalia	<b>C</b>	Hb < 100 g/l Plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /l	Risco elevado
<b>IV</b>	Linfocitose e plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /l com ou sem linfadenopatia/organomegalia			

Hb – hemoglobina

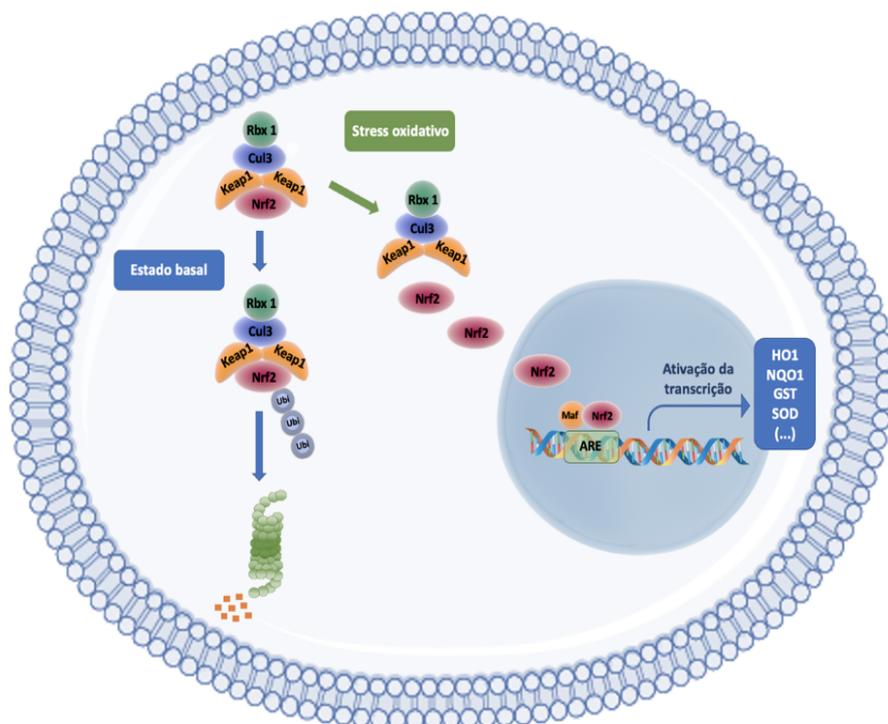
<sup>a</sup> O sistema de Binet tem em conta 5 regiões potencialmente envolvidas: cervical, axilar, linfadenopatia inguinal (uni- ou bilateral), baço e figado

Os mecanismos patológicos subjacentes à LLC ainda não foram totalmente esclarecidos, mas sabe-se que o stresse oxidativo (SO) pode ter um papel crucial no desenvolvimento desta neoplasia.[10, 11] Em 1985, Halliwell *et al* evidenciava o papel do SO no envelhecimento e no desenvolvimento de diversas patologias como o cancro. [12] O SO resulta do desequilíbrio entre a produção e acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células e a capacidade antioxidante da célula.[12-14] Os efeitos deletérios do excesso de ROS encontram-se bem documentados, tais como lesões em várias estruturas celulares, como lipídios, proteínas e ácido nucleicos.[13-15] Além disso, interferem em diversas cascatas de sinalização celulares como por exemplo de proliferação e apoptose e na resposta imunológica.[10, 13, 15] Atualmente, é cientificamente unanime que o SO é um dos estímulos responsáveis pelo desenvolvimento de diversas patologias neoplásicas, contudo ainda não é claro se desempenha um papel de fator causal ou apenas um efeito colateral.[10, 13, 15, 16] Relativamente aos doentes de LLC, verificou-se que as células B destes doentes apresentam níveis aumentados de ROS quando comparadas com linfócitos de indivíduos saudáveis.[10,

11, 15] O conhecimento sobre o metabolismo e o impacto do SO nas células de LLC tem vindo ganhar maior relevo, uma vez que tem sido um dos principais alvos de estudo nesta área. O estudo de Jitschin *et al*, demonstrou que algumas vias associadas ao metabolismo mitocondrial são causas de produção de ROS em LLC. [10] Neste estudo, foi também demonstrado que estas células apresentam uma maior expressão da enzima *heme oxigenase 1* (HO 1), uma importante defesa antioxidante celular.[10] Outra linha de investigação, evidenciou que modificações genéticas do gene *p53* podem contribuir para o aumento da produção de ROS nesta neoplasia, o que pode contribuir para uma melhor compreensão do mau prognóstico e da resistência à terapêutica nos doentes que apresentam mutação deste gene.[17]

Um dos principais reguladores do estado redox celular é o *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2) sendo, por isso, considerado como um dos principais responsáveis pela resposta protetora ao SO.[18-20] Este é um fator de transcrição, codificado pelo gene *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (*NFE2L2*), que regula a expressão de mais de 200 genes, incluindo genes que codificam enzimas antioxidantes e do metabolismo de fase II. [18-22] A expressão destes genes depende da ligação do NRF2 a uma sequência do ácido desoxirribonucleico (ADN) designada *antioxidant response elements* (ARE).[18, 20, 22]

Nesta via de sinalização, a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) apresenta um papel preponderante na regulação da proteína NRF2 (Fig. 1). Em condições basais, o NRF 2 encontra-se no citoplasma ligado à KEAP 1, que promove a sua degradação pela via da ubiquitina-proteasoma.[18, 20, 22] A KEAP 1 permite a ligação da *Cullin-based E3 ubiquitin ligase*, que por sua vez sinaliza o NRF2, através de poliubiquitinação, para proteólise. Os estímulos oxidativos ou eletrofílicos levam à dissociação da ligação NRF2/KEAP1, por modificações nos resíduos de cisteína desta última, prevenindo assim a sua degradação.[18, 20, 22] Dessa forma, a NRF2 pode migrar para o núcleo, onde vai dimerizar-se com a proteína *musculoaponeurotic fibrossarcoma* (MAF) ativando a expressão dos genes que contêm o domínio ARE.[20, 22] O estudo desta via sinalização nas células de LLC ainda é bastante reduzido. No entanto, foi já observado que o NRF2 se encontra constitucionalmente ativado em neoplasias hematológicas, incluindo em LLC.[21] Para além disso, foram observados níveis mais elevados de expressão de NRF2 em células LLC não tratadas, quando comparadas com linfócitos normais.[18] Mais recentemente, Sanchez-Lopez *et al* demonstraram a importância do NRF2 na via de sinalização do NF- $\kappa$ B-p62 que permite a sobrevivência e resistência à terapêutica das células de LLC com elevada expressão à superfície de ROR1 (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1*). [23]



**Figura 1-** Visão geral da via de sinalização NRF2-KEAP1-ARE. Em condições basais, o NRF2 é sequestrado no citosol pela KEAP1, que conduz à sua ubiquitinação seguida pela degradação pelo proteossoma. Perante uma situação de SO, o NRF2 dissocia-se do KEAP1 e migra para o núcleo, onde se dimeriza com a pequena proteína MAF e se liga às regiões ARE do DNA ativando assim a expressão de um conjunto de enzimas e outras proteínas antioxidantes, iniciando assim uma resposta protetora. (NQO1- NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, GST- Glutathione S-transferase, SOD- Superoxide dismutases).

Posto isto, o papel do NRF2 na carcinogênese continua incerto, uma vez que, embora por um lado tenha uma função protetora contra a lesão oxidativa em tecidos normais, nas células neoplásicas aparenta ter um papel que lhes atribui vantagem na sobrevivência e proliferação bem como uma possível resistência ao tratamento antineoplásico.[24-27] Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos e efeitos da via KEAP1-NRF2-ARE pode possibilitar a descoberta de novos alvos terapêuticos no combate à sobrevivência das células malignas e resistência ao tratamento.

Desta forma, este trabalho tem o intuito de investigar o potencial terapêutico de moduladores da NRF2 (ML385 e Brusatol) em culturas primárias de células mononucleares (linfócitos) obtidas a partir de amostras de sangue periférico de doentes de LLC.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População de estudo

Neste estudo foram incluídos 13 doentes diagnosticados com LLC do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de acordo com os critérios adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [28]. Todos os doentes forneceram consentimento informado de acordo com os regulamentos da Declaração de Helsínquia e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (CE-009/2018). As características do grupo amostral encontram-se resumidas na tabela 2. Os doentes incluídos no estudo apresentaram uma mediana de idade ao diagnóstico de 69 anos (57- 84).

**Tabela 2-** Características dos doentes envolvidos no estudo no momento da recolha das amostras de sangue periférico.

Doentes (n=13)			n (%)
Género	Homens		10 (76.9%)
	Mulheres		3 (23.1%)
Estádio	Binet A	Estádio	7 (53.8%)
	Binet B	Inicial	1 (7.7%)
	Binet C	Estádio Avançado	5 (38,5%)
Sobrevivência *	Vivo		12 (92.3%)
	Morto		1 (7.7%)

\*ao dia 23/03/2021

### Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). De forma a obter os linfócitos B neoplásicos para análise, as células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de densidade usando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB), de acordo com as instruções do fabricante. Após o isolamento, parte das células foram colocadas em cultura com meio RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução antibiótico e antimicótico (AB/AM) e mantidas a 37°C, em atmosfera húmida, com 5% de CO<sub>2</sub>. As restantes

células mononucleares foram criopreservadas em meio RPMI-1640 suplementado com 20% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a -80°C.

### **Incubação das células mononucleares do sangue periférico com inibidores do NRF2**

As PBMCs foram incubadas na ausência e na presença de dois inibidores do NRF2, o ML385 e o Brusatol, a uma densidade inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL em placas de 48 poços. As concentrações de ML385 avaliadas foram de 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e para o Brusatol foram utilizadas as concentrações de 5 nM, 10 nM, 25 nM e 100 nM. A citotoxicidade destes compostos foi avaliada a cada 24h durante 48h pelo *Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay* (FMCA), que se baseia na fluorescência gerada por células com membrana plasmática intacta. Para este teste colocaram-se 500 $\mu$ l de PBS num *eppendorf* para cada condição e adicionaram-se 500 $\mu$ l de suspensão celular a cada poço. Realizou-se uma centrifugação de 5 minutos a 200xg e em seguida descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 300 $\mu$ l de diacetado de fluoresceína (do inglês FDA) e transferiu-se para uma placa de 96 poços, fazendo duplicado de cada condição. A placa foi colocada na incubadora, a 37°C durante 40 minutos. Após os 40 minutos a densidade ótica foi lida a 485 nm e 520 nm usando um leitor de placas de múltiplos poços (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader - BioTek Instruments). A sobrevivência celular em cada condição é calculada como o índice de sobrevivência (IS), definido como:

$$IS = \frac{f_{condição} - f_{branco}}{f_{controlo} - f_{branco}}$$

onde  $f_{condição}$  corresponde ao sinal de fluorescência do poço de cada condição (média),  $f_{branco}$  corresponde ao sinal de fluorescência do poço dos brancos (média) e  $f_{controlo}$  corresponde ao sinal de fluorescência dos poços de controle (média).

### **Avaliação da morte celular por citometria de fluxo**

Para avaliar a morte celular recorreu-se à citometria de fluxo através da marcação das células com anexina V ligada à sonda fluorescente FITC. Para o efeito, as PBMCs previamente congeladas foram descongeladas e colocadas em cultura nas mesmas condições anteriormente descritas durante 24 horas para recuperação. Posteriormente foram colocadas em cultura à densidade de inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL e incubadas na ausência (controlo) e na presença de 100  $\mu$ M de ML385 e de 100 nM de Brusatol. Após 24h horas de incubação com os fármacos em estudos as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD5-PerCP, anti-CD19-APC e com anexina V-FITC. Para tal, foram recolhidas  $1 \times 10^6$  células de cada condição e procedeu-se à sua lavagem com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 1500xg. Após decantação, ressuspendeu-se as células em 100  $\mu$ L de PBS e

incubou-se com 5  $\mu$ L de anticorpo anti-CD5-PerCP e anti-CD19-APC durante 15 minutos abrigado da luz. No final do período de incubação procedeu-se a uma nova lavagem com PBS e posteriormente as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação e incubou-se com 5 $\mu$ l de Anexina V-FITC, durante 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim adicionaram-se 300 $\mu$ l de tampão de ligação. De seguidas, as células foram analisadas por citometria de fluxo num FACS Calibur, tendo sido adquiridos 50 000 eventos. Os resultados foram obtidos através do software CellQuest (Becton Dickinson) e analisados com o software Paint-a-Gate, sendo expressos em percentagem de células positivas para cada marcação.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.00 Windows (GraphPad Software,USA). Os valores do FMCA foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média enquanto que os resultados da citometria de fluxo foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A distribuição normal das variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste one-way ANOVA e sempre que necessário, foram aplicados testes de Dunnett para comparações múltiplas com a condição controlo. Os dados que não cumpriam os pressupostos de normalidade foram analisados pelo teste Kruskal–Wallis e pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. O IC<sub>50</sub> foi determinado utilizando o método de regressão não linear através da realização de curva fit dose-resposta. Em todos os testes realizados considerou-se um nível de significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

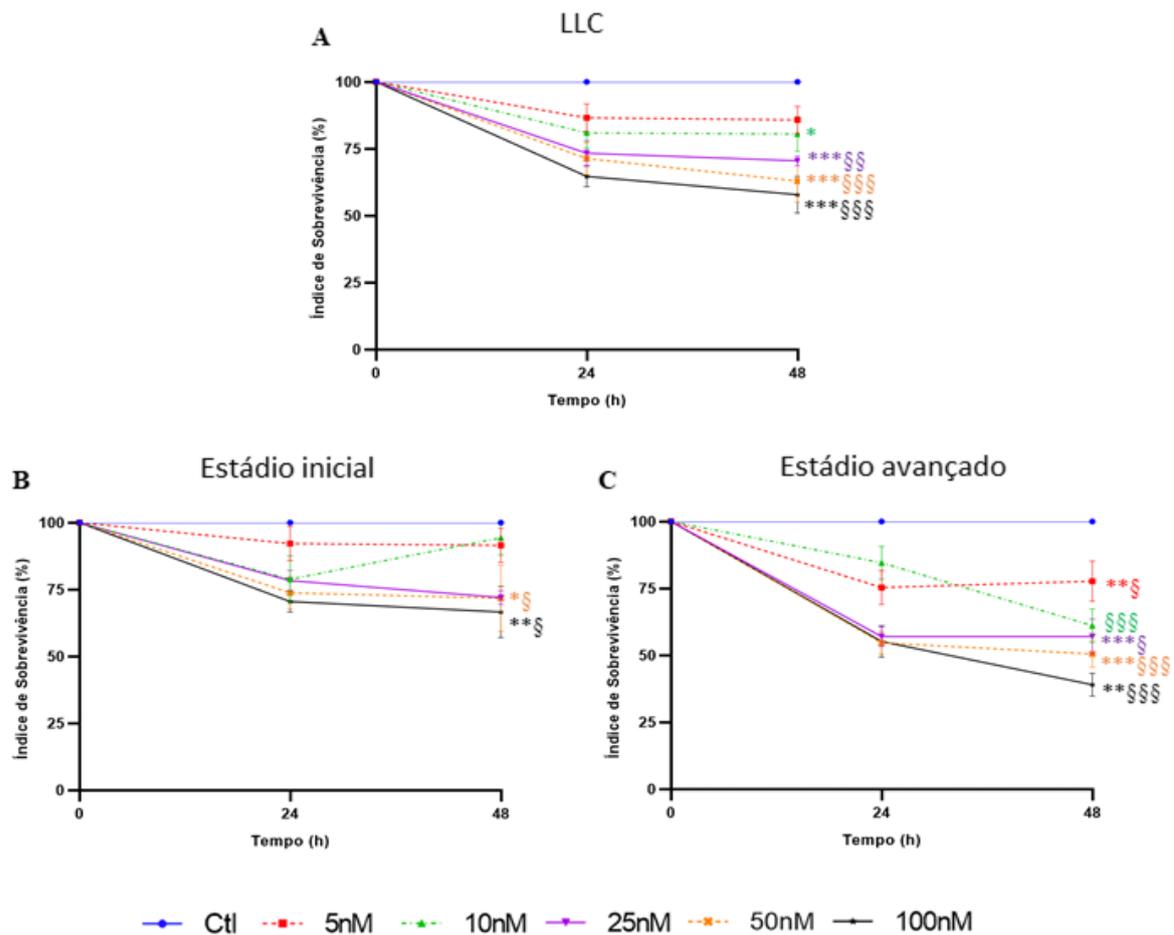
### **Avaliação do efeito do Brusatol e ML385 na viabilidade celular das PBMCs de doentes com LLC**

O ensaio FMCA revelou um maior efeito do composto Brusatol quando comparado com o ML385 na viabilidade das células (Fig. 2 e 3). Verificou-se que quando incubadas com o Brusatol a taxa de sobrevivência das células diminuiu de forma dependente da concentração e do estágio da doença (Fig. 2), sendo as células dos doentes em estágio avançado as que evidenciaram maior sensibilidade ao fármaco (Fig. 2C). Assim, quando analisamos a média de todos os doentes, a taxa de sobrevivência das células diminuiu nas primeiras 24 horas com o aumento da concentração do composto tendo-se verificado uma diminuição para 80,98% ( $\pm 5,84\%$ ), 73,41% ( $\pm 4,73\%$ ), 71,39% ( $\pm 6,02\%$ ) e 64,68% ( $\pm 3,84\%$ ), após incubação com 10nM, 25nM, 50nM e 100nM, respetivamente (Fig. 2A), sendo as diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ , e  $p < 0,001$  Fig. 2A). Ao fim de 48 horas não

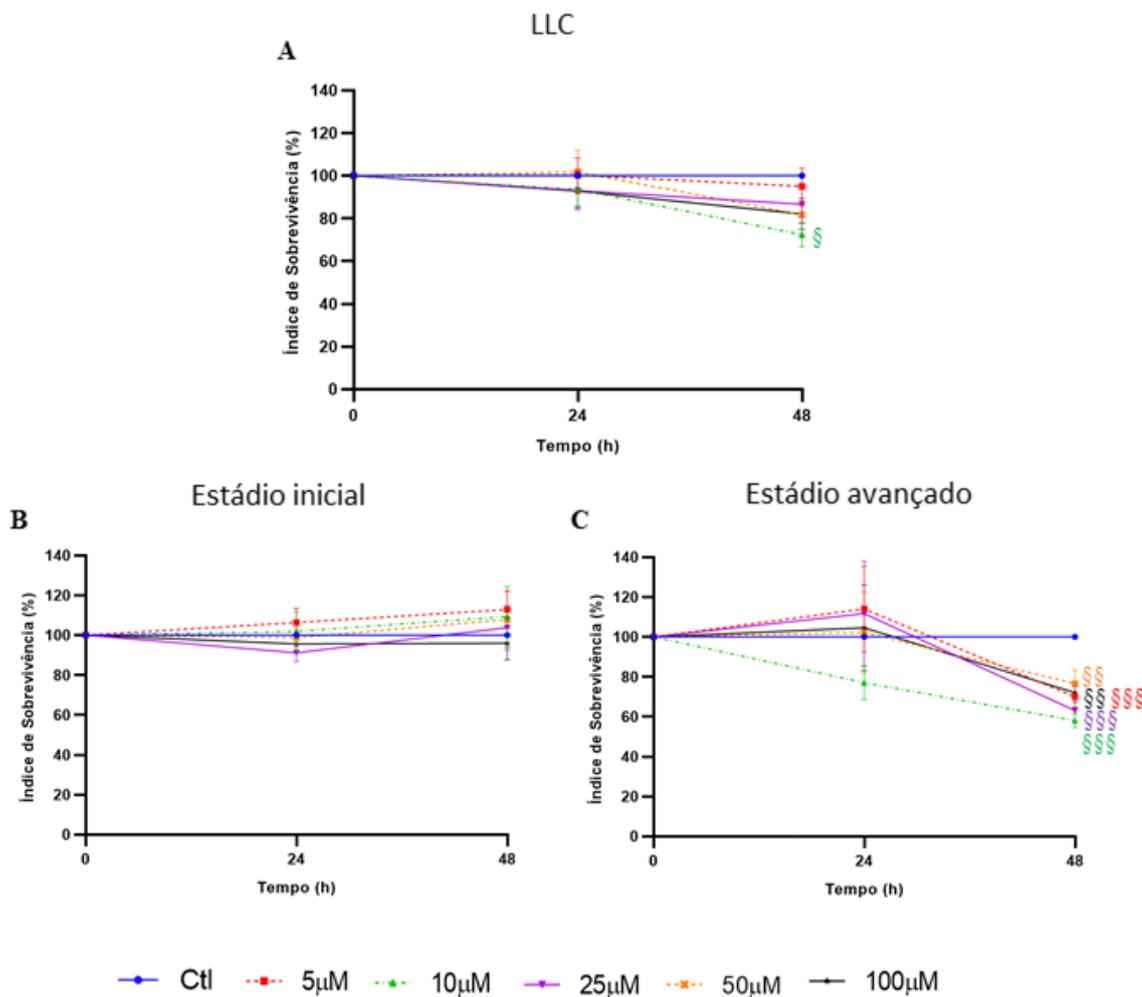
se verificou uma diminuição significativa da taxa de sobrevivência comparativamente ao observado ao final de 24 horas de incubação. O IC<sub>50</sub> matemático foi determinado para os dois tempos de incubação sendo de 472nM e 169nM, respetivamente para as 24 e 48 horas de incubação. Quando as células foram incubadas com o ML385, não se verificou praticamente diminuição da viabilidade celular ao fim de 24h. Contudo, observou-se uma ligeira diminuição do índice de sobrevivência ao final de 48h (Fig.3A), não sendo, no entanto, esta diminuição estatisticamente significativa, exceto quando adicionados 10µM de composto, em que a sobrevivência reduziu para 72,40% (±5,66%) (p<0.05 Fig. 3A). Os valores do IC<sub>50</sub> calculados para este composto foram muito superiores à concentração máxima utilizada (100µM).

O efeito dos inibidores do NRF2 foi ainda avaliado tendo em consideração o estágio da doença: inicial ou avançado. Para tal dos doentes foram subdividido em estágio inicial (doentes com classificação de Binet A e B, n=8) e estágio avançado (doentes com classificação de Binet C, n=5). Quando incubadas com o Brusatol verificou-se que nas PBMC isoladas de doentes de estágio avançado houve uma diminuição mais acentuada do índice de sobrevivência, de forma dependente da concentração, quando comparados com os doentes de estágio inicial, tendo-se inclusive verificado que ao fim de 48h de incubação com 100nM o índice de sobrevivência atingiu valores abaixo dos 50% (39,03% (±4,24%) (Fig. 2C). Em termos de IC<sub>50</sub> matemático, comparativamente com o estágio inicial, foi necessária uma menor concentração do inibidor, passando de 261,9nM às 48h do estágio inicial para 65,2nM no mesmo período do estágio avançado. Estes resultados revelaram diferenças estatisticamente significativas em todas as concentrações em relação ao controlo no grupo de doentes com estágio avançado, exceto para a concentração de 10nM às 24h (p<0.05, p<0.01 e p<0,001, Fig. 2B e C).

Nas células tratadas com ML385 a principal diferença entre os dois grupos verificou-se após 48h tendo havido apenas diminuição do índice de sobrevivência no grupo de doentes de estágio avançado (Fig. 3B e C). A concentração que provocou um maior efeito foi a de 10µM, com a qual se verificou uma diminuição progressiva do índice de sobrevivência nos doentes de estágio mais avançado, 77,11% (±8,48%) ao fim de 24h e 58,05% (±3,39%) ao fim de 48h de incubação (Fig. 3C). Apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo, ao fim de 48h de incubação, no grupo de doentes com estágio avançado (p<0.01 e p<0,001, Fig. 3C). Os valores de IC<sub>50</sub> matemático do ML385 em ambos os estádios apresentaram-se muito elevados em relação à concentração máxima utilizada (100µM), à exceção do estágio avançado às 48h cujo valor foi de 114,2µM.



**Figura 2** - Curvas de dose-resposta do Brusatol em PBMCs de doentes com LLC. As células foram incubadas na presença e ausência de concentrações crescentes de Brusatol (5nM, 10nM, 25nM, 50nM e 100nM) durante 48h. A cada 24h, a curva dose-resposta foi estabelecida a partir de um ensaio de hidrólise do FDA, conforme o descrito na secção Materiais e Métodos. Análise global, PBMCs de 13 doentes, do índice de sobrevivência após incubação com Brusatol: (A) População total-LLC, (B) Estadio inicial, (C) Estadio avançado. Os resultados estão expressos em percentagem (%) normalizados em relação ao controlo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, obtidos a partir de treze experiências independentes. Os \* indicam os casos nos quais se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo nas 24h; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Os § indicam os casos nos quais se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo nas 48h; § $p < 0.05$ ; §§ $p < 0.01$ ; §§§ $p < 0.001$ .



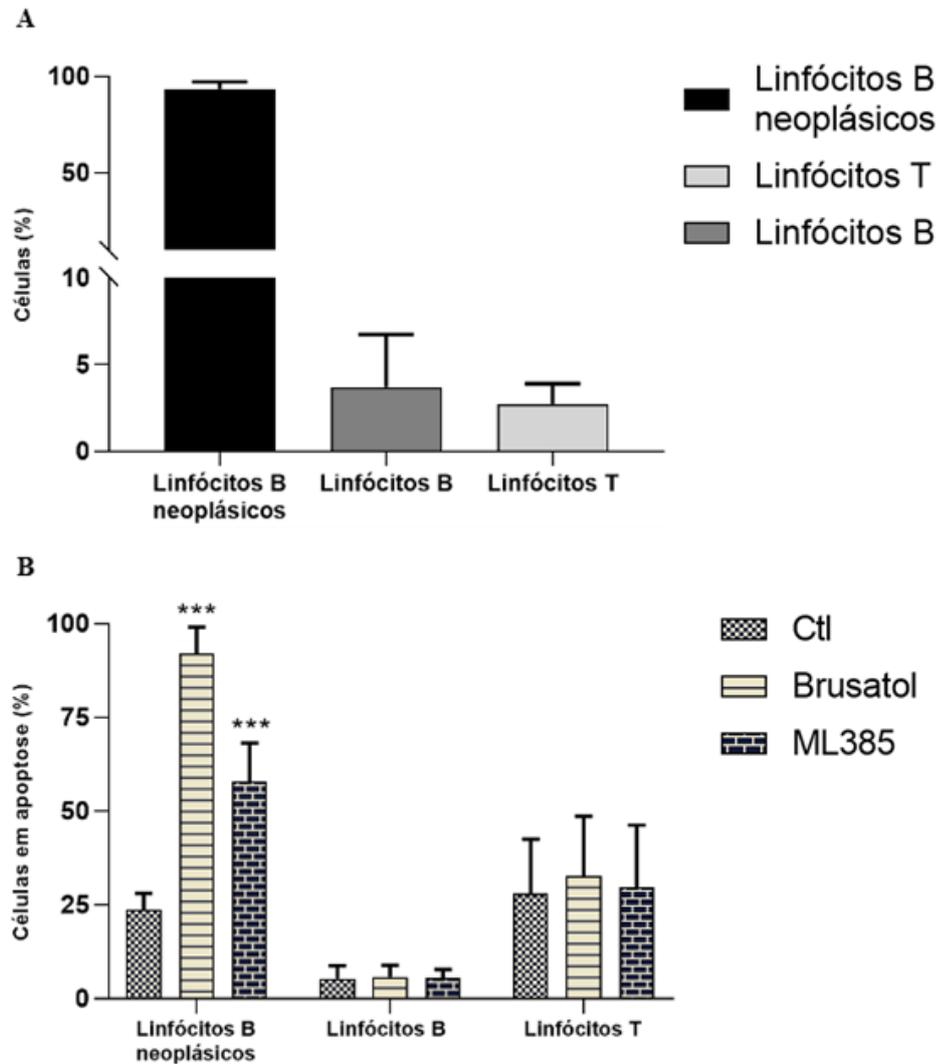
**Figura 3** - Curvas de dose-resposta de ML385 em PBMCs de doentes com LLC. As células foram incubadas na presença e ausência de concentrações crescentes de ML385 (5µM, 10µM, 25µM, 50µM e 100µM) durante 48h. A cada 24h, a curva dose-resposta foi estabelecida a partir de um ensaio de hidrólise do FDA, conforme o descrito na secção Materiais e Métodos. Análise global, PBMC de 13 doentes, do índice de sobrevivência após incubação com ML385: (A) População total-LLC, (B) Estádio inicial, (C) Estádio avançado. Os resultados estão expressos em percentagem (%) normalizados em relação ao controlo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, obtidos a partir de treze experiências independentes. Os \* indicam os casos nos quais se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo nas 24h; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Os § indicam os casos nos quais se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo nas 48h; § $p < 0.05$ ; §§ $p < 0.01$ ; §§§ $p < 0.001$ .

### **Avaliação da morte celular por citometria de fluxo em PBMCs de doentes com LLC incubadas com Brusatol e ML385**

Após estudar o efeito do Brusatol e do ML385 na sobrevivência das PBMCs isoladas de doentes com LLC, procedeu-se à avaliação da morte celular induzida pelos dois compostos por citometria de fluxo recorrendo à marcação com anexina V. Na análise por citometria de fluxo foram utilizados os anticorpos anti-CD5 e anti-CD19 que permitiram a identificação de diferentes subpopulações de linfócitos: linfócitos B neoplásicos (CD5+/CD19+), linfócitos B normais (CD5-/CD19+) e ainda linfócitos T normais (CD5+/CD19-). Assim, a população em estudo apresentava uma percentagem muito elevada de linfócitos B neoplásicos (CD5+/CD19+), cerca de 93,27% ( $\pm 3,66\%$ ), apenas 3,68% ( $\pm 3,04\%$ ), de linfócitos B com fenótipo normal (CD5-/CD19+) e cerca de 2,71% ( $\pm 1,18\%$ ) de linfócitos T (CD5+/CD19-), (Fig. 4A), não havendo diferenças significativas de acordo com o estadiamento.

Após incubação com os dois inibidores em estudo verificou-se um aumento significativo das células em apoptose (anexina V positivas) apenas na população de linfócitos B neoplásicos (CD5+/CD19+). Na presença de 100 nM de Brusatol observou-se um aumento significativo de linfócitos B neoplásicos em apoptose (91,85 %  $\pm$  7,14%) quando comparado com o controlo (23,71 %  $\pm$  4,3%), sendo este de aumento de 68,14% (Fig. 4B). Nas células tratadas com ML-385 observou-se um aumento de 34,19% comparativamente com o controlo (linfócitos B neoplásicos em apoptose: 57,90%  $\pm$  10,20%, vs controlo: 23,71%  $\pm$  4,3%), sendo estas diferenças estatisticamente significativas (Fig. 4B). Nas subpopulações de linfócitos normais analisadas não foram observadas diferenças entre as três condições, controlo, Brusatol e ML385 (Fig.4B), no que diz respeito à percentagem de células em apoptose.

A avaliação da morte celular por apoptose foi também analisada tendo em conta os estádios da doença. Assim o grupo de doentes foi subdividido em estágio inicial (n=8) e estágio avançado (n=5). A indução de apoptose mediada pela exposição aos inibidores do NRF2 foi semelhante entre os dois grupos de estadiamento, não havendo diferenças significativas.



**Figura 4** – Análise da morte celular induzida por Brusatol e ML385 em PBMCs de doentes com LLC. As células foram incubadas com 100nM de Brusatol e 100µM de ML385 durante 24h. Realizou-se a contagem diferencial de linfócitos pelos marcadores de superfície enquanto que a apoptose foi detetada pela Anexina-V tendo sido feita a análise por citometria de fluxo: (A) Contagem diferencial das PBMCs na população total, (B) Percentagem de células em apoptose na população total. Os resultados estão expressos em percentagem (%) normalizados em relação ao controlo. Os dados estão apresentados como média dos doentes  $\pm$  desvio padrão. Os \* indicam os casos nos quais se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## DISCUSSÃO

O papel do NRF2 tem vindo a ser amplamente estudado, tanto em neoplasias hematológicas como em tumores sólidos. Embora ainda pouco se saiba sobre este fator de transcrição em LLC, alguns estudos já demonstraram que os seus níveis estão elevados nas células de LLC, podendo influenciar a sobrevivência das células tumorais e a resistência à terapêutica. [18, 23] Neste sentido, o NRF2 poderá constituir um novo alvo terapêutico na LLC. Neste estudo avaliamos os efeitos de dois inibidores do NRF2, o Brusatol e o ML385, em PBMCs de doentes com LLC. O Brusatol é um composto natural, isolado da planta *Brucea javanica*, conhecido pela inibição do NRF2, contudo o seu mecanismo de ação ainda não se encontra totalmente esclarecido.[29, 30] O ML385 é uma pequena molécula que se liga diretamente ao NRF2 inibindo a ligação à proteína MAF, o que conduz ao bloqueio da sua atividade transcricional.[31]

Os primeiros estudos com o Brusatol revelaram que este apresentava uma atividade anti-tumoral em células de leucemia de rato, P388, no entanto, o mecanismo de ação era ainda desconhecido.[32] Em 2011, foi descrito pela primeira vez por Ren *et al* [29] que o Brusatol suprimia a ação do NRF2, tendo sido estudado desde então como um inibidor deste fator de transcrição em diversos estudos. [33-35] No nosso trabalho, verificamos que o Brusatol induziu uma diminuição do índice de sobrevivência das células de doentes com LLC de forma dependente essencialmente da dose e do estágio de risco da doença e menos do tempo de incubação, sendo o IC 50 matemático às 48 h de 169 nM. Resultados semelhantes aos obtidos no nosso estudo foram observados em linhas celulares de leucemia mieloide, tendo sido evidente o efeito citotóxico do Brusatol. [36] Estudos em outras neoplasias, como o cancro colorretal e o cancro do pulmão, foi relatada uma redução significativa da viabilidade em linhas celulares quando incubadas com este composto. [37-39] Como mencionado, os nossos resultados também sugerem que o efeito deste composto é dose e tempo dependente tal como observado por Xiang *et al*. Estes autores também observaram uma diminuição da viabilidade celular em linhas de cancro do pâncreas em função do tempo e da dose. [40]

De salientar que quando agrupamos os doentes por estádios de risco, verifica-se uma diferença significativa de sobrevivência das células entre os dois grupos. Nos doentes de estágio mais avançado, verificamos uma maior redução do índice de sobrevivência quando comparados com os de estágio inicial. Estes resultados podem ser explicados à luz de uma possível maior preponderância do NRF2 na progressão da doença. A presença de níveis elevados de NRF2 em estádios mais avançados já foi observado no carcinoma do pulmão de não pequenas células (NSCLC). [41] Embora saibamos que nas células de LLC os níveis de NRF2 se encontram mais elevados do que em linfócitos normais [18], são necessários

estudos mais pormenorizados que avaliem os níveis deste fator de transcrição nos diferentes estádios da doença.

Ao contrário do que foi observado por Karathedath *et al* [35] em Leucemia Mieloide Aguda (LMA), em que o Brusatol na concentração de 100nM induziu uma reduzida percentagem de apoptose em linhas celulares deste tipo de leucemia aguda, os nossos resultados evidenciam que este composto desencadeia uma elevada taxa de apoptose em PBMCs de doentes com LLC. Tal como no nosso estudo, Xiang *et al* [40] e Xie *et al* [42] observaram que este composto induz apoptose numa percentagem significativa de células em linhas celulares de cancro do pâncreas e NSCLC, respetivamente. Além disso, os nossos resultados mostram que o efeito citotóxico deste composto foi quase exclusivamente observado nos linfócitos B neoplásicos, onde verificamos um aumento significativo de células apoptóticas. O Brusatol demonstrou ter pouca toxicidade na subpopulação de linfócitos normais, inversamente ao verificado no caso dos linfócitos B neoplásicos. Uma possível explicação para esta elevada percentagem de apoptose nos linfócitos B neoplásicos é a dependência que estas células têm do NRF2 para manutenção da sua sobrevivência. Estes resultados sugerem que o Brusatol pode ser considerado uma terapêutica dirigida à célula neoplásica.

No que diz respeito ao efeito do ML385, não se verificaram efeitos significativos no índice de sobrevivência das células, tendo havido apenas uma ligeira diminuição ao fim de 48h de incubação. Poucos estudos sobre os efeitos do ML385 como inibidor da NRF2 foram realizados até agora, e tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito deste composto em células de doentes de LLC. No entanto, foi já verificado que o ML385 bloqueia a atividade de transcrição do NRF2 e apresenta uma atividade anti-tumoral significativa, numa linha celular de cancro do pulmão com mutação de perda de função em *KEAP1*. [43]

Quando efetuámos o estudo comparativo por estádios da doença, verificamos que o ML385 apresentou uma redução significativa da sobrevivência das PBMCs às 48h em doentes com estágio avançado, reforçando assim o possível envolvimento do NRF2 nos estádios avançados da doença.

Tal como observado nas células tratadas com Brusatol, o ML385 induziu a morte dos linfócitos B neoplásicos por apoptose de forma significativa, contudo em menor percentagem que o Brusatol. Pelos resultados que obtivemos, este composto aparenta ter uma menor toxicidade para a subpopulação de linfócitos B e T normais à semelhança do que foi visto com o Brusatol. Como referido anteriormente, existem ainda poucos estudos sobre o efeito deste inibidor do NRF2 em neoplasias, quando utilizado de forma isolada. No entanto, alguns

estudos evidenciam que o ML385 associado a outros fármacos antineoplásicos induz morte celular por apoptose. [31]

Vários estudos se têm focado no papel destes fármacos como terapêutica adjuvante nos casos de resistência ao tratamento de primeira linha. Em LMA, foi observado que o Brusatol aumentou a sensibilidade à Citarabina e Daunorubicina em linhas celulares resistentes a estes fármacos. [35] Um outro estudo demonstrou que o ML385 quando associado à carboplatina e a outros fármacos, como o doxorubicina e o paclitaxel, permitiu aumentar substancialmente a citotoxicidade em linhas de NSCLC com mutação de perda de atividade em KEAP1, em comparação com os fármacos em monoterapia. [31]

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que os inibidores do NRF2, Brusatol e ML385, em particular o Brusatol, poderá constituir uma nova abordagem terapêutica dirigida às células de LLC em doentes com este tipo de leucemia, essencialmente em estágio avançado. Estes resultados apontam para o envolvimento do NRF2 no desenvolvimento e progressão da LLC, uma vez que o uso de inibidores deste fator de transcrição levou a uma diminuição da sobrevivência celular sobretudo dos linfócitos B neoplásicos de doentes em estádios avançados. No entanto, para confirmar estes resultados é necessário aumentar a amostra de doentes nos vários grupos de risco. Apesar de mais estudos serem necessários para a determinação do papel destes fármacos na inibição do NRF2 e para avaliar a real eficácia e segurança destes compostos, este estudo vem sugerir a possibilidade do uso destes fármacos na prática clínica, em monoterapia ou terapia adjuvante em doentes com LLC.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, deixo uma palavra de apreço por me ter recebido no seu grupo e por toda a disponibilidade, orientação e correção científica que me deu.

Ao Doutor José Pedro Carda pela orientação do meu trabalho, pelo tempo que disponibilizou para me ajudar e ensinar, assim como pelas valiosas indicações para a realização desta dissertação.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves, pelo apoio que me deu para a realização deste trabalho, sem o qual não teria sido possível concluí-lo.

À Dra. Raquel Alves e Dra. Joana Jorge pelo apoio prestado ao longo deste tempo, bem como pela ajuda e conhecimentos teóricos e de técnicas laboratoriais que me deram.

Ao grupo "Laboratório de Oncobiologia e Hematologia" pela simpatia e ajuda prestada ao longo do meu trabalho.

À Dra. Barbara Marques pelo apoio fornecido durante a recolha de dados clinico-laboratoriais da população em estudo.

Aos meus pais por todos os sacrifícios que fizeram para me permitir chegar aqui. Neste momento difícil vamos continuar a lutar juntos.

À Inês por não me deixar desistir quando esse seria o caminho mais fácil.

Ao meu irmão e aos meus amigos, obrigado pelo incentivo recebido ao longo destes anos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kater AP, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2021;32:23-33.
2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology*. 2019;94:1266-87.
3. Mukkamalla SKR, Taneja A, Malipeddi D, Master SR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
4. Jeon YW, Cho SG. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review including Korean cohorts. *The Korean journal of internal medicine*. 2016;31:433-43.
5. Baldini L, Cro L, Cortelezzi A, Calori R, Nobili L, Maiolo AT, et al. Immunophenotypes in "classical" B-cell chronic lymphocytic leukemia. Correlation with normal cellular counterpart and clinical findings. *Cancer*. 1990;66:1738-42.
6. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2018;391:1524-37.
7. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019;16:684-701.
8. Crassini K, Stevenson WS, Mulligan SP, Best OG. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2019;186:668-84.
9. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131:2745-60.
10. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Giessl A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123:2663-72.
11. Sarmiento-Ribeiro AB, Proenca MT, Sousa I, Pereira A, Guedes F, Teixeira A, et al. A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leukemia research*. 2012;36:1041-8.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 1st ed. Oxford: Clarendon Press; 1985.
13. D'Arena G, Seneca E, Migliaccio I, De Feo V, Giudice A, La Rocca F, et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: still a matter of debate. *Leukemia & lymphoma*. 2019;60:867-75.

14. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:8416763.
15. Gaman AM, Buga AM, Gaman MA, Popa-Wagner A. The role of oxidative stress and the effects of antioxidants on the incidence of infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:158135.
16. D'Arena G, Vitale C, Perbellini O, Coscia M, La Rocca F, Ruggieri V, et al. Prognostic relevance of oxidative stress measurement in chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of haematology*. 2017;99:306-14.
17. Liu J, Chen G, Pelicano H, Liao J, Huang J, Feng L, et al. Targeting p53-deficient chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo by ROS-mediated mechanism. *Oncotarget*. 2016;7:71378-89.
18. Wu RP, Hayashi T, Cottam HB, Jin G, Yao S, Wu CC, et al. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:7479-84.
19. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2013;53:401-26.
20. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology*. 2013;1:45-9.
21. Abdul-Aziz A, MacEwan DJ, Bowles KM, Rushworth SA. Oxidative stress responses and NRF2 in human leukaemia. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:454659.
22. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2017;1863:585-97.
23. Sanchez-Lopez E, Ghia EM, Antonucci L, Sharma N, Rassenti LZ, Xu J, et al. NF-kappaB-p62-NRF2 survival signaling is associated with high ROR1 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cell death and differentiation*. 2020;27:2206-16.
24. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and cellular biology*. 2003;23:8137-51.
25. Hayden A, Douglas J, Sommerlad M, Andrews L, Gould K, Hussain S, et al. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urologic oncology*. 2014;32:806-14.
26. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological research*. 2008;58:262-70.
27. Moon EJ, Giaccia A. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: possible implications in cancer treatment. *Free radical biology & medicine*. 2015;79:292-9.

28. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375-90.
29. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:1433-8.
30. Olayanju A, Copple IM, Bryan HK, Edge GT, Sison RL, Wong MW, et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity-implications for therapeutic targeting of Nrf2. *Free radical biology & medicine*. 2015;78:202-12.
31. Singh A, Venkannagari S, Oh KH, Zhang YQ, Rohde JM, Liu L, et al. Small Molecule Inhibitor of NRF2 Selectively Intervenes Therapeutic Resistance in KEAP1-Deficient NSCLC Tumors. *ACS chemical biology*. 2016;11:3214-25.
32. Egebalay SA, Hall IH, Lee KH, Sumida Y, Imakura Y, Wu RY. Antitumor agents. XXXV: Effects of brusatol, bruceoside A, and bruceantin on P-388 lymphocytic leukemia cell respiration. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1979;68:887-90.
33. Xiang Y, Ye W, Huang C, Yu D, Chen H, Deng T, et al. Brusatol Enhances the Chemotherapy Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer via the Nrf2 Signalling Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:2360427.
34. Evans JP, Winiarski BK, Sutton PA, Jones RP, Ressel L, Duckworth CA, et al. The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumour agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9:27104-16.
35. Karathedath S, Rajamani BM, Musheer Aalam SM, Abraham A, Varatharajan S, Krishnamurthy P, et al. Role of NF-E2 related factor 2 (Nrf2) on chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia (AML) and the effect of pharmacological inhibition of Nrf2. *PLoS one*. 2017;12:e0177227.
36. Mata-Greenwood E, Cuendet M, Sher D, Gustin D, Stock W, Pezzuto JM. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G(1) arrest is associated with down-regulation of c-myc. *Leukemia*. 2002;16:2275-84.
37. Zhou Y, Li Y, Ni HM, Ding WX, Zhong H. Nrf2 but not autophagy inhibition is associated with the survival of wild-type epidermal growth factor receptor non-small cell lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2016;310:140-9.
38. Oh ET, Kim CW, Kim HG, Lee JS, Park HJ. Brusatol-Mediated Inhibition of c-Myc Increases HIF-1 $\alpha$  Degradation and Causes Cell Death in Colorectal Cancer under Hypoxia. *Theranostics*. 2017;7:3415-31.

39. Lu Y, Wang B, Shi Q, Wang X, Wang D, Zhu L. Brusatol inhibits HIF-1 signaling pathway and suppresses glucose uptake under hypoxic conditions in HCT116 cells. *Scientific reports*. 2016;6:39123.
40. Xiang Y, Ye W, Huang C, Lou B, Zhang J, Yu D, et al. Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK/p38 MAPK/NF-kappaB/Stat3/Bcl-2 signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;487:820-6.
41. Yang H, Wang W, Zhang Y, Zhao J, Lin E, Gao J, et al. The role of NF-E2-related factor 2 in predicting chemoresistance and prognosis in advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer*. 2011;12:166-71.
42. Xie J, Lai Z, Zheng X, Liao H, Xian Y, Li Q, et al. Apoptotic activities of brusatol in human non-small cell lung cancer cells: Involvement of ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicology*. 2021;451:152680.
43. Gong M, Li Y, Ye X, Zhang L, Wang Z, Xu X, et al. Loss-of-function mutations in KEAP1 drive lung cancer progression via KEAP1/NRF2 pathway activation. *Cell communication and signaling : CCS*. 2020;18:98.