

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**COFILINA-1 (*CFL-1*) CORRELACIONA-SE À SOBREVIVÊNCIA  
MEDIANA EM PACIENTES COM CARCINOMA DE  
PULMÃO NÃO DE PEQUENAS CÉLULAS TRATADOS COM  
RADIOTERAPIA**

MATHEUS HERMES LEAL

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**COFILINA-1 (*CFL-1*) CORRELACIONA-SE À SOBREVIVÊNCIA  
MEDIANA EM PACIENTES COM CARCINOMA DE  
PULMÃO NÃO DE PEQUENAS CÉLULAS TRATADOS COM  
RADIOTERAPIA**

MATHEUS HERMES LEAL

Orientador: Professor Doutor Fábio Klant

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

*BANCA EXAMINADORA*

Professor Doutor Gilberto Schwartzmann

Professor Doutor Neiro Waechter da Motta

Professor Doutor Paulo Renato Ferreira Figueiredo

Professor Doutor Rafael Roesler

**RESUMO**

**Base teórica:** O câncer de pulmão é uma doença com alta incidência e mortalidade, cujo prognóstico permanece discreto apesar do melhor entendimento da doença nas últimas décadas. A radioterapia tem papel terapêutico em todos os estágios da doença. A expressão da cofilina-1, uma proteína relacionada à mobilidade celular, determinou maior radiosensibilidade a células de adenocarcinoma brônquico em estudos *in vitro*, porém pior sobrevida em estádios iniciais **Objetivo:** Avaliar se a expressão da cofilina-1 interfere na sobrevida e no controle local em pacientes com câncer de pulmão submetidos a tratamento com radioterapia definitiva **Métodos:** Foram avaliados pacientes com câncer de pulmão não pequenas células, com estádios I–IV, que receberam radioterapia exclusiva ou combinada com quimioterapia, dirigida à neoplasia brônquica, na unidade de radioterapia do HCPA, nos anos de 2009 a 2015. Todos os pacientes tiveram a expressão de cofilina-1 aferida e foram distribuídos conforme os níveis de expressão de cofilina-1 utilizando-se de protocolo específico. Os prontuários foram avaliados retrospectivamente para calcular a sobrevida mediana. A progressão foi verificada através de avaliação de tomografias de tórax de controle. **Resultados:** Foram avaliados 45 pacientes neste estudo. A sobrevida mediana de todos os pacientes foi de 11,3 meses e a sobrevida global em 5 anos de 17,3%. Pacientes com expressão média ou alta de cofilina-1 tiveram maior mortalidade quando comparados com pacientes com baixa expressão (respectivamente, HR 1,628, IC95 1,137-8,287 e HR 1,59 IC95 1,105-7,342). Não houve diferença significativamente estatística entre controle local e expressão de cofilina-1. **Conclusão:** A expressão de cofilina-1 está associada à sobrevida em pacientes com carcinoma brônquico tratados com radioterapia e existe uma tendência a melhor controle local com baixa expressão. Nossos resultados sugerem um novo campo a ser explorado no manejo do carcinoma de pulmão localmente avançado, utilizando-se dos níveis de cofilina-1.

**Palavras chave:**

*“Radiotherapy”, “radiation therapy”, “lung cancer”, “non-small cell lung cancer”, “cofilin”, “CFL1 expression”*

## ABSTRACT

**Background:** Lung cancer is a disease with high incidence and mortality, whose prognosis remains poor despite a better understanding of the disease in the last decades. Radiotherapy plays a therapeutic role in all stages of disease. The expression of cofilin-1, a protein related to cellular mobility, determined greater radiosensitivity to lung adenocarcinoma cells in *in vitro* studies, but worse survival at initial stages. **Objective:** To evaluate if the expression of cofilin-1 modified survival and local control in lung cancer patients submitted to definitive treatment with radiotherapy. **Methods:** Patients with non-small cell lung cancer with stage I-IV who received radiotherapy alone or combined with chemotherapy for lung cancer at the HCPA radiotherapy unit from 2009 to 2015 were evaluated. All patients had the expression of measured cofilin-1 evaluated and were distributed by cofilin-1 expression according to specific protocol. The medical records were retrospectively evaluated to estimate median survival. The progression was verified through evaluation of control chest tomography. **Results:** 45 patients were assessed in this study. The median survival of all patients was 11.3 months and the 5-year overall survival was 17.3%. Patients with medium or high expression of cofilin-1 had higher mortality rates when compared to patients with low expression (HR, 1,628, CI95, 1,137-8,287 and HR, 1.59, CI95, 1,105-7,342). There was no statistically significant difference between local control and cofilin-1 expression **Conclusion:** cofilin-1 expression is associated with survival in patients with lung cancer treated with radiotherapy and there is a tendency for better local control with low *CFLI* expression. Our results suggest a new field to be explored in the management of locally advanced lung carcinoma, using cofilin-1 expression levels.

### Keywords:

" Radiotherapy ", " radiation therapy ", " lung cancer ", " non-small cell lung cancer ", "Cofilin-1 ", " CFLI expression "

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lâmina HE Adenocarcinoma Pulmão	13
Figura 2 – Lâmina HE Carcinoma Epidermóide	13
Figura 3 – Lâmina HE Carcinoma de Grandes Células	14
Figura 4 – Lâmina HE Carcinoma de Pequenas Células	15
Figura 5 – Distribuição de casos de câncer de pulmão por sexo	16
Figura 6 – Mortalidade do carcinoma brônquico por estágio	17
Figura 7 – Curva de sobrevida celular	26
Figura 8 – Associação entre controle local e sobrevida global	27
Figura 9 – Estrutura da cofilina-1	30
Figura 10 – Diversas funções celulares da cofilina-1	32
<i>Figure 11 – Steps of the image processing to evaluate the immunoreactivity of cofilin-1</i>	66
<i>Figure 12 – Images after immunohistochemical reaction with cofilin-1 markers</i>	67
<i>Figure 13 – Kaplan-Meier curve of the cohort</i>	67
<i>Figure 14 – Graph of the distribution of cofilin-1 expression</i>	68
<i>Figure 15 - Graph of the dispersion of cofilin-1 expression</i>	68
<i>Figure 16 – Kaplan-Meier curve comparing cofilin-1 expression and survival</i>	69
<i>Figure 17 – Univariate analysis of median survival by cofilin-1 expression, by clinical stages.</i>	70

*Figure 18 – Expression of cofilin-1 and local control by response strata  
evaluated by Recist* 70

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**Bcl-2** – do inglês *B-cell CLL/lymphoma 2*

**BRCA1** – do inglês *Breast Cancer type 1 susceptibility protein*

**BRCA2** – do inglês *Breast Cancer type 2 susceptibility protein*

**CDKN2A** – do inglês *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2<sup>A</sup>*

**CFL1** – gene humano que codifica a proteína Cofilina-1

**c-MYC** – do inglês *Myelocytomatosis oncogene*

**Da** –Dalton

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

**EGF** – do inglês *Epidermal Growth Factor*

**EGFR** – do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*

**Estadiamento** – Conforme 7<sup>o</sup> edição do TNM (7)

**ESTs** – do inglês *Expressed Sequence Tags*

**Gy** – Gray (unidade de dose absorvida – J/Kg)

**HDAC** – Histona desacetilase

**HE** – Hematoxilina Eosina

**HER2-2/neu** – do inglês *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*

**HR** – Hazard Ratio

**IASLC** – *International Agency for Study of Lung Cancer*

**KRAS** – do inglês *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*

**LC** – do inglês *Local Control*

**miRNA** – microRNA

**MS** – do inglês *Median Survival*

**NSCLC** – do inglês *Non Small Cell Lung Cancer*

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**OS**: do inglês *Overall Survival*



**PDGF** – *Platelet-Derived Growth Factor*

**piRNA** – Piwi-interacting RNAs

**PRIMA-1** – p53 reactivation and induction of massive apoptosis

**RNA** – *Ácido Ribonucleio (Ribonucleic Acid)*

**RR** – Risco Relativo

**RTOG** – Radiation Therapy Oncology Group

**SBRT** – do inglês *Stereotactic Body Radiation Therapy*

**SCLC** – do inglês *Small Cell Lung Cancer*

**TGF- $\beta$**  – do inglês *Transforming Growth Factor  $\beta$*

**TMA** – do inglês *Tissue Microarray*

**TP53** – do inglês *Tumor Protein 53*

**VHL** – do inglês *Von Hippel-Lindau tumor suppressor*

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Esquema de agrupamento do estadiamento da neoplasia do pulmão	21
Tabela 2 – Estratégia de busca de referências bibliográficas	36
<i>Table 1 – Population Demographics</i>	63
<i>Table 2 – Median Survival by cofilin-1 stratification groups</i>	64
<i>Table 3 – Hazard Ratio of cofilin-1 expression with low expression used as reference in comparison of groups</i>	64
<i>Table 4 – Local control by cofilin-1 expression</i>	65
<i>Table 5 – Median expression of cofilin-1 by strata of local control</i>	65

## SUMÁRIO

**Título**

**Banca Examinadora**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Revisão da Literatura .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>37</b>
<b>4. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>38</b>
<b>5. Artigo em Inglês .....</b>	<b>47</b>
<b>6. Considerações Finais .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO:

O termo câncer de pulmão, ou carcinoma brônquico, designa doenças malignas que se originam nas vias aéreas ou parênquima pulmonar. Cerca de 85 por cento de todos os cânceres de pulmão são classificados como câncer de pulmão não de pequenas células (NSCLC), sendo os 15 por cento restantes relativos ao câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) e outros tipos histológicos.

A doença teve incidência mundial de cerca de 1,8 milhões de casos e causou um número estimado de 1,6 milhões de mortes em 2012 (2). Nos Estados Unidos, o câncer de pulmão lidera na incidência e mortalidade relacionada ao câncer em ambos os sexos. A sobrevida global em todos os estádios em 5 anos é de 16%(3).

A melhor abordagem terapêutica depende de preferências do paciente, estadiamento e performance. A ideia central do tratamento é procurar determinar o melhor controle local e sistêmico da doença, considerando a toxicidade de cada intervenção associada ao contexto clínico do paciente.

Em geral, para pacientes com estágios I e II, o tratamento da doença consiste em ressecção cirúrgica completa, com a possível adição de quimioterapia adjuvante. Para pacientes em estágio III, existe significativa controvérsia quanto ao melhor manejo, em parte justificada pela população heterogênea de pacientes assim estadiados. Para pacientes selecionados com doença IIIA, candidados à ressecção cirúrgica, quimioterapia adjuvante mostrou benefício em sobrevida. Para os pacientes com doença irressecável ou inoperável, a abordagem padrão é tratamento combinado (de forma concomitante para pacientes aptos ou sequencial para pacientes com pior performance). Cerca de 50 por cento dos pacientes apresentam evidência de disseminação hematogênica no momento do diagnóstico (4). Para pacientes com estágio IV a quimioterapia sistêmica é a abordagem de tratamento inicial padrão. Em casos de pacientes estágio IV que necessitem de controle local, a radioterapia pode entrar como parte do tratamento.

A despeito do avanço técnico no tratamento e no entendimento da doença nas últimas décadas, o prognóstico dos pacientes não melhorou significativamente. Muitos destes pacientes apresentam doença irressecável no diagnóstico, cujo padrão do tratamento é radioquimioterapia. O estudo RTOG-73-01 definiu a dose de 60 Gy em 30 frações, com sobrevida de 19% em 2 anos(5). A taxa de resposta radiográfica foi de aproximadamente

60%, falha local dentro do campo de radiação, cerca de 25%, e as taxas de metástases distantes foram de 15% e 35% em 6 e 12 meses, respectivamente. Outros estudos com doses de RT entre 60-64 Gy relaram sobrevida média de 10-14 meses para os pacientes estágio IIIA/IIIB (6). Le Chevalier (7) mostrou em 2 anos taxa de sobrevida global de apenas 14% e controle local em 1 ano de 15%, avaliando pacientes com estudos broncoscópicos. A adição de quimioterapia melhorou a sobrevida mediana em 1.7 meses e trouxe um benefício absoluto em sobrevida de cerca de 3% (8).

Tanto o pobre controle local, quanto a capacidade de disseminação sistêmica do câncer de pulmão têm levado à busca de melhor entender o comportamento biológico da doença. Esse entendimento já levou à descoberta de mutações específicas e ao desenvolvimento de terapias alvo como nas mutações do EGFR e nas translocações ALK.

Mais recentemente, a cofilina (CFL1, cofilin-1; nonmuscle isoform; gene ID, 1072), uma proteína relacionada à mobilidade celular, foi associada à indução da apoptose como resposta ao stress oxidativo (9). Outros estudos evidenciaram maior radiosensibilidade em linhagens de células de câncer de pulmão não de pequenas células com super-expressão de cofilina (10).

A radioterapia empregada em doses fracionadas convencionais (1.8 – 2 Gy), na forma de teleterapia, com acelerador linear de ftons, tem a indução da apoptose como um dos principais mecanismos de dano celular. Essa indução ocorre predominantemente pelo efeito indireto (formação do radical hidroxil e stress oxidativo do DNA) e pelo efeito direto na dupla-hélice do DNA, o que corrobora os achados dos estudos supracitados.

A verificação clínica de tais achados laboratoriais é de especial interesse para determinar se super-expressão de cofilina pode confirmar maior radiosensibilidade tecidual. Tal verificação ainda não foi publicada, pelo menos em periódicos especializados em radioterapia, até onde se pôde pesquisar.

O presente projeto pretende avaliar se a super-expressão de cofilina determinou alteração nas taxas de controle local e sobrevida mediana em pacientes com câncer de pulmão tratados com tratamento combinado (radioquimioterapia) ou radioterapia isolada na unidade de radioterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada na avaliação da resposta padrão de pacientes com câncer de pulmão não de pequenas células tratados com radioterapia, em relação à sobrevida e controle local, bem como estudos laboratoriais evidenciando resposta à radioterapia *in vitro* de tumores com superexpressão de cofilina-1. Também pesquisamos a expressão de cofilina-1 afetando o comportamento das curvas de sobrevida em pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed e banco de dados SciELO, no período de 2000 a 2015.

Foram realizadas buscas através da associação dos termos:

- a) "*Radiotherapy*",
- b) "*radiation therapy*",
- c) "*lung cancer*",
- d) "*non-small cell lung cancer*",
- e) "*Cofilin-1*",
- f) "*CFL1 expression*".

**Tabela 1.** Estratégia de busca de referências bibliográficas. Nas linhas encontram-se as associações de termos utilizadas para busca. Nas colunas, encontram-se as bases de dados utilizadas e a indicação de artigos selecionados.

	Artigos Pubmed	Selecionados Pubmed	Artigos SciELO	Selecionados SciELO
1 + 4	4024	21	11	1
2 + 4	1266	16	3	0
1 + 5	5	1	0	0
2 + 5	2	0	0	0
3 + 5	20	4	0	0
1 + 3 + 5	1	1	0	0
1 + 3 + 6	0	0	0	0
2 + 3 + 5	1	1	0	0
2 + 3 + 6	0	0	0	0

## **2.1 Definição e aspectos patológicos do Câncer de Pulmão**

O termo câncer de pulmão, ou carcinoma brônquico, designa doenças malignas que se originam nas vias aéreas ou parênquima pulmonar. Cerca de 85 por cento de todos os cânceres de pulmão são classificados como câncer de pulmão não-pequenas células (NSCLC), sendo os 15 por cento restantes relativos ao câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) e outros tipos histológicos. Esta distinção é fundamental para determinação de estadiamento, tratamento e prognóstico. Para fins deste trabalho não serão avaliadas neoplasias metastáticas secundárias no parênquima pulmonar.

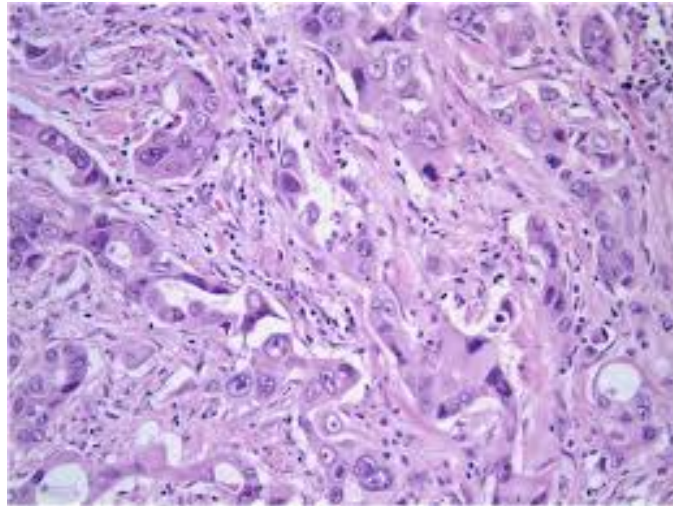
A classificação de 2015 da Organização Mundial da Saúde (OMS) de tumores de pulmão constitui um ponto de partida para avaliação da doença (tabela 1) (1,2). A classificação da OMS 2015 enfatiza a caracterização imunohistoquímica, o que permite tratamento mais individualizado bem como orientação do curso clínico da doença. A classificação ainda permite critérios e terminologia padronizados para o diagnóstico de câncer de pulmão em pequenas biópsias e citologia, além de fornecer orientação para realização de testes de alterações genéticas. Discutiremos brevemente aspectos patológicos das neoplasias malignas de pulmão mais prevalentes.

### **2.1.1 Detalhamento do esquema da Organização Mundial de Saúde (OMS) de classificação patológica**

#### **2.1.1.1 Adenocarcinoma**

O adenocarcinoma é o tipo mais comum de câncer de pulmão em séries contemporâneas. Acredita-se que a incidência aumentada de adenocarcinoma esteja relacionada à introdução de cigarros com filtro (3). A OMS enfatiza que os espécimes de tecido devam ser também gerenciados para preservar o tecido para estudos moleculares, o que pode ter implicações no tratamento, como uso de terapias direcionadas para certos subgrupos de pacientes. O diagnóstico histológico requer evidência de formação de glândulas neoplásicas, expressão de marcadores pneumocíticos (TTF-1+/napsina) ou mucina (Figura 1). Há variação significativa na extensão e na arquitetura da formação de glândulas neoplásicas. Existe significância prognóstica quando predominante nas ressecções (4).



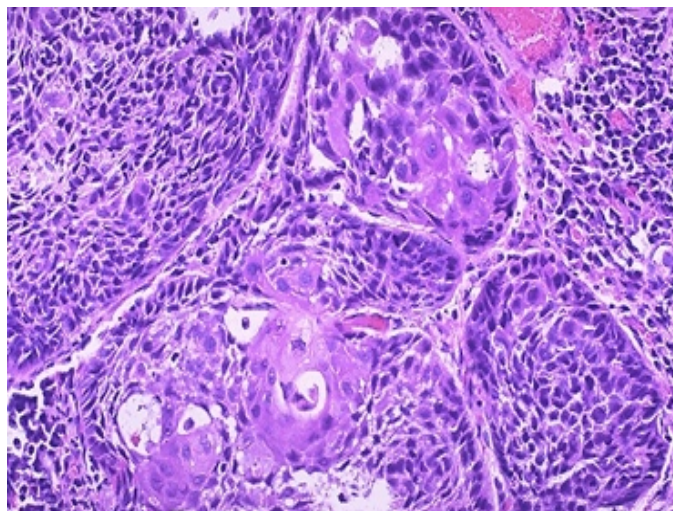


**Figura 1.** Lâmina HE Adenocarcinoma Pulmão (cedido pelo Serviço de patologia HCPA).

Os adenocarcinomas invasivos são classificados pelo seu padrão predominante.

#### **2.1.1.2 Carcinoma de células escamosas**

O carcinoma de células escamosas foi o tipo histológico mais frequente de tumor pulmonar até a década de 1980. O diagnóstico de carcinoma de células escamosas é baseado na presença de produção de queratina por células tumorais ou desmossomas intercelulares (Figura 2) ou por imunohistoquímica consistente. É dividido em subtipos não queratinizantes, queratinizantes e basalóides.



**Figura 2.** Lâmina HE Carcinoma Epidermóide (cedido pelo Serviço de patologia HCPA).

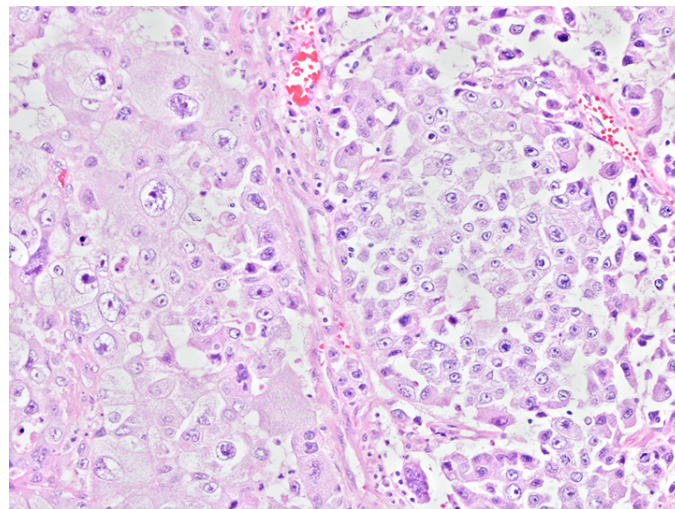
A maioria dos carcinomas de células escamosas (60 a 80 por cento) surgem nas porções proximais da árvore brônquica.

### 2.1.1.3 Carcinoma adenoescamoso

Os carcinomas adenoescamosos são definidos como tumores compostos por mais de 10% de componentes malignos glandulares e escamosos. A incidência varia de 0,4 a 4 por cento dos carcinomas broncogênicos; é um tumor agressivo e parece ter um pior prognóstico que adenocarcinomas ou carcinomas de células escamosas (5).

### 2.1.1.4 Carcinoma de grandes células

O carcinoma de células grandes (LCC) é uma neoplasia epitelial maligna que não possui diferenciação glandular e escamosa por microscopia de luz e imunohistoquímica e que carece de características citológicas de carcinoma de células pequenas. Apresenta-se como uma grande massa periférica com necrose proeminente. A LCC é caracterizada por folhas de células redondas a poligonais com nucléolos proeminentes e citoplasma abundante (Figura 3). Como a LCC representa um diagnóstico de exclusão, não é apropriado aplicar o termo a pequenas biópsias.



**Figura 3.** Lâmina HE LLC (cedido pelo Serviço de patologia HCPA).

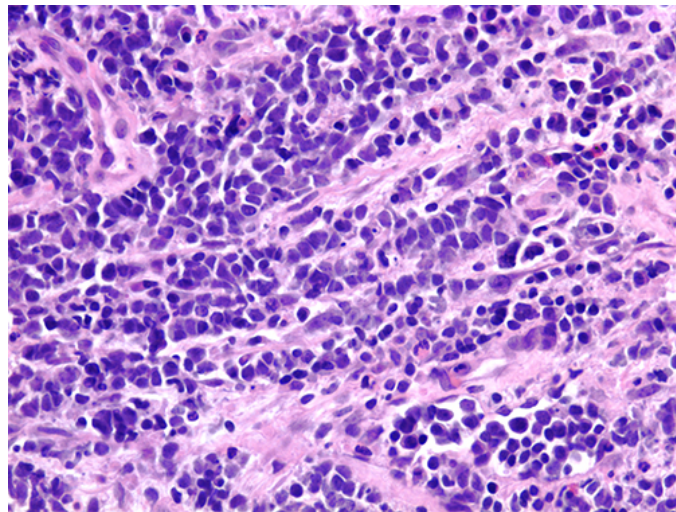
LCC inclui carcinomas mal diferenciados que não podem ser classificados por microscopia óptica de rotina ou imunohistoquímica. Os carcinomas mal diferenciados são considerados células grandes somente se faltam os marcadores IHC (com o chamado fenótipo nulo).

### 2.1.1.5 Tumores Neuroendócrinos

Vários tipos de tumores são agrupados com base em características neuroendócrinas compartilhadas. Estes tumores incluem carcinoma de células pequenas, carcinoma neuroendócrino de células grandes e carcinoides.

Carcinomas de pequenas células e carcinomas neuroendócrinos de grandes células são caracterizados clinicamente por um curso mais agressivo e patologicamente por uma taxa mitótica maior. Carcinomas de pulmão de pequenas células (SCLC) mostram uma forte correlação com o tabagismo e são extremamente raros em não fumantes (6).

O SCLC é composto de células com núcleos redondos, ovais, angulados e, geralmente, pequenas quantidades de citoplasma. (Figura 4). As células são frágeis e os tumores são geralmente extensivamente necróticos, podendo ambos contribuir para a dificuldade em estabelecer um diagnóstico histológico.



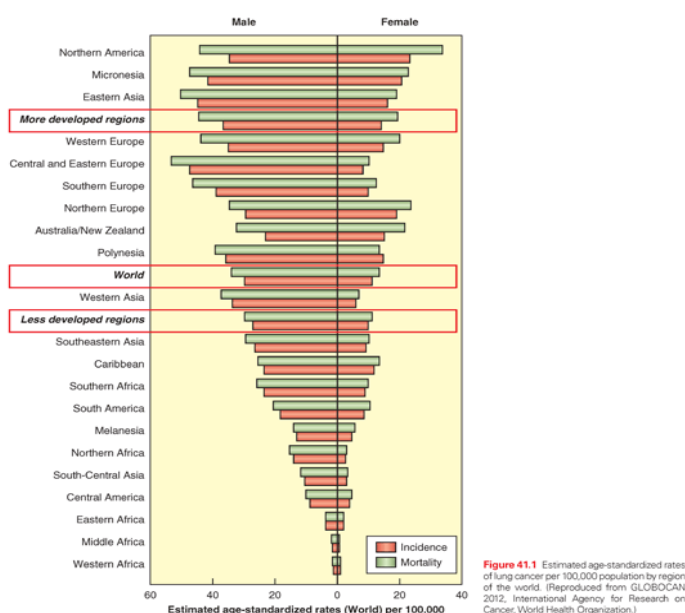
**Figura 4.** Lâmina HE SCLC (cedido pelo Serviço de patologia HCPA).

Os tumores carcinoides são neoplasias epiteliais neuroendócrinas com um grau inferior ao de células grandes neuroendócrinas ou carcinomas de células pequenas e podem ser divididos em tumores carcinoides típicos ou atípicos.

Os tumores neuroendócrinos normalmente podem ser diagnosticados com microscopia óptica. A coloração imunohistoquímica de neuropeptídeos (por exemplo, cromogranina CD56, sinaptofisina) pode ser útil em casos de difícil diagnóstico.

## 2.2 Aspectos Epidemiológicos

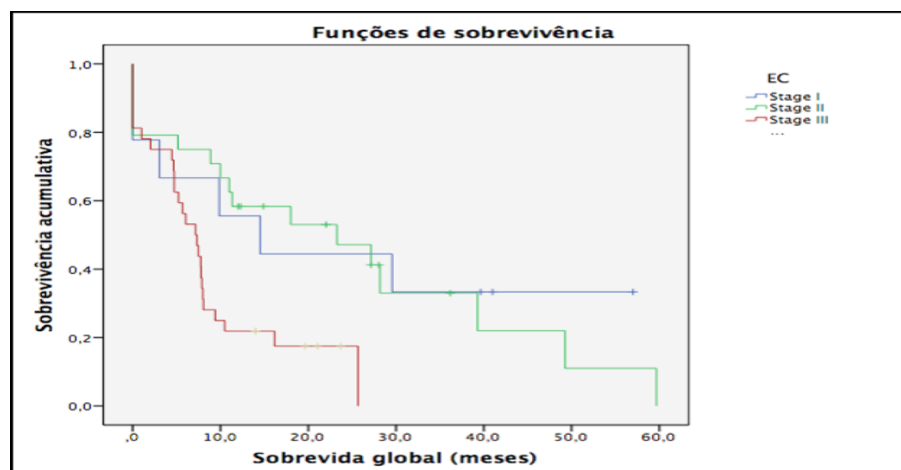
A neoplasia de pulmão teve incidência mundial de cerca de 1,8 milhões de casos e causou um número estimado de 1,6 milhões de mortes em 2012 (6). Nos Estados Unidos, o câncer de pulmão lidera na incidência e mortalidade relacionada ao câncer em ambos os sexos (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição de casos de câncer de pulmão por sexo. Adaptação OMS 2012 (Retirado de DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology 10ª edição).

A mortalidade é assombrosa, sendo que a doença é responsável por quase um terço de todas as mortes por câncer nos Estados Unidos e causa tantas mortes por câncer quanto as quatro principais causas de morte por câncer combinadas (mama, cólon, próstata e pâncreas). A sobrevivência global em todos os estágios em 5 anos é de 16 por cento (7). A mortalidade é influenciada pelo estadiamento, como evidenciado em séries prospectivas e verificado no Brasil em séries retrospectivas (8,9) (Figura6).

O câncer de pulmão tem forte associação com o tabagismo, com estudos evidenciando risco atribuível na população de cerca de 70-80 por cento (8). Porém existem estudos americanos mostrando que cerca da metade das pessoas diagnosticadas com câncer de pulmão são não fumantes ou pessoas que cessaram o tabagismo décadas antes do diagnóstico (9).



**Figura 6.** Mortalidade do carcinoma brônquico por estágio (Leal, MH et al em pôster apresentado no 17<sup>a</sup> Congresso Mundial de Câncer de Pulmão – *IASLC*)

A taxa de incidência e mortalidade global para o câncer de pulmão aumentou constantemente desde a década de 30 até o pico no início dos anos 90. Entre os homens, o câncer de pulmão é o mais comumente diagnosticado e principal causa de morte por câncer. Entre as mulheres em todo o mundo, é o quarto câncer mais comumente diagnosticado e varia entre a primeira e segunda posição como mais mortal a depender da população estudada.

A exposição ao radônio é considerada o segundo fator de risco principal nos Estados Unidos (10). Outros fatores de risco conhecidos incluem a exposição a carcinógenos ocupacionais e ambientais como amianto, arsênio e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

### 2.3 A biologia molecular no câncer de pulmão

A origem do câncer de pulmão é um processo de transição de epitélio brônquico normal para câncer de pulmão evidente. Vários eventos moleculares resultando em ganho ou perda de função causam desregulação nas principais vias genéticas envolvidas na proliferação celular, diferenciação, apoptose, migração e invasão (11). As mutações e a translocação, deleção ou amplificação de porções maiores de material genético podem resultar de fatores ambientais e hereditários.

Uma série de alterações distintas precedem a neoplasia maligna propriamente dita. Acredita-se que a displasia e o carcinoma in situ representam alterações pré-neoplásicas. As células pré-neoplásicas contêm várias anormalidades genéticas idênticas a algumas anormalidades encontradas nas células de câncer de pulmão (12). Para carcinomas de células escamosas, por exemplo, uma análise imunohistoquímica confirmou a expressão anormal de

protoncogenes (ciclina D) e genes de supressão tumoral (TSGs) (13). A alelotipagem de focos pré-neoplásicos mostra a perda do alelo 3p sugerindo que um ou mais TSGs podem atuar como fatores de proteção (14).

Nos últimos anos aumentou o conhecimento molecular da doença. Muitos genes estão envolvidos na origem do carcinoma brônquico e têm sido estudados para fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos.

Os biomarcadores mais úteis para prever a eficácia da terapia direcionada em NSCLC avançado são as alterações somáticas do genoma conhecidas como "mutações driver". Estas mutações ocorrem em genes que codificam proteínas críticas para o crescimento celular e sobrevivência. As mutações condutoras transmitem frequentemente uma biologia dependente de oncogene à célula transformada, o que significa que a proteína mutada gera dependência dentro da célula para receber um sinal do condutor para sobreviver.

Discutiremos resumidamente os mecanismos moleculares associados ao câncer de pulmão mais estudados atualmente.

### **2.3.1 A associação dos genes de reparo do DNA e instabilidade cromossômica**

As células de câncer de pulmão exibem instabilidade cromossômica. A perda de alelos no cromossomo 3p é considerada como uma das mais precoces mudanças genéticas ocorrendo tanto no NSCLC quanto no SCLC (15). Além disso, podem ocorrer translocações não recorrentes e perdas recorrentes envolvendo 1p, 4p, 4q, 5q, 6p6q, 8p, 9p, 11p, 13q, 17p, 18q e 22q, representando alterações nos genes supressores tumorais (TSGs) (16). Também ocorrem ampliações de genes que envolvem protoncogenes, como o receptor do fator de crescimento epitelial (*EGFR*) e o *myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*) (17).

Foram identificadas alterações em outros genes de reparo do DNA, incluindo *BRCA1* e *BRCA2*, proteínas que estão envolvidas no processo de reparo de recombinação homóloga especialmente para quebras de dupla cadeia, bem como ATR, que funciona na detecção e ativação do reparo do DNA em resposta a rupturas de DNA de cadeia simples (18). Além disso, há evidências crescentes de que os genes de remodelação da cromatina são altamente mutados no câncer de pulmão. Especificamente, tem sido recentemente demonstrado que as alterações em *MLL2*, *MLL3*, *MLL4* agrupam-se, juntamente com mutações em *SMARCA4* (19).

Talvez o mecanismo de vigilância tumoral mais importante esteja na resposta ao dano do DNA e no reparo de erros na replicação do DNA (20). Mutações na DNA glicosilase-8-oxo-guanina (OGG1) e polimorfismos em outros genes de reparo do DNA incluindo *ERCC1*, *XRCC1*, *ERCC5 / XPG* e *MGMT / AGT* têm sido correlacionados com uma redução da formação de hidrocarbonetos poliaromáticos de DNA, bem como menores riscos de câncer de pulmão em estudos de caso-controle. Além disso, a expressão elevada de *ERCC1* está associada com uma diminuição da resposta à quimioterapia à base de platina e a superexpressão de *ERCC1* correlaciona-se com um melhor prognóstico global no NSCLC (21), refletindo um melhor reparo de danos letais ao DNA por platina. Os níveis elevados da proteína MSH2 de reparo incompatível também têm se mostrado associados à baixa sobrevida com cisplatina e podem aumentar o significado preditivo da expressão de *ERCC1*(22). Os estudos clínicos prospectivos que investigam a terapia guiada por biomarcadores *ERCC1* e *RRM1* estão atualmente em andamento.

### **2.3.2 Tópicos em mutações, translocações e amplificações**

Os avanços no entendimento da neoplasia brônquica têm levado à descoberta de novos oncogenes ativados por mutações, translocações ou amplificação de genes. Estas alterações ocorrem em genes que codificam receptores ou proteínas intracelulares cruciais para o crescimento, proliferação e sobrevivência celular, conduzindo à formação e manutenção do tumor.

#### **2.3.2.1 Receptores de tirosina cinase**

As mutações na tirosina cinase do receptor do fator de crescimento epitelial (*EGFR*) são observadas em aproximadamente 15 por cento dos adenocarcinomas de pulmão e ocorrem com maior frequência em não-fumantes. Em populações asiáticas, a incidência de mutações de *EGFR* é mais alta, chegando a até 62 por cento (23).

A substituição de leucina a arginina na posição 858 (L858R) no exon 21 e deleções curtas na estrutura no exon 19 são as mutações sensibilizantes mais comuns, compreendendo aproximadamente 90% dos casos. As mutações de *EGFR* são ambas prognósticas para uma maior sobrevida independentemente da terapia e preditivas de resposta aos inibidores de tirosina cinase (TKIs)

*ERBB2* (antigo HER2) é um membro da família de receptores erbB, como o EGFR. É superexpressa em cerca de 20% de NSCLCs e amplificada em 2% a 4% dos casos (24). As mutações de *ERBB2* foram identificadas em aproximadamente 2% de NSCLCs. Uma

metanálise sugeriu que a super-expressão de *ERBB2* é um indicador de pior sobrevida no adenocarcinoma de pulmão (25).

### 2.3.2.2 Translocações gênicas

As translocações envolvendo a linfoma cinase anaplásica (ALK) tirosina cinase estão presentes em aproximadamente 4 por cento dos adenocarcinomas e ocorrem com maior frequência em não fumantes jovens (26).

No NSCLC avançado, a presença de uma translocação de ALK prevê fortemente a sensibilidade aos TKIs de *ALK* e o tratamento com estes agentes prolonga significativamente a sobrevida livre de progressão.

Recentemente foram descritas translocações RET e ROS1, ambas com potencial significado e clínico e possível melhor resposta a agentes terapêuticos dirigidos (27).

### 2.3.2.3 Alterações nas sinalizações intracelulares

Como proteínas efetoras são necessárias para a transdução intracelular de fatores de crescimento ou sinais receptores, as proteínas de importância em cascatas de transdução de sinal citoplasmático também estão implicadas na carcinogênese.

A família de genes *RAS* - em particular, *KRAS* - pode ser ativada por mutações pontuais nos codons 12 ou 13 no exon 2 em aproximadamente 20% a 30% dos NSCLC. As mutações de *KRAS* ocorrem mais comumente em pacientes com histórico significativo de tabagismo e histologia de adenocarcinoma (28). Em uma meta-análise de 3.779 pacientes com câncer de pulmão, o *KRAS* mutante foi correlacionado a um pior prognóstico na histologia do adenocarcinoma, mas esse vínculo não foi confirmado em um estudo prospectivo (29). O mau prognóstico pode estar relacionado ao fato de que as mutações *KRAS* raramente ocorrem com mutações de *EGFR*, e os tumores mutantes de *EGFR* têm um melhor prognóstico do que o *EGFR* de tipo selvagem.

Embora a oncogenicidade de *KRAS* aberrante esteja bem estabelecida, ainda não existem agentes terapêuticos com melhora clínica determinante.

Outra estratégia tem sido avaliar *downstream regulators* de *RAS*, como as proteínas da família *RAF* e *MEK*. Por exemplo, o sorafenib - um inibidor de cinase de amplo espectro incluindo a família *RAF* - conduziu a uma taxa de controle de doença de 79% entre pacientes com mutações *KRAS* ou *BRAF* e a adição de selumetinib (AZD6244), um inibidor de MEK1 / 2, ao docetaxel melhorou significativamente risco relativo e sobrevida livre de progressão (30).



## 2.4 Considerações sobre o diagnóstico, estadiamento e tratamento do carcinoma brônquico

O estadiamento do carcinoma brônquico é de extrema importância prognóstica e especialmente para o desenvolvimento de um plano terapêutico.

### 2.4.1 Considerações sobre o diagnóstico e estadiamento do carcinoma brônquico

O estadiamento do câncer de pulmão se baseia na AJCC (7) (tabela 1), a saber:

**Tabela 2** - Esquema de agrupamento do estadiamento da neoplasia do pulmão (adaptado AJCC 7-ed).

	N0	N1	N2	N3
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV

T – Tumor Primário

TX – Tumor primário não individualizado.

T0 – Sem evidência de tumor.

Tis – Carcinoma in situ.

T1 – Tumor  $\leq 3$  cm no maior diâmetro, circundado por pulmão e pleura visceral:

T1a – tumor  $\leq 2$  cm

T1b – tumor  $> 2$  cm mas  $\leq 3$  cm

T2 – Tumor  $> 2$  cm mas  $\leq 7$  cm ou qualquer destes achados: envolvimento do brônquio principal a mais de 2 cm da carina principal, invasão da pleura visceral, associação com atelectasia ou pneumonia obstrutiva sem envolvimento de todo o pulmão.

T2a – tumor  $> 3$ cm mas  $\leq 5$  cm

T2b – tumor  $> 5$ cm mas  $\leq 7$  cm

T3 – Tumor  $> 7$  cm ou que invade qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica, diafragma, nervo frênico, pleural mediastinal, pericárdio; ou tumor com menos de 2 cm da carina principal, mas sem envolvimento desta; ou se houver atelectasia ou pneumonite obstrutiva de todo pulmão; ou nódulo(s) tumoral (ais) no mesmo

lobo do tumor primário.

T4 – Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer uma das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, nervo laríngeo recorrente, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina principal; nódulo(s) tumoral (ais) isolado em outro lobo ipsilateral.

N – Linfonodos

NX – Linfonodo regional não foram avaliados.

N0 – Sem metástase em linfonodo regional.

N1 – Metástase em linfonodo peribrônquico ipsilateral e/ou hilar ipsilateral e intrapulmonares, incluindo envolvimento por extensão direta.

N2 – Metástase em linfonodo mediastinal ipsilateral e/ou subcarinal

N3 – Metástase em linfonodo mediastinal contralateral; hilar contralateral; escalênico ipsilateral ou contralateral; ou supraclavicular.

M – Metástases à distância

MX – Metástase à distância não estudada

M0 – Sem evidência de metástase à distância

M1 – Metástase à distância:

M1a – Nódulo (s) tumoral (ais) em lobo contralateral; tumor com nódulo pleural ou derrame pleural ou pericárdico maligno.

M1b – Metástase à distância (fora do tórax).

O diagnóstico do carcinoma brônquico é feito com base na avaliação patológica de espécimes citológicos (por exemplo, líquido pleural) ou histopatológicos (por exemplo, biópsia de linfonodo). O estadiamento radiográfico inicial otimiza a seleção de um local de biópsia e modalidade preferencial para obtenção de uma amostra patológica (20). Deve-se considerar a obtenção de uma amostra suficientemente grande para permitir análises imunohistoquímicas e genéticas complementares.

A avaliação clínica deve levar em conta os sintomas do paciente. Pacientes com suspeita de NSCLC devem ser submetidos a tomografia computadorizada (CT) do tórax e abdômen superior para avaliar a extensão do tumor primário e potencial disseminação para o mediastino, fígado e glândulas supra-renais. O estadiamento radiográfico não elimina a necessidade de biópsia.

A tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) se mostrou alternativa mais acurada para detecção de doença metastática (32). Entretanto, o PET permanece controverso em doença estágio IA e é discutível, para fins de estadiamento, em pacientes com doença localmente avançada não candidatos à cirurgia.

A ressonância magnética nuclear (RMN) do crânio é exame sensível para avaliação de doença cerebral metastática e está indicada inequivocamente para pacientes sintomáticos e com doença localmente avançada.

## **2.4.2 Considerações sobre o tratamento do carcinoma brônquico**

A melhor abordagem terapêutica depende de preferências do paciente, estadiamento e performance. A ideia central do tratamento é procurar determinar o melhor controle local e sistêmico da doença, considerando a toxicidade de cada intervenção associada ao contexto clínico do paciente.

### **2.4.2.1. Sobre o tratamento do carcinoma brônquico estádios I e II**

Em geral, para pacientes com estágios I e II, o tratamento da doença consiste em ressecção cirúrgica completa, com a possível adição de quimioterapia adjuvante (33).

Paciente com câncer do pulmão pode ser "ressecável" em virtude de ter um NSCLC cirurgicamente removível, mas pode não ser "operável" devido a má função pulmonar ou comorbidades.

A quimioterapia adjuvante pós-operatória melhora a sobrevida em pacientes com doença patológica estágio II e pode ter um papel para pacientes com doença no estágio IB. Em pacientes com doença clínica I ou II, em que o comprometimento tumoral de linfonodos mediastinais (estádio patológico IIIA) é documentado na avaliação histológica da amostra de ressecção cirúrgica, a quimioterapia adjuvante demonstrou melhorar a sobrevida.

Pacientes com doença de estágio I ou II que não são candidatos à ressecção cirúrgica ou que recusam cirurgia podem ser candidatos a tratamento local não cirúrgico. A radioterapia pode ser aplicada por técnicas estereotáticas (34) ou por métodos convencionais. A ablação por radiofrequência (RFA) e a crioablação são alternativas à radioterapia.

### **2.4.2.2 Do tratamento do carcinoma brônquico estágio III**

Para pacientes em estágio III, existe significativa controvérsia quanto ao melhor manejo, em parte justificada pela população heterogênea de pacientes assim estadiados. Para pacientes selecionados com doença IIIA, candidatos à ressecção cirúrgica, quimioterapia adjuvante mostrou benefício em sobrevida (35).

Para os pacientes com doença irressecável ou inoperável, a abordagem padrão é tratamento combinado (de forma concomitante para pacientes aptos ou sequencial para pacientes com pior *performance status*).

A adição de quimioterapia ou tratamento combinado com cirurgia (como parte de plano terapêutico integrado) para pacientes estágio III foi testada em ensaios clínicos, porém os resultados não foram animadores (36).

O papel e a evolução da radioterapia nos estádios iniciais e, especialmente, em doença localmente avançada será detalhado em capítulo subsequente.

#### **2.4.2.3 Do tratamento do carcinoma brônquico estágio IV**

Cerca de 50 por cento dos pacientes apresentam evidência de disseminação hematogênica no momento do diagnóstico (6). Para pacientes com estágio IV o tratamento sistêmico (por exemplo, quimioterapia) é a abordagem de tratamento inicial padrão. Em casos de pacientes estágio IV que necessitem de controle local de doença, a radioterapia pode ser associada no plano terapêutico.

Discute-se a abordagem radical do tumor primário em pacientes com doença oligometastática, entretanto não existem dados suficientemente maduros para tornar essa uma abordagem padrão, além de haver alguma divergência em relação à definição da doença oligometastática (37).

### **2.5 O papel e a evolução da radioterapia no tratamento do carcinoma de pulmão**

Como já se viu, a radioterapia pode ser modalidade terapêutica no câncer de pulmão em todos os estádios. Resumiremos as bases terapêuticas moleculares da radioterapia e conceitos de radiobiologia:

#### **2.5.1 Conceitos sobre radiobiologia**

Após interação das radiações ionizantes com as células, alterações celulares e moleculares ocorrem, sendo o DNA um dos alvos preferenciais do dano radio-induzido. A resposta à radioterapia é diferente para os diferentes tecidos dependendo principalmente da capacidade de reparo própria de cada tecido e do tumor (38).

As radiações podem ser classificadas em não ionizantes e ionizantes. As radiações não ionizantes não possuem energia suficiente para realizar ionização de átomos biologicamente importantes. As radiações ionizantes promovem ionização dos elétrons, sendo as que possuem utilidade terapêutica prática.

As radiações ionizantes podem interagir diretamente com componentes celulares, como DNA, provocando alterações estruturais. É o chamado efeito direto e constitui cerca de

30% do efeito biológico das radiações mais utilizadas na prática clínica. Podem também interagir com o meio celular (citoplasma) produzindo radicais livres. Neste caso ocorre o efeito indireto (39).

O principal radical livre formado na radiólise da água é o hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). A recombinação dos radicais livres leva à formação de outros componentes como o peróxido de hidrogênio, que têm efeitos citotóxicos sobre o DNA (40). Entre as alterações rádio-induzidas, as quebras duplas do DNA são as mais prejudiciais podendo levar as células à morte.

Quebras e rearranjos cromossômicos podem ser induzidos pela radiação. Podem ocorrer fragmentos acêntricos, dicêntricos e anéis por exemplo (41).

Logo após irradiação, o sistema de transdução mediado pela proteína cinase C (PKC) e pela tirosina cinase é estimulado. Isto leva à indução de genes como o c-fos, c-jun. Esses genes de resposta rápida levam à cascata de ativação de genes, transcrição e síntese de proteínas em resposta à radiação, implicando funções chaves que permitem à célula sobreviver após irradiação. O efeito da radioterapia predomina em determinadas fases do ciclo celular, como mitose (*M*), sendo menor em fases como síntese (*S*), entre outros motivos em função da duplicidade do conteúdo informacional (42).

A morte celular rádio-induzida pode ser dividida em morte clonogênica e apoptótica. A morte clonogênica se caracteriza pela perda da capacidade de divisão celular. Entre as células que são resistentes à apoptose predominará morte por necrose, já aquelas que são suscetíveis à apoptose podem morrer por necrose ou apoptose dependendo da dose de radiação (43).

A apoptose é um mecanismo de morte celular ativo, que ocorre em situações fisiológicas em oposição à mitose. No mecanismo de morte celular estão envolvidos protoncogenes como o bcl-2 e genes supressores de tumores como o p53. De forma simplificada, um importante mecanismo pelo qual a radiação induz apoptose, é através das quebras simples e duplas no DNA, indução da proteína p53 que atua como fator de transcrição e induz proteínas como a bax, desencadeando assim o processo (44). Os fatores de crescimento e o sistema de transdução, como a proteína cinase C (PKC) e proteína cinase A (PKA) também são importantes na modulação do processo.

A avaliação da resposta celular à radioterapia pode ser aferida através de curvas de sobrevivência celular, as quais descrevem o número de células sobreviventes no meio analisado em função de exposições a doses progressivas de radiação ionizante (Figura 7).

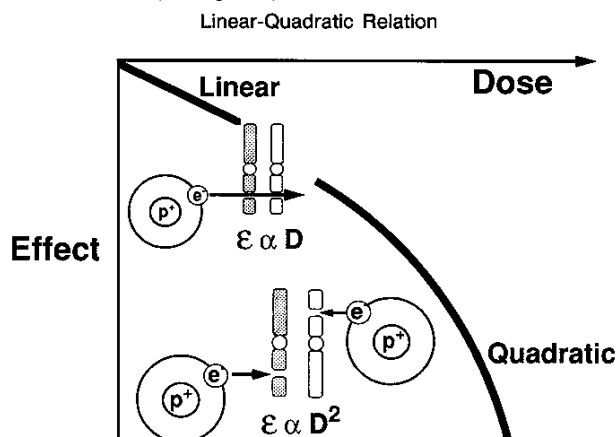
### 2.5.1.1 Reparo da lesão subletal (RLSL)

Significa o retorno aos níveis iniciais de sensibilidade nas células que sobrevivem à radiação.

O RLSL foi demonstrado por Elkind e Sutton em 1959, que verificaram que quando metade de uma dose alta é administrada e espera-se um tempo antes da segunda metade da dose, o ombro da curva de sobrevida se repete.

O RLSL no modelo de impactos únicos e múltiplos relaciona-se com o reparo dos alvos lesados entre as doses de radiação (45).

O reparo constitui uma das bases racionais da radioterapia. Além do reparo o tratamento com radioterapia se baseia na reoxigenação, que permite que o tumor se reoxigene e se torne mais radiosensível, a redistribuição para fases mais radiosensíveis do ciclo celular e a repopulação do tecido normal (desejada).



**Figura 7.** Curva de sobrevida celular. (Retirado de Hall EJ: Radiobiology for the Radiologist, ed 4. Philadelphia, JB Lippincott, 1994).

### 2.5.2 Revisão do papel da radioterapia no controle local e sobrevida na neoplasia brônquica

Apesar dos avanços técnicos no tratamento com radioterapia, os resultados do continuam pobres, tanto em sobrevida global (OS) quanto controle local (LC).

O estudo RTOG 73-01 definiu a dose de 60 Grays (Gy) em 30 frações, com sobrevida de 19% em 2 anos (46). A taxa de resposta radiográfica foi de aproximadamente 60%, falha local dentro do campo de radiação, cerca de 25%, e as taxas de metástases distantes foram de 15% e 35% em 6 e 12 meses, respectivamente.

Usando técnicas modernas, a radioterapia atual consegue aplicar uma prescrição de dose uniforme de cerca de 60 Gy e gera taxas de controle local de menos de 50% (47). Após

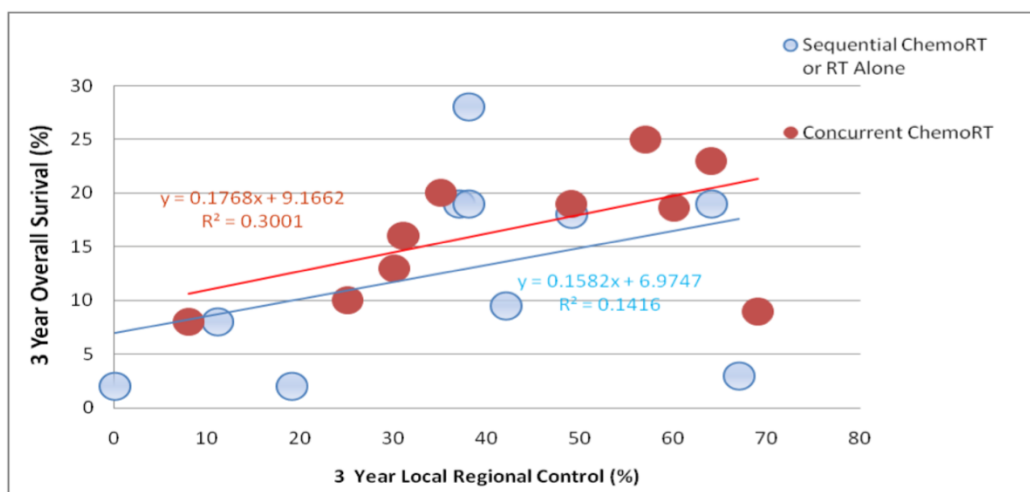
RT com ou sem quimioterapia adjunta, um estudo da Universidade de Michigan relatou falha local final em 70% dos pacientes (48).

Le Chevalier conduziu estudo com avaliação por broncoscopia e biópsia um ano após o término do tratamento revelou taxas de controle local patológico de apenas 15% -17% após 65 Gy (49). Após quimiorradiação com doses de RT de 60 Gy em frações diárias de 2 Gy ou de 69,6 Gy em 1,2 Gy duas vezes por dia, uma análise secundária de 11 ensaios clínicos do RTOG em 1.356 pacientes relatou OS em 2 e 5 anos de 38% e 15%, com taxas de falha local-regional de 2 anos e 5 anos de 46% e 52%, respectivamente. (50)

A doença local-regional não só leva à morte devido a efeitos locais, mas também pode servir como fonte de disseminação metastática. Em pacientes com doença localmente avançada, Arriagada e colaboradores. (51) concluíram que a principal causa de falha é a local, e a progressão ou recidiva local correlacionou-se com pior sobrevida.

No estudo CHART, as taxas de controle local de 20% e 29% foram associadas com sobrevidas medianas (MS) de 9,9 meses e 27,9 meses, respectivamente (44). Num estudo EORTC, Schaake-Koning e colaboradores (52) demonstraram uma correlação semelhante entre LC e OS.

A importante meta-análise da Dra. Auperin evidencia superioridade do tratamento combinado concomitante quando comparado com o sequencial (53) e, além disso, ratifica a importância do LC na OS de pacientes submetidos à radioquimioterapia (Figura 8).



**Figura 8.** Associação entre controle local e sobrevida global (Retirado de Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 28(13):2181-90, 2010)

Paradoxalmente, o estudo que tentou escalonar dose de radioterapia falhou em melhorar OS ou LC com dose de 74 Gy (54). Ainda assim, os resultados do braço controle (que recebeu 60 Gy em fracionamento convencional) foram surpreendentemente bons, com LC de 69% em 2 anos, o que pode refletir um impacto da melhora das técnicas de radioterapia.

Calcula-se que a adição de quimioterapia melhorou a sobrevida mediana em 1.7 meses e trouxe um benefício absoluto em sobrevida de cerca de 3% (55), porém o incremento de novas drogas no regime de radioquimioterapia não tem sido bem-sucedido (56). Abaixo discutimos a associação de radioterapia com tratamentos sistêmicos.

### **2.5.3 A associação do tratamento sistêmico na abordagem da neoplasia de pulmão**

A otimização dos regimes de quimioterapia, o uso de novos agentes quimioterápicos e a combinação com terapia dirigida tem gerado expectativa em relação a conseguir melhores resultados no tratamento da neoplasia brônquica.

#### **2.5.3.1 Quimioterapia**

Os protocolos de radioquimioterapia atuais incluem genericamente três categorias:

- a) RT com doses completas combinada à quimioterapia de antiga geração, tal como cisplatina-etoposide e cisplatina-vinorelbina (57)
- b) RT com doses reduzidas, combinada com quimioterapia de nova geração, como regime de paclitaxel-carboplatina (58)
- c) RT com quimioterapia diária ou semanal de baixa dose, como cisplatina ou carboplatina (59)

Infelizmente, tem havido poucos estudos de fase III publicados para comparar diretamente diferentes regimes de quimioterapia com RT e estabelecer um protocolo de padrão.

#### **2.5.3.2 Radioquimioterapia com anticorpos monoclonais de EGFR**

Pelo menos um ensaio de fase II investigou cetuximab, carboplatina e paclitaxel semanalmente concomitantemente com RT na dose de 63 Gy (60). A MS observada foi promissora (22,7 Meses, IC 95%: 15,3-30,4 meses), proporcionando a razão para estudar este regime em um estudo de fase III. O estudo CALGB 30407 investigou cetuximab concomitantemente com RT seguido de um único agente. A MS foi de 22 meses.



### 2.5.3.3 Radioquimioterapia com inibidores de tirosina cinase

Num estudo de fase I, pacientes não selecionados para mutação foram tratados utilizando erlotinib e radioquimioterapia. A adição de erlotinib à radioquimioterapia foi bem tolerada, contudo a MS foi decepcionante (60). O ensaio de fase II do CALGB 30106 avaliou a adição de gefitinib concomitantemente com tratamento combinado radical em pacientes com NSCLC estágio III (61). Em resumo, todos estes ensaios fase I-II estabeleceram tolerabilidade de radioterapia com TKIs. Entretanto, parece que a combinação em população não selecionada provavelmente esteja implicada nos resultados discretos. A presença de mutações no gene EGFR poderia prever a resposta à terapia dirigida a EGFR-TKI.

Atualmente existe pelo menos um protocolo de pesquisa aberto pelo RTOG investigando a associação de terapias alvo com radioterapia em pacientes com mutações selecionadas (62).

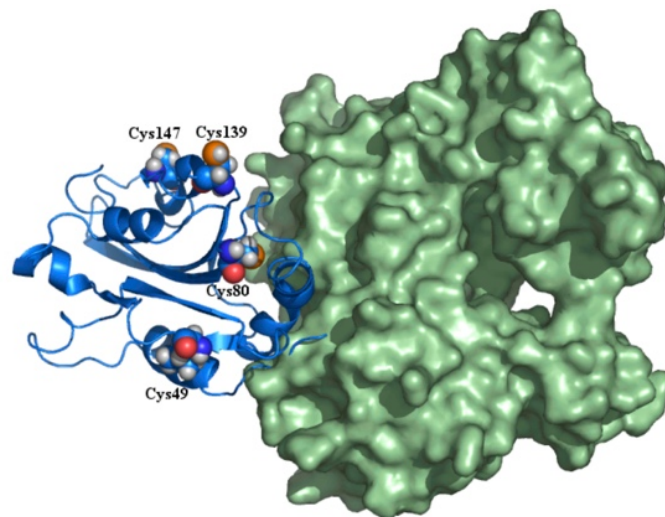
## 2.6 Cofilina-1: definição e papel como biomarcador

A cofilina-1 (*CFL1*) é uma isoforma primária não muscular da família de proteínas ADF / Cofilina, que age acelerando o turnover da actina *in vitro* e *in vivo*.

### 2.6.1 Fisiologia e dinâmica da cofilina-1

A *CFL1* regula a remodelação dos filamentos de actina e é um mediador da dinâmica do citoesqueleto (63). A proteína tem uma ampla distribuição tecidual, sendo encontrada no cérebro e linfócitos por exemplo. Trata-se de uma proteína globular de 15-21 kDa com um núcleo constituído por folhas beta rodeadas por quatro ou cinco hélices alfa.

A *CFL1* pode existir como monômero ou oligômero, devido à presença de quatro resíduos de cisteína (Cys 39, Cys 80, Cys 139 e Cys 147) que são alvos potenciais para a oxidação (Figura 9). Este processo pode levar à formação de ligações dissulfeto, causando alterações conformacionais na cofilina-1 (64). Além da dinâmica da actina, a *CFL1* também está envolvida em vários processos patológicos.



**Figura 9.** Estrutura da cofilina-1 (azul), destacando a presença dos quatro resíduos de cisteína e sua interação com a actina monomérica (verde). (Cedido pelo Prof. Dr. Hugo Verli / UFRGS).

A cofilina-1 apresenta meios complexos de regulação, que podem determinar inativação e ativação, bem como a alterações na afinidade de ligação à actina.

Existem mecanismos descritos:

- a) fosforilação,
- b) aumento do pH e ligação do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>),
- c) oxidação.

A actina pode estar presente como um monômero (G-actina) ou como parte de um microfilamento de polímero (F-actina). Fisiologicamente, a F-actina cresce numa extremidade através da associação da molécula de G-actina com ATP. Os monômeros sofrem dissociação via hidrólise do ATP ligado ao ADP. Para entrar em um novo ciclo de polimerização, a actina carregada com ADP precisa trocar ADP por ATP. A cofilina-1 controla a dinâmica da actina ligando-se tanto à F-actina como à G-actina. Dependendo da sua concentração, a cofilina 1 pode promover a polimerização ou depolimerização de filamentos de actina (63). Quando apenas algumas moléculas de cofilina-1 estão ligadas à F-actina ocorre a quebra do filamento. Por outro lado, quando a concentração de cofilina-1 é elevada o filamento permanece intacto. Neste caso, há dissociação das extremidades do micro-filamento. Esses três fatores também podem agir em conjunto (63). Além disso, a concentração muito elevada de cofilina-1 pode determinar maior formação da actina. O mecanismo mais bem caracterizado da regulação da cofilina-1 é a fosforilação Ser-3 por *LIMK* (1 e 2) ou TES cinases (TESK) (64). A fosforilação

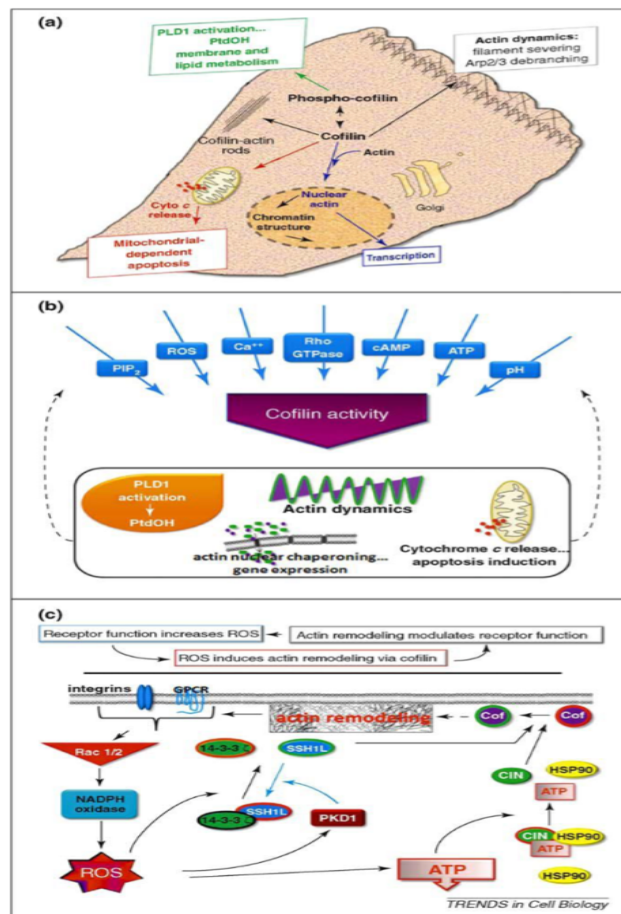
de *CFLI* resulta na inativação da proteína e subsequente eliminação da sua função de ligação à actina. A fosforilação de *CFLI* também pode ser mediada por enzimas que regulam atividade de *LIMK*, como vias de GTPases-PAK de Rho / Rac (65).

O estresse oxidativo também pode mediar a regulação da dinâmica da actina. A *CFLI* oxidada é incapaz de regular a dinâmica. Assim, embora a *CFLI* desfosforilada seja capaz de se ligar à F-actina, a *CFLI* oxidada determina sua inativação (66). Estudos estabeleceram o papel da *CFLI* na apoptose induzida por oxidação em células tumorais (67). Quando oxidada a *CFLI* transloca-se nas mitocôndrias onde induz a liberação de citocromo c por mediação da permeabilidade transitória (PTP). O *knockdown* da *CFLI* endógena inibe a apoptose induzida por oxidação, que é restaurada pela expressão de *CFLI* de tipo selvagem, mas não por mutações específicas contendo formas não oxidáveis da *CFLI*. Esses dados sugerem que a *CFLI* oxidada medeia a disfunção mitocondrial e a apoptose induzida por oxidantes em células tumorais.

Resumindo, a dinâmica de actina desempenha um papel no controle da morfologia, migração e divisão celular, endocitose, transporte intracelular e desenvolvimento neuronal, sendo uma proteína chave em sistemas biológicos.

### **2.6.2 A cofilina-1 no câncer**

Os mecanismos da disseminação do câncer envolvem capacidades celulares importantes (migração, mobilidade e quimiotaxia por exemplo). A *CFLI*, como já visto, desempenha papel importante em várias dessas funções celulares. A figura 10 evidencia algumas dessas funções



**Figura 10.** Diversas funções celulares da cofilina-1. (a) diagrama mostrando funções celulares da cofilina-1 (cof). (b) Fatores que regulam a atividade da cofilina-1 e fosfo-cofilina. (c) Um exemplo de regulação homeostática de feedback no ciclo do estresse oxidativo. (Retirado de Bernstein & Bamburg, 2010).

Essa importância, além do papel na apoptose induzida pelo stress oxidativo, despertou interesse para utilização da *CFL1* como biomarcador (68). Além disso, a *CFL1* tem sido associada à resistência à quimioterapia, principalmente em relação a drogas alquilantes (69).

Estudos *in vitro* tem relacionado a expressão aumentada de *CFL1* com maior capacidade de migração e metastatização. Existem estudos demonstrando relação entre maior agressividade tumoral com altas expressões de cofilina-1, com resultados semelhantes em diferentes tumores estudados (70). Como resultado, os níveis de expressão de cofilina-1 podem ser uma ferramenta útil para discriminar entre tumores de agressividade alta e baixa. (69).

Embora a agressividade do tumor e seu potencial para gerar metástases sejam características tumorais muito importantes, a quimiorresistência também é um problema importante no contexto clínico. Pelo menos um estudo em câncer de pulmão e tentou correlacionar a expressão de cofilina-1 e a resistência à quimioterapia (71).

### **2.7 A associação entre *CFL1* e radioterapia**

O papel da cofilina-1 como marcador de resposta à radioterapia tem despertado interesse nos últimos anos.

Em 2005, Keng e colaboradores publicaram um estudo mostrando maior radiosensibilidade em células H1299 (NSCLC), possivelmente pela menor capacidade de reparo a quebras duplas no DNA. Essa hipótese foi reavaliada em estudo posterior que avaliou o papel tanto da perda do instrumentário de reparo do DNA quanto da fosforilação da *CFL1* na radiosensibilidade. O estudo concluiu que a superexpressão da *CFL1* está associada a menor reparo de quebras duplas do DNA e que a fosforilação pode estar envolvida (72).

De fato, como já revisamos, os danos ao DNA (inclusive os radio-induzidos) podem induzir reorganização da actina, o que influencia a apoptose e ciclo celular subsequentemente. Por exemplo, já se evidenciou que ocorre indução de polimerização transitória de actina e posterior despolimerização em células HL-60 com irradiação ultravioleta (UV) (73).

A polimerização de actina induzida por danos no DNA também está associada à p53. O LIMK2b é induzido por p53 para modular a dinâmica de actina para executar o *arrestment* G2 / M através da fosforilação de *CFL1* após danos no DNA (66). Por outro lado, a transação mediada por p53 de RhoC-LIMK2 conduz à inativação de *CFL1*, que reduz a despolimerização de actina e conduz a um aumento de fibras de actina. Sob esta condição, a formação de citoesqueleto de actina promove a sobrevivência celular, o que seria temerário para fins terapêuticos (74).

Por outro lado, a polimerização de actina induzida por danos no DNA também regula negativamente a função p53 pela localização da p53 no citoplasma (75). Este efeito pode retardar processos apoptóticos mediados pela p53 e permitir que o reparo do DNA seja processado antes da apoptose. De fato, tem sido relatado que a actina polimerizada é necessária para o reparo de quebras duplas do DNA (76).

Uma vez que o dano do DNA promove a polimerização da actina para respostas biológicas subsequentes, especula-se que a desestabilização do citoesqueleto da actina influenciará o reparo celular (76).

Não está claro se a atividade da p53 induzida por dano no DNA é o efeito primário ou secundário à perturbação dos filamentos da actina. Por outro lado, a interrupção dos filamentos de actina pela citocalasina B (CB) e latrunculina B (LB) pode induzir o regulador do ciclo celular p21CIP1/WAF em células sem atividade da p53 (77).

Os efeitos da cofilina-1 na reparação do DNA e na radiosensibilidade foram previamente estabelecidos. A expressão excessiva de cofilina-1 mutante S3A e S3D de tipo selvagem conduz a maior radiosensibilidade, porém o inibidor de cinase ativada por  $\rho$  (ROCK) Y27632 não aumenta a radiosensibilidade das células tratadas (78). O inibidor de actina LA pode induzir fosforilação de cofilina-1 e radiosensibilidade aumentada que está associada com a redução formação de  $\gamma$ -H2AX(79).

Paralelamente, a avaliação da radioresistência em astrocitomas apontou que a cofilina-1 seria uma das proteínas expressadas nos tumores radioresistentes. Um interessante estudo de 2015 avaliou a associação entre radioresistência em células humanas de glioma U251 e *CFL1*. O estudo mostrou que a expressão da *CFL1* estava associada tanto à radioresistência quanto a viabilidade celular, invasão e migração (80).

Concluindo, a associação de *CFL1* e reparo do dano no DNA por radiação pode ser dependente de células ou tecidos. A manutenção de estudos experimentais com irradiação de culturas de células deve ajudar a esclarecer a associação. Embora os dados *in vitro* sejam promissores, nenhum estudo avaliou a relevância clínica do papel da cofilina-1 na resposta à radiação até o presente momento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Visto a relevância do estudo da neoplasia de pulmão e a possível correlação entre resultado do tratamento e a proteína cofilina-1, este trabalho foi elaborado com o objetivo de validar possível papel preditor da *CFL1* na resposta à radioterapia.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) avaliar se a expressão da proteína cofilina-1 está associada com sobrevida global em pacientes com câncer de pulmão tratados com radioterapia,
- b) avaliar se a expressão da proteína cofilina-1 está associada com controle local radiologicamente e clinicamente mensurado em pacientes com câncer de pulmão tratados com radioterapia,
- c) avaliar se a proteína cofilina-1 se associa com outros fatores prognósticos nesta coorte.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. Goldstraw P.; Crowley J.; Chansky K.; Giroux D.; Groome P.A.; Rami-Porta R.; Postmus P.E.; Rusch V.; Sobin L.; **The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours., International Association for the Study of Lung Cancer** International Staging Committee, Participating Institutions J Thorac Oncol. 2007;2(8):706.
2. Brambilla E, Travis WD, Stewart BW, Wild CP Lung cancer. **World Cancer Report, (4 Eds)**, World Health Organization, Lyon 2014
3. Janssen-Heijnen ML et al. **Is there a common etiology for the rising incidence of and decreasing survival with adenocarcinoma of the lung?** Epidemiology 2001; 12:256.
4. Kish JK, Ro JY, Ayala AG, McMurtrey MJ. **Primary mucinous adenocarcinoma of the lung with signet-ring cells: a histochemical comparison with signet-ring cell carcinomas of other sites.** Hum Pathol 1989; 20:1097.
5. Cooke DT, Nguyen DV, Yang Y, et al. **Survival comparison of adenosquamous, squamous cell, and adenocarcinoma of the lung after lobectomy.** Ann Thorac Surg 2010; 90:943.
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. **Cancer statistics, 2010.** CA Cancer J Clin 2010; 60(5):277–300.
7. Edge SB, **American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 7th ed.** New York: Springer, 2010.
8. Sierra, M. S., et al. **Cancer patterns and trends in Central and South America.** Cancer Epidemiol 44 Suppl 1: S23-S42.
9. Leal MH, Branco M, Coelho JC, Klamt, F. **Definitive Radiotherapy and Survival in Lung Cancer: Results from a Brazillian Cohort Study.** Poster Presentation 17<sup>a</sup> WLCL.



10. Ezzati M, Henley SJ, Lopez AD, et al. **Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs.** *Int J Cancer* 2005;116(6):963–971.
11. Tong L, Spitz MR, Fueger JJ, et al. **Lung carcinoma in former smokers.** *Cancer* 1996;78:1004–1010.
12. **Health effects of radon exposure. Report of the Council on Scientific Affairs, American Medical Association.** *Arch Intern Med* 1991;151(4):674–677.
13. Lonardo F, Rusch V, Langenfeld J, et al. **Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development.** *Cancer Res* 1999;59:2470–2476.
14. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. **High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints.** *Cancer Res* 2000;60:1949–1960.
15. Virmani AK, Gazdar AF. **Tumor suppressor genes in lung cancer.** *Methods Mol Biol* 2003;222:97–115.
16. Testa JR, Siegfried JM. **Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer.** *Cancer Res* 1992;52:2702s–2706s.
17. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. **Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma.** *Nature* 2008;455:1069–1075.
18. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. **Mutational landscape and significance across 12 major cancer types.** *Nature* 2013;502:333–339.
19. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 2012;150:1107–1120.
20. Klein G, Klein E. **Surveillance against tumors—is it mainly immunological?** *Immunol Lett* 2005;100:29–33.

21. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. **DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy.** *N Engl J Med* 2006;355:983–991.
22. Kamal NS, Soria JC, Mendiboure J, et al. **MutS homologue 2 and the long-term benefit of adjuvant chemotherapy in lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2010;16:1206–1215.
23. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, et al. **A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER).** *J Thorac Oncol* 2014; 9:154.
24. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, et al. **Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas.** *Clin Cancer Res* 2012;18:4910–4918.
25. Liu L, Shao X, Gao W, et al. **The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data.** *J Thorac Oncol* 2010;5:1922–1932.
26. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. **EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2008;14:4275–4283.
27. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. **RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer.** *Nat Med* 2012;18:378–381.
28. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. **Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung.** *Cancer* 2001;92:1525–1530.
29. Mascaux C, Iannino N, Martin B, et al. **The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis.** *Br J Cancer* 2005;92:131–139.
30. Jänne PA, Shaw AT, Pereira JR, et al. **Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study.** *Lancet Oncol* 2013;14:38–47.
31. Siegel R, Xu J, et al. **Cancer statistics, 2010.** *CA Cancer J Clin* 2007; 60(5):277–300

32. De Wever W, Ceyskens S, Mortelmans L, et al. **Additional value of PET-CT in the staging of lung cancer: comparison with CT alone, PET alone and visual correlation of PET and CT.** *Eur Radiol* 2007; 17:23.
33. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, et al. **Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group.** *J Clin Oncol* 2008; 26:3552.
34. Timmerman R, Paulus R, Galvin J, et al. **Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer.** *JAMA* 2010; 303:1070.
35. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, et al. **Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial.** *Lancet Oncol* 2006; 7:719.
36. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, et al. **Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial.** *Lancet* 2009; 374:379.
37. Hellman S, Weichselbaum RR. **Oligometastases.** *J Clin Oncol* 1995; 13:8.
38. Zou L, Elledge SJ: **Sensing and signaling DNA damage. Roles of Rad17 and Rad9 complexes in the cellular response to DNA damage,** *Harvey Lect* 97:1- 15, 2001.
39. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR: **Genetics of programmed cell death in C. elegans. Past, present and future,** *Trends Genet* 14:410-416, 1998.
40. Vogelstein B, Kinzler KW: **The multistep nature of cancer,** *Trends Genet* 9:138-141, Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer,** *Cell* 100:57-70, 2000.
41. Fishel R, Kolodner RD: **Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer,** *Curr Opin Genet Dev* 5:382-395,1995.
42. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ: **Principles of cancer therapy. Oncogene and non-oncogene addiction,** *Cell* 136:823-837, 2009.
43. Hall EJ: **Radiobiology for the radiobiologist,** Philadelphia, 1993 Lippincott-Raven.

44. Fowler J: **Biological foundations of radiotherapy**, Amsterdam, 1967, Excerpta Medica.
45. Revell SH: **Relationship between chromosome damage and cell death**, New York, 1983, Alan Liss.
46. Perez CA, Stanley K, Rubin P, Kramer S, Brady LW, Marks JE, Perez-Tamayo R, Brown GS, Concannon JP, Rotman M. **Patterns of tumor recurrence after definitive irradiation for inoperable non-oat cell carcinoma of the lung**. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1980 Aug;6(8):987-94.
47. Dillman RO, et al. **Improved survival in stage III non-small-cell lung cancer: seven-year follow-up of cancer and leukemia group B (CALGB) 8433 trial**. J Natl Cancer Inst. 88(17): 1210-5, 1996.
48. Kong FM, et al. **High-dose radiation improved local tumor control and overall survival in patients with inoperable/unresectable non-small-cell lung cancer: long-term results of a radiation dose escalation study**. IJROBP. 63(2): 324-33, 2005.
49. Le Chevalier T, Arriagada R, Quoix E, et al. **A Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: First analysis of a randomized trial in 353 patients**. J Natl Cancer Inst. 83: 417-423, 1991.
50. Machtay M, Washam C, et al. **Pilot study of accelerated radiotherapy with concurrent chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer**. Semin Oncol. 32(2 Suppl 3): S9-12, 2005b.
51. Arriagada R, Le Chevalier T, Quoix E, et al. **Effect of chemotherapy on locally advanced non small cell lung carcinoma: A randomized study of 353 patients. GETCB (Groupe d'Etude et Traitement des Cancers Bronchiques), FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer) and the CEBI trialists**. IJROBP.120(6):1183-90, 1991.
52. Saunders M, Dische S, Barrett A, Harvey A, Griffiths G, Palmar M. **Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small cell lung cancer: Mature data from the randomized multicentre trial**. Radiother Oncol. 2(2):137-48, 1999.

53. Schaake-Koning C, van den Bogaert W, Dalesio O, et al. **Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy on inoperable non-small-cell lung cancer.** *NEJM*. 326(8):524-30, 1992.
54. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, et al. **Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol*. 28(13):2181-90, 2010.
55. Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, et al. **Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects.** *Oncogene*. 32(12):1475–87, 2013
56. Furuse,K, Fukuoka,M, Kawahara,M,et al: **Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 17:2692-2699, 1999.
57. Belani CP, Choy H, Bonomi P, et al: **Combined chemoradiotherapy regimens of paclitaxel and carboplatin for locally advanced non-small-cell lung cancer: A randomized phase II locally advanced multi-modality protocol.** *J Clin Oncol* 23:5883-5891, 2005.
58. Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D. **Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin.** *J Biol Chem* 1999 Nov 26 ;274(48):33827–30.
59. Blumenschein Jr. GR, Paulus R, Curran WJ, et al: **Phase II study of cetuximab in combination with chemoradiation in patients with stage IIIA/B non-small-cell lung cancer: RTOG 0324.** *J Clin Oncol* 29:2312-2318, 2011.
60. Choong NW, Mauer AM, Haraf DJ, et al: **Phase I trial of erlotinib-based multimodality therapy for inoperable stage III non-small cell lung cancer.** *J Thorac Oncol* 3:1003-1011, 2008.
61. Ready, N. **Chemoradiotherapy and Gefitinib in Stage III Non-small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutation Analysis: Cancer and Leukemia Group B (CALEB) 30106, a CALGB-Stratified Phase II Trial**
62. **RTOG 1306: A Randomized Phase II Study of Individualized Combined Modality Therapy for Stage III Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC).**

63. Bernstein BW, Bamburg JR. **ADF/cofilin: a functional node in cell biology**. Trends Cell Biol. 2010 Apr 20(4):187–95. doi:10.1016/j.tcb.2010.04.005.
64. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, et al. **Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase**. Nature. 1998 Jun 25;391(6687):698–702. doi:10.1038/391698a0.
65. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. **Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin**. J Biol Chem. 2005 Apr 1;280(15):14881–14886. doi:10.1074/jbc.M412112200.
66. Klemke M, Wabnitz GH, Funke F, Funk B, Kirchgessner H, Samstag Y. **Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions**. Immunity. 2008 Sep 19;29(3):404–13. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.011.
67. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, et al. **Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin**. Nat Cell Biol. 2009 Oct 11(10):1241–6. doi:10.1038/ncb1907.
68. Müller CB, de Barros RL, Castro MA, Lopes FM, Meurer RT, Roehe A, et al. **Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort**. J Cancer Res Clin Oncol. 2011 Sep 137(9):1309–16. doi:10.1007/s00432-011-1130-4.
69. Castro MAA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, Soares M, Müller CB, Lopes FM, et al. **CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer**. Cancer. 2010 Aug 1;116(15):3645–55. doi:10.1200/JCO.2009.23.1454.
70. Yap CT, Simpson TI, Pratt T, Price DJ, Maciver SK. **The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner**. Cell Motil Cytoskeleton. 2005 Mar;60(3):153–65. doi:10.1002/cm.20053.
71. Becker M, De Bastiani MA, Müller CB, Markoski MM, Castro MA, Klamt F. **High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas**. Tumour Biol. 2014 Feb 35(2):1233–8. doi:10.1007/s12250-013-9500-9.
72. Lee YJ, Sheu TJ, Keng PC. **Enhancement of radiosensitivity in H1299 cancer cells by actin-associated protein cofilin**. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011;417(1):17–21. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.071.

73. Levee, M.G.; Dabrowska, M.I.; Lelli, J.L., Jr.; Hinshaw, D.B. **Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells.** *Am. J. Physiol.* 1996, 271, C1981–C1992.
74. Hsu, F.F.; Lin, T.Y.; Chen, J.Y.; Shieh, S.Y. **p53-mediated transactivation of LIMK2b links actin dynamics to cell cycle checkpoint control.** *Oncogene* 2010, 29, 2864–2876.
75. Croft, D.R.; Crighton, D.; Samuel, M.S.; Lourenco, F.C.; Munro, J.; Wood, J.; Bensaad, K.; Vousden, K.H.; Sansom, O.J.; Ryan, K.M.; et al. **p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival.** *Cell Res.* 2011, 21, 666–682.
76. Wang, L.; Wang, M.; Wang, S.; Qi, T.; Guo, L.; Li, J.; Qi, W.; Ampah, K.K.; Ba, X.; Zeng, X. **Actin polymerization negatively regulates p53 function by impairing its nuclear import in response to DNA damage.** *PLoS One* 2013, 8, e60179
77. Adrin, C.; McDonald, D.; Attwood, K.M.; Rodrigue, A.; Ghosh, S.; Mirzayans, R.; Masson, J. Y.; Dellaire, G.; Hendzel, M.J. **A requirement for polymerized actin in DNA double-strand break repair.** *Nucleus* 2012, 3, 384–395.
78. Lee, Y.J.; Tsai, C.H.; Hwang, J.J.; Chiu, S.J.; Sheu, T.J.; Keng, P.C. **Involvement of a p53-independent and post-transcriptional up-regulation for p21WAF/CIP1 following destabilization of the actin cytoskeleton.** *Int. J. Oncol.* 2009, 34, 581–589.
79. Leu, J.D.; Chiu, Y.W.; Lo, C.C.; Chiang, P.H.; Chiu, S.J.; Tsai, C.H.; Hwang, J.J.; Chen, R.C.; Gorbunova, V.; Lee, Y.J. **Enhanced cellular radiosensitivity induced by cofilin-1 over-expression is associated with reduced DNA repair capacity.** *Int. J. Radiat. Biol.* 2013, 89, 433–444.
80. Du, H. Q., et al. (2015). **Increasing radiosensitivity with the downregulation of cofilin-1 in U251 human glioma cells.** *Mol Med Rep* 11(5): 3354-3360
81. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. **Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group.** *Am J Clin Oncol* 1982; 5:649

82. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. **New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)**. Eur J Cancer 2009; 45:228.
83. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al: **Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs**. J Am Med Assoc 311:1998-2006, 2014
84. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. **Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer**. N Engl J Med 2013; 368:2385.
85. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. **Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR**. N Engl J Med 2010; 362:2380.
86. **Study of Nivolumab (BMS-936558) in Combination With Gemcitabine/Cisplatin, Pemetrexed/Cisplatin, Carboplatin/Paclitaxel, Bevacizumab Maintenance, Erlotinib, Ipilimumab or as Monotherapy in Subjects With Stage IIIB/IV Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) (CheckMate 012)**
87. **RTOG 1106/ACRIN 6697, Randomized Phase II Trial of Individualized Adaptive Radiotherapy Using During-Treatment FDG-PET/CT and Modern Technology in Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)**
88. **Randomized Phase II Trial of Concurrent Chemoradiotherapy +/- Metformin HCL in Locally Advanced NSCLC**
89. Davila M, Frost AR, Grizzle WE. **LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer**. J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36868-75.



## 5. ARTIGO EM INGLÊS

**TITLE PAGE****THE ROLE OF COFILIN-1 (*CFL1*) EXPRESSION IN SURVIVAL AND  
RESPONSE TO RADIOTHERAPY IN PATIENTS WITH NON SMALL CELL LUNG  
CANCER**

Matheus Hermes Leal<sup>1,2\*</sup>, Mariane Branco<sup>2</sup>, Juliano Cé Coelho<sup>2</sup>, Fernanda Lopes<sup>2</sup>,  
Fábio Klamt<sup>2</sup>

\* Corresponding author:

Matheus Hermes Leal

<sup>1</sup>Radiotherapy Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2.350, 90035-903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil Tel/Fax: +55 51 3359 8520/ 55 51 3359.8001, e-mail: [matleal@hotmail.com](mailto:matleal@hotmail.com)

<sup>2</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, ICBS/UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre (RS) Brazil. Tel: +55 51 3308-5556; FAX: +55 51 3308-5535

Financial Disclosure: None of the authors declared a conflict of interest.

## ABSTRACT

**Background:** Lung cancer is a disease with high incidence and mortality, whose prognosis remains discrete despite a better understanding of the disease in the last decades. Radiotherapy plays a therapeutic role in all stages of the disease. The expression of cofilin-1 (*CFL1*), a protein related to cellular mobility, determined greater radiosensitivity to lung adenocarcinoma cells in *in vitro* studies, but worse survival at initial stages.

**Objective:** To evaluate if the expression of cofilin-1 modified survival and local control in lung cancer patients submitted to definitive treatment with radiotherapy.

**Methods:** Patients with non-small cell lung cancer with stage I-IV who received radiotherapy alone or combined with chemotherapy for lung cancer at the HCPA radiotherapy unit from 2009 to 2015 were evaluated. All patients had the expression of measured cofilin-1 evaluated and were distributed by cofilin-1 expression according to specific protocol. The medical records were retrospectively evaluated to estimate median survival. The progression was verified through evaluation of control chest tomography.

**Results:** 45 patients were assessed in this study. The median survival of all patients was 11.3 months and the 5-year overall survival was 17.3%. Patients with medium or high expression of cofilin-1 had higher mortality rates when compared to patients with low expression (HR, 1,628, IC95, 1,137-8,287 and HR, 1.59, IC95, 1,105-7,342). There was no statistically significant difference between local control and cofilin-1 expression

**Conclusion:** Cofilin-1 expression is associated with survival in patients with lung cancer treated with radiotherapy and there is a tendency for better local control with low *CFL1* expression. Our results suggest a new field to be explored in the management of locally advanced lung carcinoma, using cofilin-1 expression levels.

**Keywords:**

" Radiotherapy ", " radiation therapy ", " lung cancer ", " non-small cell lung cancer ", "Cofilin-1 ", " CFL1 expression "

## INTRODUCTION

The term lung cancer, or bronchial carcinoma, refers to malignancies that originate in the airways or lung parenchyma. About 85 percent of all lung cancers are classified as non-small cell lung cancer (NSCLC), the remaining 15 percent are relative to small cell lung cancer (SCLC) and other histological types. The disease had a global incidence of about 1.8 million cases and caused an estimated 1.6 million deaths in 2012 (1). In the United States, lung cancer leads the incidence and cancer-related mortality in both sex. Overall survival at all stages in 5 years is 16% (2).

The best therapeutic approach depends on patient preference, staging, and performance. The main idea of the treatment is trying to determine the best local and systemic control of disease, considering the toxicity of each intervention associated with the clinical context of the patient.

In general, for patients with stages I and II, the treatment consists of complete surgical resection, with the possible addition of adjuvant chemotherapy. For stage III patients, there is a significant controversy regarding the best management, partly justified by the heterogeneous population of patients in this stage. For patients selected with IIIA disease, candidates for surgical resection, adjuvant chemotherapy showed benefit in survival. For patients with irresectable or inoperable disease, the standard approach is combined treatment (concomitantly for eligible patients or sequential for patients with poorer performance). About 50 percent of the patients present evidence of hematogenous dissemination at the time of diagnosis (3). For stage IV patients, systemic chemotherapy is the standard initial treatment approach. In cases of stage IV patients requiring local control, radiotherapy may play a role on treatment.

Despite the technical advances in the treatment and understanding of the disease in the last decades, the prognosis of the patients did not improve significantly. Many of these patients present unresectable disease at diagnosis, whose standard of treatment is radiochemotherapy. The RTOG-73-01 study defined the dose of 60 Gy in 30 fractions, with survival of 19% in 2 years (4). Radiographic response rate was approximately 60%, local failure within the radiation field, about 25%, and rates of distant metastases were 15% and 35% at 6 and 12 months, respectively. Other studies with RT doses between 60-64 Gy reported a median survival of 10-14 months for stage IIIA / IIIB patients (5). Le Chevalier (6) showed a 2-year overall survival rate of only 14% and a 15% 1-year local control, evaluating patients with bronchoscopic studies. The addition of chemotherapy improved median survival

at 1.7 months and brought an absolute survival benefit of about 3% (7). Both poor local control and the capacity for systemic dissemination of lung cancer have led to the search for a better understanding of the biological behavior of the disease. This understanding has already led to the discovery of specific mutations and to the development of target therapies as in EGFR mutations and in ALK translocations.

More recently, cofilin-1, a cell-related protein, has been associated with induction of apoptosis as a response to oxidative stress (8). Other studies showed greater radiosensitivity in non-small cell lung cancer cell lines with cofilin-1 overexpression (9, 10).

Radiotherapy used in conventional fractionated doses (1.8-2 Gy), as teletherapy with linear photon accelerator, has the induction of apoptosis as a major mechanism of cell damage. This induction occurs predominantly by the indirect effect (hydroxyl radical formation and oxidative stress of DNA) and by the direct effect on DNA double-helix, which corroborates the findings of the aforementioned studies.

Clinical verification of such laboratory findings is of particular interest in determining whether cofilin-1 expression may confer increased tissue radiosensitivity. Such verification has not yet been published, at least in periodicals specialized in radiotherapy, as far as it was possible to research.

This study intends to evaluate if the cofilin-1 expression modified local control rates and median survival in patients with lung cancer treated with combined treatment (radiochemotherapy) or radiotherapy alone in the radiotherapy unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **MATERIALS & METHODS**

All patients with stage I-IV bronchial carcinoma, treated from 2009 to 2015 at the radiotherapy unit of the HCPA, who received radiotherapy for toracic neoplasia, were evaluated. All the patients had computerized radiotherapy planning (with qualitative and quantitative data related to the treatment accessible) and the medical records were retrospectively verified. Patients younger than 18 years or who were unable to complete the radiation therapy plan due to loss of follow-up, toxicity or death were excluded.

We excluded patients whose biopsies could not be processed, when the processing would determine the extinction of the material, making it impossible to return to the pathology service.

The individual variables were registered in a specific database.

### **Study Design**

All the individual variables (factors under study and outcome) were retrospectively evaluated, characterizing a retrospective cohort study. Both the assessment of cofilin-1 expression and individual characteristics of clinical importance in the cohort were evaluated.

### **Evaluation of cofilin-1 expression**

Paraffin blocks from patients in the study population were rescued at the Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Three sections of 4  $\mu\text{m}$  thickness were made, per case, for blade assembly.

The first stage of processing is to dephrase and rehydrate the cuts. Subsequently, one of the cuts is stained in hematoxylin eosin solutions, followed by blade assembly with cover slip and synthetic resin.

The other two cuts were intended for immunohistochemical processing. For this purpose, the cuts were placed on flagged slides. According to the standardized protocol, the following procedures were performed after deparafinisation and rehydration:

A) heat-mediated antigen recovery in sodium citrate buffer,

B) blocking the endogenous peroxidase in 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution in methanol,

- C) blocking non-specific binding in bovine serum albumin 1%,
- D) overnight incubation at 4°C with human anti-cofilin-1 polyclonal primary antibody (Abcam®) in the ratio 1: 200,
- E) washing of the slides,
- F) incubation and color reaction performed with HRP-labeled polymer conjugated kit (Invitrogen®)

Negative controls, representing the background reactions, were obtained through this same protocol, with the difference that one of the cuts had omitted incubation with the primary antibody.

### **Densitometric analysis**

The immunoreactivity of cofilin-1 was measured using a Zeiss® Imager AI (200X) microscope coupled to a computer with Image Pro Plus® 6.1 software. Five images were analyzed for each case, representing the main foci of tumoral disease.

The images were converted to gray scale and had total and nuclear optical density measured in four different areas of interest (AOI) located in neoplastic regions. Next, the logarithmic subtraction of the background marking is done. The determination of the intensity of the immunoreactivity was done with the aid of the ImageJ® software, as shown in the steps (Figure 11):

- A) It starts by selecting the image to be studied
- B) If the image has two colorations (eg DAB and hematoxylin), we must deconvolve, through specific application of the software
- C) Three windows are generated: color 1 (H), color 2 (DAB), color 3 (residual)
- D) Select image 2 (brown)
- E) After, we select threshold. The threshold will mark red dots where there is DAB marking (brown). Adjust the red marking on the scroll bar
- F) After that, the "Red" is changed to "B & W"

G) After, we selected for analysis through the application analyze particles

### **Stratification of cofilin-1 expression**

The evaluation of the study factor expression of cofilin-1 was performed with both continuous variable and stratification in low, medium and high expression.

For the purpose of stratification of cofilin-1 at expression levels, we adopted the division of quantified expressions into percentiles: P33 and P66, separating the distribution into low, medium and high expression.

The other factors in the study that were relevant to the research were carefully evaluated through medical records.

Among them, we take into account proven and potential prognostic factors that may alter the relevant outcomes:

- A) individual characteristics of the patients (gender, age, ethnicity),
- B) comorbidities (including active smoking),
- C) staging,
- D) performance statuts (11),
- E) factors associated with radiotherapy (hemoglobin, final dose of radiotherapy).

### **Evaluation of major clinical outcomes**

The main outcomes (median, overall survival and local control) were evaluated.

Median and overall survival were calculated using the death and survival time records for each patient. A survival curve (Kaplan-Meier) was generated on a per-group basis.

Local control was assessed through clinical assessments and post-treatment radiological studies. The radiological studies were prospectively reviewed with radiologist for a better characterization of progression and time of progression (qualitative and quantitative evaluation on the local progression outcome).

For this analysis we used Recist 1.1 as the criteria for the evaluation of response,



although the clinical evaluations of progression in the medical record were also taken into account.

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed in the R environment and with help of SPSS software version 17. We used cox regression models to test the independent contribution of each variable on mortality, as well as stratification of Kaplan-Meier type mortality curves, and survival analysis using long-rank test.

Univariate analysis was used when necessary.

### **Ethical Issues**

The present project was approved by the Bioethics Committee of HCPA (Hospital de Clinicas de Porto Alegre) under number 150388.

## RESULTS

At last, 163 patients with lung cancer were treated with radiotherapy at Hospital de Clínicas between 2009 and 2015. We have not yet been able to assess the levels of cofilin-1 in the whole population, partly due to technical and / or ethical issues (do not compromise paraffin block for possible future requirements). After exclusion criteria, 45 patients were evaluated. The characteristics of the population are presented in Table 1.

The patients in our sample are predominantly male (53%) and self-reported white (82%). The median age was 62 years. The histology of adenocarcinoma was predominant (57%), with the majority of patients being treated with concomitant radiochemotherapy. The vast majority of patients had performance status 0 or 1 (80%), and the predominant stage was III (84.5%). All patients were treated with radiotherapy dose between 59.4-60 Gy. Only 9% of patients started treatment with hemoglobin below 10 g / dL. The median survival of all cohorts was 11.3 months and the overall survival at 5 years was 17.3%. (Figure 13). Only 37.8% of patients presented complete response to treatment.

### **Cofilin-1 expression**

The median value of the expression was 27576 counts. The expression of cofilin-1 followed normal dispersion (Figure 14, Figure 15).

### **Correlation between survival and cofilin-1**

When the statistical tests were used to evaluate the relationship of the cofilin-1 (stratified) with the other independent variables, survival was significantly higher for the low expression group, compared to the others groups (Figure 16).

Univariate analyzes were performed for the factors under study: sex, age, performance status and clinical stage. None correlated dependently with cofilin-1 expression and mortality.

Median survival was 30 months for the low expression group of cofilin-1, 14 months for the medium expression group and 9 months for the high expression group (table 4).

The high and medium expression of cofilin-1 were associated with higher odds of mortality in this study.

Patients with medium cofilin-1 expression had a 1.62-fold higher risk of death than patients with low expression. In patients with high expression this risk was 1.59 times higher. The clinical stage did not influence survival in this study (Figure 17).

### **Correlation between local control and cofilin-1**

There was no significant association between cofilin-1 and response to treatment (local control). There was a tendency for a greater chance of complete response when the cofilin-1 was analyzed as a continuous variable (Table 6). We present the responses by level of cofilin-1 in Figure 18

There is a tendency of greater predominance for low expression of cofilin-1 in the subgroup of patients who presented complete response. In fact, it can also be estimated that patients who presented complete response had lower mean cofilin-1 as measured in patients who had partial response or who did not respond to treatment Table 7).

## DISCUSSION

Currently, high mortality rates are due not only to the fact that many cases are diagnosed at advanced stages (controversial screening strategies), but also to the lack of effective therapies.

Although many advances have been made in understanding the molecular pathogenesis and treatment of this disease, the overall survival rate over 5 years is 15% to 20%, improving only slightly over the past 20 years (6). Recently, the Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC) collected samples from 1007 patients at 14 institutions that were tested for at least one gene and 733 patients whose tumors were tested using complex assays to look for conductive oncogenes in 10 genes. The intention was to assist in the selection of target treatments for patients with metastatic adenocarcinoma and to direct them to clinical trials. One driver was detected in 466 of the 733 patients tested (64%), with most of the mutations identified in *KRAS* or *EGFR*. The median survival time was 3.5 years for the 260 patients who received targeted therapy compared to 2.4 years for the 318 patients who did not receive it provokes reflections and points out new directions for the management of the disease (12).

Targeted therapies provide expectations of improving the bleak prognosis of lung cancer (13, 14). In fact, many studies are randomizing patients, both by selecting them for specific mutations and treating populations as a whole (15). However, the mutations studied with effective drugs still correspond to a specific and limited group of patients.

Particularly with regard to combined treatment with curative intent, unfortunately few strategies have been successful in offering better chances of survival, especially in cases of advanced disease. In fact, our study has shown that survival in patients treated with radiochemotherapy is still very poor.

The search for interventions that may alter the current results of local control and survival has led to many clinical trials seeking better results. Currently, there are several protocols open in the RTOG testing new medications or technical changes in radiotherapy in the combined treatment (16,17).

The cofilin-1 is considered a regulatory protein of actin filaments, being of fundamental importance in events that of cytoskeletal remodeling in diverse cellular mechanisms. Literature data have demonstrated that this protein, when in the active form, not only presents a nuclear localization signal, but is also responsible for carrying monomeric actin to the nucleus in situations involving stress. The role of cofilin-1 in apoptosis, as already mentioned, has been increasingly studied, as well as cofilin-1 as a biomarker, especially in

lung cancer. In *in vitro* studies the association of cofilin-1 and radiotherapy response was controversial. Among other reasons, this was a motivation for this analysis.

The evaluation of cofilin-1 expression is still being standardized. In this study, we performed a protocol already validated in previous trials. However, we recognize that aspects related to the standardization of the determination of tumor area in the slides and the possible relation between tumor expression and basal expression in the patient may be aspects to be improved for future analysis. Nevertheless, since the evaluation was done in a standardized way in our population, we do not consider that this could be a significant bias for the results of this study.

In summary, we determined the association between radiotherapy response (in terms of survival) and cofilin-1 levels and we hope to increase our number of patients evaluated, in addition to clarifying the relationship between local control and cofilin-1 expression. This relationship has future implications in the prognostic and therapeutic research of lung cancer.

## CONCLUSION

The expression of cofilin-1 is related to survival in patients with lung carcinoma treated with radiotherapy and there is a tendency for better local control with low expression of the protein.

The role of cofilin-1 in the response to radiotherapy in terms of local control in lung cancer still needs to be better established in future analyzes, as well as the impact of local failure (systemic progression) on the mortality of these patients.

Studies in animal models may help to better measure the impact of cofilin-1 expression (and overexpression) in the natural history of cancer, and response to radiation therapy in particular.

Our results suggest a new field to be explored in the management of locally advanced lung carcinoma, with both prognostic and therapeutic possibilities.

Prognostic possibilities include the ability to identify patients who will eventually fail radiotherapy, as well as to establish subgroups of patients who may possibly have their treatment optimized (radiotherapy and chemotherapy).

It is probably necessary to increase the body of knowledge of cofilin-1 and its role in cancer, as well as to explore its implications in different ways of treating this disease.

## REFERENCES

1. Brambilla E, Travis WD. Lung cancer. World Cancer Report, Stewart BW, Wild CP (Eds), World Health Organization, Lyon 2014
2. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual . 7th ed. New York: Springer, 2010.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5):277–300
4. Perez CA, Stanley K, Rubin P, Kramer S, Brady L, Perez-Tamayo R, Brown GS, Concannon J, Rotman M, Seydel HG. *Cancer*. 1980 Jun 1;45(11):2744-53.
5. Okawara G, Mackay JA, Evans WK, Ung YC. Management of unresected stage III non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Oncol*. 1: 377-393, 2006.
6. Le Chevalier T, Arriagada R, Quoix E, et al. A Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: First analysis of a randomized trial in 353 patients. *J Natl Cancer Inst*. 83: 417-423, 1991.
7. Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, et al. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*. 32(12):1475–87, 2013
8. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol*. 2009;11:1241-1246.
9. Jyh-Der Leu , Yu-Wen Chiu , Chia-Chien Lo , Pei-Hsun Chiang , Shu-Jun Chiu Cheng-Han Tsai , Jeng-Jong Hwang , Ran-Chou Chen , Vera Gorbunova , Yi-Jang Lee In: *International Journal of Radiation Biology*, June 2013, Vol. 89, No. 6 : Pages 433-444
10. Enhancement of radiosensitivity in H1299 cancer cells by actin-associated protein cofilin, Yi-Jang Lee a,\* , Tzong-Jen Sheu a, Peter C. Keng
11. Oken, MM et al Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5:649
12. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al: Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *J Am Med Assoc* 311:1998-2006, 2014
13. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368:2385.
14. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; 362:2380.

15. Study of Nivolumab (BMS-936558) in Combination With Gemcitabine/Cisplatin, Pemetrexed/Cisplatin, Carboplatin/Paclitaxel, Bevacizumab Maintenance, Erlotinib, Ipilimumab or as Monotherapy in Subjects With Stage IIIB/IV Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) (CheckMate 012)

16. RTOG 1106/ACRIN 6697, Randomized Phase II Trial of Individualized Adaptive Radiotherapy Using During-Treatment FDG-PET/CT and Modern Technology in Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)

17. Randomized Phase II Trial of Concurrent Chemoradiotherapy +/- Metformin HCL in Locally Advanced NSCLC



**TABLES**

**Table 1.** Population Demographics

<b>Características</b>	<b>N (45)</b>	<b>(100%)</b>
Age (mean ± SD)	62,38 (9,23)	
Histology (N - percent)		
Adenocarcinoma	26	57,8
Epidermoid Carcinoma	16	35,6
Large Cell Carcinoma	3	6,7
Clinical Stage (N e percent)		
II	1	2,2
IIIA	18	41,1
IIIB	20	44,4
IV	6	13,3
ECOG (N e percent)		
0	10	22,2
1	26	57,8
2	7	15,6
3	1	2,2
4	1	2,2
Ethnicity (N e percent)		
White	37	82,2
Afro-american	4	8,9
Other	4	8,9
Gender (N e percent)		
Male	24	53,3
Female	21	46,7
Chemoradiation Regime (N e percent)		
Concomitant	32	71,1
Sequential	7	15,6
Radiation alone	6	13,3

Age expressed in years. N: Number of individuals

**Table 2.** Mean Survival by cofilin-1 stratification groups

	MS	SD	95.0% CI	
			Inferior	Superior
Low expression	30,800	9,141	12,884	48,716
Medium expression	9,995	5,543	8,480	11,509
High expression	7,792	3,678	6,684	8,899

MS: Mean Survival in years, SD: Standard Deviation

**Table 3.** Hazard Ratio of cofilin-1 expression, with low expression used as reference in comparison of groups

	HR	Var	p	HR Adj	95.0% CI	
					Inferior	Superior
Low expression						
Intermediate expression	1,202	,465	6,673	,010	1,628	1,137 8,287
High expression	1,130	,441	6,574	,010	1,595	1,105 7,342

HR: Hazard Ratio, Var: Variance

**Table 4.** Local control and cofilin-1 expression

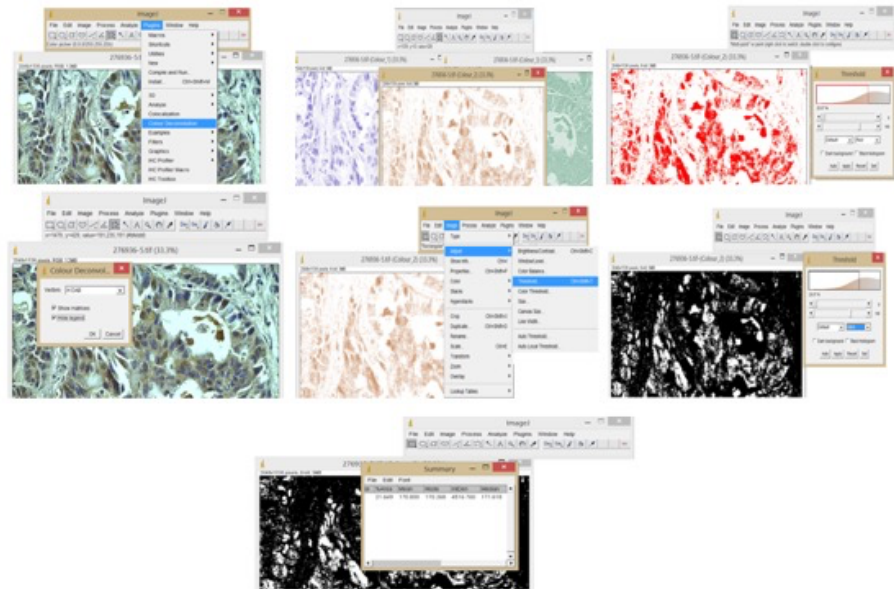
Local Control		Shapiro-Wilk		
		Statistics	df	Sig.
Cofilin-1	Complete Response	,890	17	,056
	No Response	,975	13	,945
	Partial Response	,931	15	,283

dF: differential factor. Sig: Statistical significance level

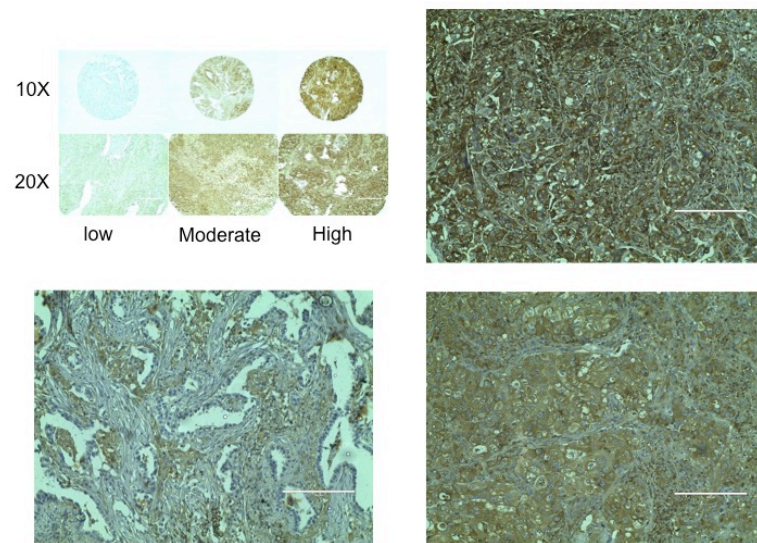
**Table 5.** Mean expression of cofilin-1 by strata of local control

Response Group	Statistics		Mean Cofilin-1 expression	Standard deviation	
Cofilin-1	Complete Response	Mean	25038,47	2128,375	
		95% Confidence Interval	Inferior limit		20526,52
			Upper limit		29550,42
		5% mean			24776,97
	No Response	Mean	32373,00	3455,233	
		95% Confidence Interval	Inferior limit		24844,69
			Upper limit		39901,31
		5% mean			32117,22
	Partial Response	Mean	26356,73	1532,629	
		95% Confidence Interval	Inferior limit		23069,57
			Upper limit		29643,90
		5% mean			26668,81

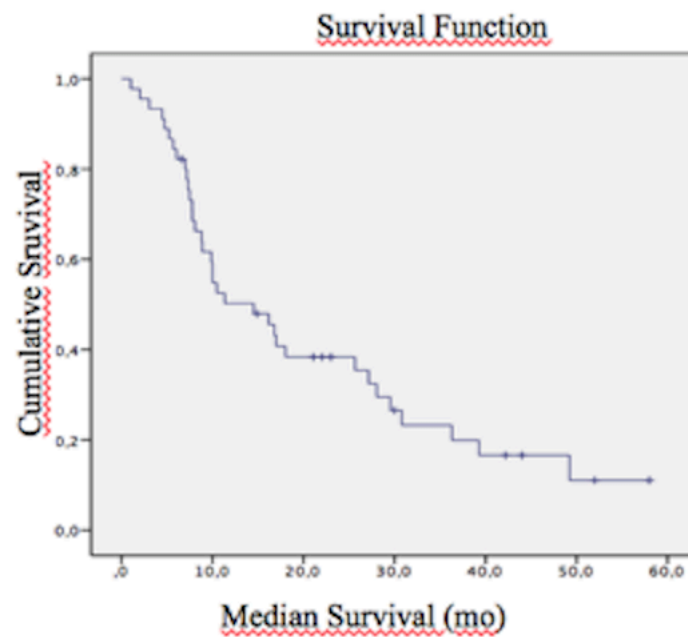
## FIGURE LEGENDS AND FIGURES



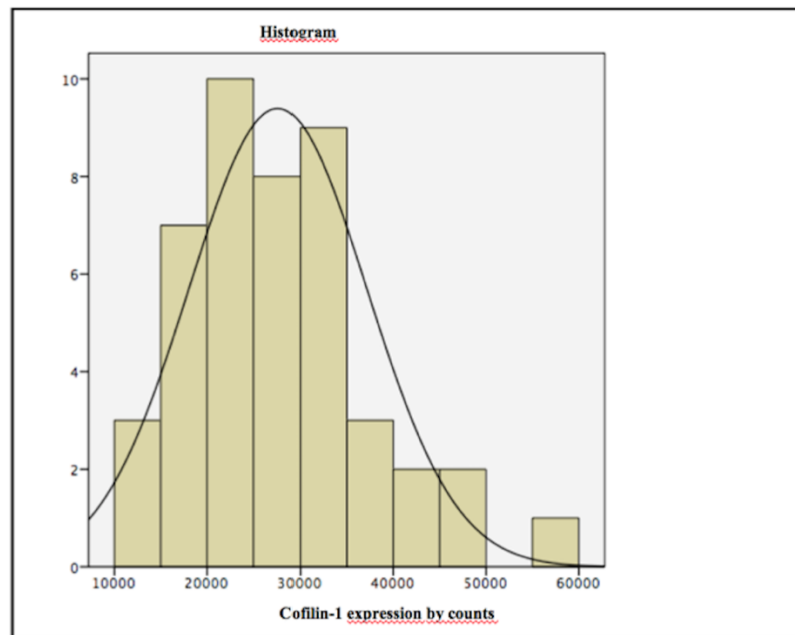
**Figure 11.** Steps of the image processing to evaluate the immunoreactivity of cofilin-1. It starts by selecting the image to be studied. If the image has two colorations (eg DAB and hematoxylin), we must deconvolve, through specific application of the software. Three windows are generated: color 1 (H), color 2 (DAB), color 3 (residual). We, then, select the image 2 (brown). After, we select threshold. The threshold will mark red dots where there is DAB marking (brown). Then, we adjust the red marking on the scroll bar. After that, the "Red" is changed to "B & W". Then we select for analysis through the application "analyze particles".



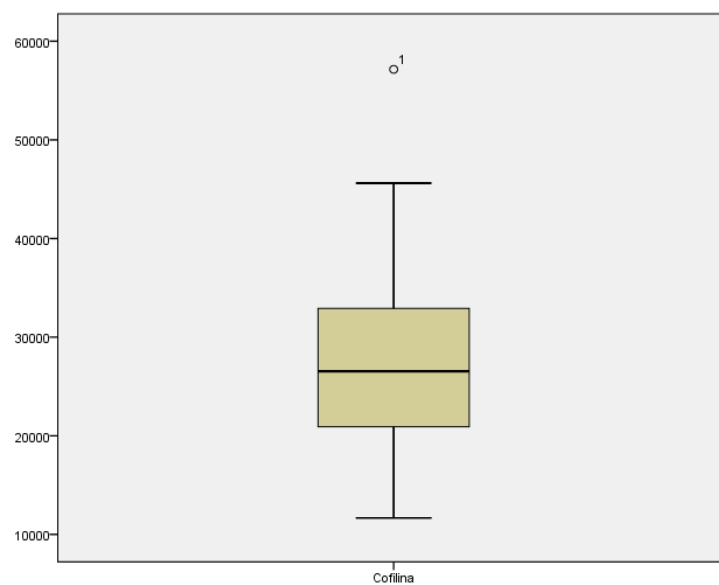
**Figure 12.** Images after immunohistochemical reaction with cofilin-1 markers (representative cohort of tumor). As it follows, there is three presentations of intensity of reaction: low, moderate and high intensity.



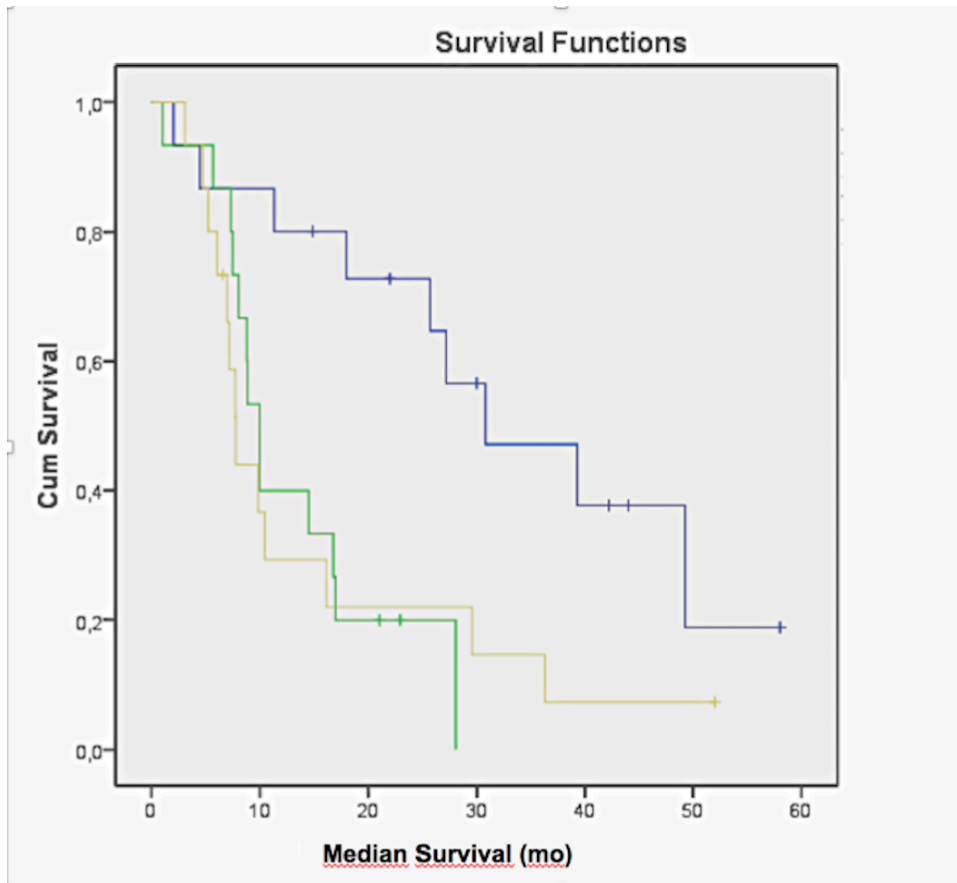
**Figure 13.** Kaplan-Meier curve representative of the cohort averaged over 5 years of follow-up, showing the poor survival among patients treated with radiation therapy in all stages. 5 year OS was 17,3%, and MS was 11 months for the entire cohort.



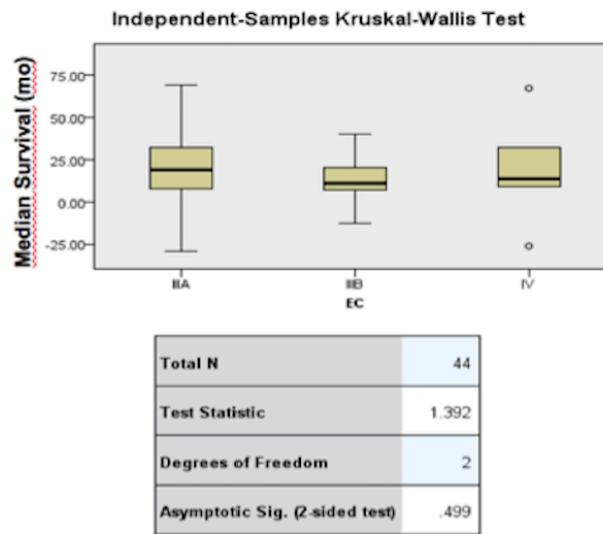
**Figure 14.** Graph of the distribution of cofilin-1 in the cohort. Data obtained after evaluation as previously demonstrated in experimental. The median value of the expression was 27576 counts. The expression of cofilin-1 followed normal distribution.



**Figure 15.** Cofilin-1 dispersion in this cohort. The expression of cofilin-1 followed normal dispersion again.



**Figure 16.** Kaplan-Meier curve comparing cofilin-1 expression and survival (Cumulative Survival x MS) were used to evaluate the cofilin-1 impact to evaluate survival between expression levels. These curves show the overall survival of patients in 5 years. The cumulative survival was also measured. Blue: Low Expression (patients between the P0-P33 percentiles) Green: Intermediate Expression (patients in the P33-P66 percentiles) Yellow: High Expression (patients between the P66-P100 percentiles).

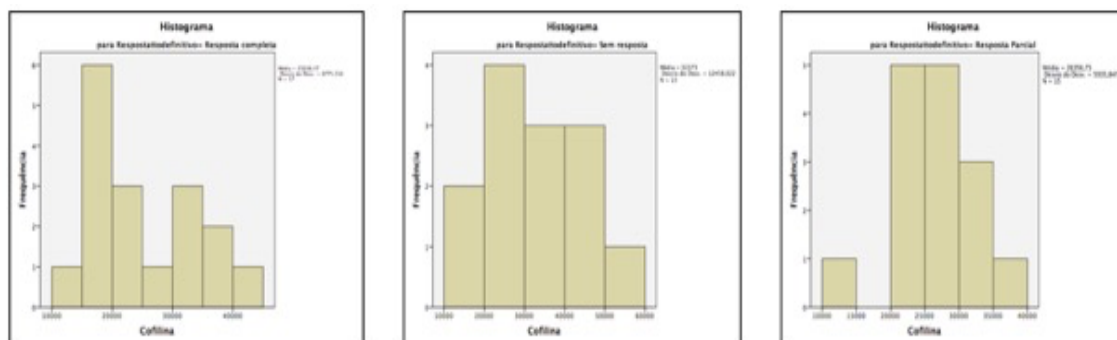


1. The test statistic is adjusted for ties.

**Figure 17.** Univariate analysis of median survival by cofilin-1 expression, by clinical stages (EC) as it follows: IIIA, IIIB, IV.

One patient with clinical stage II was excluded from the analysis for statistical purposes.

Stage did not affect the impact of cofilin-1 expression affecting survival.



**Figure 18.** Cofilin-1 expression and local control by response strata evaluated by Recist.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como já explicitado, o carcinoma brônquico compreende um problema de saúde pública, levando milhares de pessoas a óbito em todo mundo. A detecção precoce e o estadiamento desse tipo de tumor são de fundamental importância na escolha do tratamento. A grande heterogeneidade das neoplasias brônquicas tanto em comportamento biológico quanto na resposta ao tratamento constitui um desafio à comunidade científica no que diz respeito a proposição de novas terapêuticas.

Atualmente, as altas taxas de mortalidade decorrem não só do fato de muitos casos serem diagnosticados em estádios avançados (estratégias de rastreamento controversas) quanto à falta de terapias efetivas.

Embora muitos avanços tenham sido feitos na compreensão da patogênese molecular e tratamento desta doença, a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de 15% a 20%, melhorando apenas ligeiramente nos últimos 20 anos (6). Recentemente, o Consórcio de Mutação de Câncer de Pulmão (*LCMC*) recolheu amostras de 1007 pacientes em 14 instituições que foram testadas para pelo menos um gene e 733 pacientes cujos tumores foram testados utilizando ensaios complexos para procurar oncogenes condutores em 10 genes. A intenção era ajudar na seleção de tratamentos alvo para pacientes com adenocarcinoma metastático e direcioná-los para ensaios clínicos. Um *driver* foi detectado em 466 dos 733 pacientes testados (64%), com a maioria das mutações identificadas em *KRAS* ou *EGFR*. O resultado de que a sobrevida mediana foi de 3,5 anos para os 260 pacientes que receberam terapia dirigida em comparação com 2,4 anos para os 318 pacientes que não receberam provoca reflexões e aponta novos rumos para o manejo da doença (83).

As terapias alvo vem oportunizando alguma esperança de melhorar o prognóstico sombrio do câncer de pulmão (84, 85). De fato, muitos estudos estão randomizando pacientes, tanto selecionando-os por mutações específicas quanto tratando populações como um todo (86). Entretanto as mutações estudadas com drogas efetivas ainda correspondem a um grupo específico e limitado de pacientes.

Particularmente no que se refere ao tratamento combinado com intenção curativa, infelizmente poucas estratégias têm sido bem-sucedidas em oferecer melhores chances de sobrevida, especialmente em casos de doença avançada. De fato, nosso estudo mostrou ainda ser muito pobre a sobrevida em pacientes tratados com radioquimioterapia.

A busca por intervenções que possam alterar os atuais resultados de controle local e sobrevida tem levado a muitos ensaios clínicos buscando melhores resultados. Atualmente, existem vários protocolos abertos no RTOG testando novas medicações ou alterações técnicas na radioterapia no tratamento combinado (87,88).

A proteína cofilina-1 é considerada uma proteína reguladora dos filamentos de actina, sendo de fundamental importância em eventos de remodelamento de citoesqueleto em diversos mecanismos celulares. Dados da literatura demonstraram que esta proteína, quando na forma ativa, não somente apresenta um sinal de localização nuclear, como também é a responsável por carrear actina monomérica para o núcleo em situações que envolvam estresse. O papel da cofilina-1 na apoptose, como já referido, tem sido cada vez mais estudado (39, 64, 67), bem como a cofilina-1 como biomarcador, especialmente em câncer de pulmão (68,69). Em estudos *in vitro* a associação da cofilina-1 e resposta à radioterapia foi controverso (79,80). Entre outros motivos, esta foi uma motivação para esta análise.

A avaliação da expressão da cofilina-1 ainda está sendo padronizada. Neste estudo realizamos protocolo já validado em ensaios anteriores (67,68,69). Entretanto reconhecemos que aspectos relativos a padronização da determinação área tumoral nas lâminas e a possível relação entre expressão no tumor e expressão basal no paciente podem ser aspectos a serem aprimorados para análises futuras. Ainda assim, tendo a avaliação sido feita de forma padronizada em nossa população, não consideramos que esse possa ser um viés significativo para os resultados deste trabalho.

Do ponto de vista de avaliação de outros fatores relacionados aos desfechos apreciados, consideramos que conseguimos realizar razoável coleta de dados dos pacientes estudados. Todos os pacientes tiveram idade, sexo, *performance status*, hemoglobinemia pré-tratamento, estágio, dose de radioterapia (juntamente com outros critérios do tratamento radioterápico), integração de quimioterapia ao tratamento, etnia e histologia acessados. Estes fatores não constituíram viés de confusão após análise univariada. Não pudemos realizar análise multivariada em função do número restrito de pacientes, entretanto pretendemos realizá-la na medida em que conseguirmos aumentar a população estudada.

Obtivemos resultados genéricos de controle local e sobrevida que estão de acordo com as séries mundiais, contando por estágio (54). Nossa coorte foi composta predominantemente por pacientes com estágio III de doença. Todos os nossos pacientes foram submetidos a tratamento conformal 3D, o que permitiu uma coleta de informações mais precisa e rica quanto aos detalhes dosimétricos do tratamento. A variável controle local foi

avaliada com tomografias de controle pós-tratamento. Ainda que o padrão de avaliação de controle local seja a avaliação patológica (51), consideramos que o nosso método foi o melhor possível por motivo desta análise ter sido realizada retrospectivamente. Ainda é importante ressaltar que na prática clínica e na maioria dos ensaios randomizados prospectivos, o controle local é costumeiramente avaliado clinicamente (por aspectos práticos e riscos de submeter o paciente a exames invasivos) (56,57).

Conseguimos demonstrar, de forma inédita na literatura, associação entre níveis de cofilina-1 e sobrevida global e mediana em pacientes submetidos à radioquimioterapia ou radioterapia exclusiva. Mais especificamente conseguimos evidenciar considerável pior sobrevida em pacientes com média e alta expressão de cofilina-1 comparativamente a pacientes com baixa expressão. Estudos anteriores já apontavam para esta associação (68), porém ela foi validada como biomarcador para pacientes de todos os estádios, sem uma definição específica de quais pacientes tinham sido submetidos à radioquimioterapia. Até onde pudemos pesquisar, o nosso é o primeiro estudo a avaliar diretamente o papel da cofilina-1 na sobrevida de de pacientes com câncer de pulmão (predominantemente no estágio III) especificamente submetidos à radioquimioterapia ou radioterapia exclusiva.

Interessantemente, não pudemos demonstrar associação entre a expressão de cofilina-1 e controle local, como poderia ser previsível no início deste estudo. Houve uma tendência para melhor controle local, estimado como resposta completa, em pacientes com baixa expressão de cofilina-1, quando a proteína foi avaliada como variável contínua (índice associação: 0,89  $p = 0,056$ ). É possível que a incorporação de mais pacientes em análise futura indique mais claramente se existe associação ou não. Não somos capazes, com base nos resultados atuais, de confirmar ou refutar informações obtidas nos estudos com culturas *in vitro* apresentados neste trabalho (78, 79, 80).

Não conseguimos prever o impacto da falha à distância na sobrevida desta coorte, visto que esse não foi escopo deste trabalho. É crível que exista associação entre os níveis de cofilina-1 e falha à distância, tendo em vista toda base de conhecimento descrevendo a associação entre níveis de expressão de cofilina-1 e dinâmica da célula tumoral, especialmente quanto à agressividade e processo de metastatização (89).

Em resumo, determinamos a associação entre resposta à radioterapia (em termos de sobrevida) e níveis de cofilina-1 e esperamos poder aumentar o nosso número de pacientes avaliados, além de esclarecer melhor a relação entre controle local e expressão de cofilina-1. Essa relação tem implicações futuras na pesquisa prognóstica e terapêutica da neoplasia de pulmão.

É possível que a avaliação da cofilina-1 possa ajudar a guiar tratamento individualizado dos pacientes, como decisão sobre dose de radioterapia ou regimes de quimioterapia específicos. Ainda é necessário esclarecer se de fato a expressão da cofilina-1 em modelos animais pode prever resposta à radio e à quimioterapia. E se, de fato, essa associação existir, se é possível que a interferência (por exemplo silenciamento) da expressão da proteína possa determinar melhores resultados terapêuticos.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Anexo 1

#### Carta de aceite do projeto no GPPG



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

#### **COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 150388

**Data da Versão do Projeto:** 19/08/2015

**Pesquisadores:**

FÁBIO KLAMT

PEDRO EMANUEL RUBINI LIEDKE

CAROLINA BEATRIZ MÜLLER

MATHEUS HERMES LEAL

SABRINA RICHTER BEDIN

RAFAELA PIROLI

ANDRÉA BALDASSO ZANON

GILBERTO SCHWARTSMANN

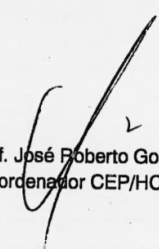
MARIANE ARAUJO BRANCO

**Título:** PAPEL DA COFILINA-1 COMO BIOMARCADOR EM CÂNCER DE PULMÃO NÃO-PEQUENAS CÉLULAS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2016.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

## 7.2 Anexo 2

Equipe do Projeto da Cofilina

Prof. Dr. Fábio Klamt

Coordenador, Sub-Chefe do Departamento de Bioquímica/UFRGS, Orientador do PPG-Ciências Biológicas: Bioquímica/UFRGS, Orientador do PPG-Medicina: Ciências Médicas/UFRGS

CPF: 918.046.120/49

Endereço: Departamento de Bioquímica ICBS/UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo. Porto Alegre RS.

E-mail: [00025267@ufrgs.br](mailto:00025267@ufrgs.br)

Telefone: (51) 3308-5556

Fax: (51) 3308-5535

<http://lattes.cnpq.br/3256932358053453>

Dr. Mauro Antônio A. Castro

CPF: 632.292.850-34

Pesquisador do Serviço de Bioinformática/HCPA

<http://lattes.cnpq.br/6484877487662355>

Mestra Carolina Beatriz Müller

CPF: 004.199.710-76

<http://lattes.cnpq.br/3433622573149211>

Doutoranda do PPG-Ciências Biológicas: Bioquímica ICBS/UFRGS

Autores dos trabalhos que descrevem a cofilina-1 como biomarcador prognóstico e co-inventores da patente PI0802917-2 A2 denominado “MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO”, estarão envolvidos na execução das etapas de coleta de dados do SAMIS, preparo das lâminas e reação imunohistoquímica, quantificação de cofilina-1 e análise dos resultados. Tempo de dedicação: 20h/semana

### 7.3 Anexo 3

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

<b>Title and abstract</b>	<i>(a) (Delineamento de pesquisa escrito no título)</i>
	<i>(b) (Abstract contempla fator em estudo, desfechos avaliados, relevância clínica e não apresenta resultados, pois ainda não existem)</i>
Introduction	
Background/rationale	<i>Biomarcadores de comportamento no tratamento oncológico vem sendo estudados. A presença de superexpressão da Cofilina-1 mostrou aumento da radiosensibilidade em células de adenocarcinoma in vitro. O câncer de pulmão constitui doença com pobre controle local, inclusive ao tratamento com radioterapia. O papel da supressão da Cofilina-1 em pacientes tratados com radioterapia até então não foi avaliado.</i>
Objectives	<i>Determinar se a superexpressão da Cofilina-1 altera a taxa de controle local e sobrevida em pacientes com câncer de pulmão não de pequenas células.</i>
Methods	
Study design	<i>Estudo de corte</i>
Setting	<i>Pacientes com câncer de pulmão não pequenas células, com estágios I – IIIB, que receberam radioterapia exclusiva ou combinada com quimioterapia, dirigida à neoplasia brônquica, na unidade de radioterapia do HCPA, nos anos de 2009 a 2014</i>
Participants	<i>(a) Todos os pacientes que receberam radioterapia dirigida à neoplasia pulmonar na Unidade de radioterapia do HCPA foram incluídos. Critérios de exclusão foram não estar disponível no prontuário: sexo, idade (no diagnóstico), subtipo histológico, estadiamento (EG-TNM) e esquema terapêutico utilizado no tratamento do paciente</i>
Variables	<i>Fator em Estudo: Expressão de Cofilina-1</i>  <i>Desfechos Principais: Sobrevida (Global, Mediana) e Controle Local</i>
Data sources/	<i>Avaliação do Fator em Estudo: A imunorreatividade da cofilina-1 será</i>



measurement	* <i>mensurada utilizando um microscópio Zeiss® Imager AI (200X) acoplado a um computador com o software Image Pro Plus® 6.1. A determinação da intensidade da imunorreatividade foi realizada através de software específico e modelo padrão</i>
	<i>Avaliação do Desfecho: Avaliação do desfecho será realizada através de pesquisa de prontuário para avaliar controle local (através de TC posteriores ao tratamento) e sobrevida.</i>
Bias	<i>Possível viés de aferição na avaliação da Cofilina-1. Possível viés de aferição no avaliação do controle local.</i>
	<i>Possíveis vieses de confusão já que não se realizou análise multivariada</i>
Study size	<i>Pacientes com câncer de pulmão não de pequenas células, com estádios I-IV</i>
	0
Quantitative variables	<i>Expressão de Cofilina-1.</i>
	1
Statistical methods	<i>(a) A análise estatística será realiza em ambiente R (R Core Team, 2013).</i>
	2 <i>Prevemos o uso de modelos de regressão de cox para testar a contribuição independente de cada variável sobre a mortalidade, bem como estratificação de curvas de mortalidade tipo Kaplan-Meier e análise de sobrevivência utilizando long-rank test</i>
	<i>(b) N/A</i>
	<i>(c) N/A</i>
	<i>(d) Cohort study— N/A</i>
	<i>Case-control study— N/A</i>
	<i>Cross-sectional study— N/A</i>
	<i>(e) N/A</i>

Continued on next page

Results	
Participants	<p>3* (a) <i>pacientes com câncer de pulmão não de pequenas células, com estádios I–IV, que receberam radioterapia exclusiva ou combinada com quimioterapia, dirigida à neoplasia brônquica, na unidade de radioterapia do HCPA, nos anos de 2009 a 2015.</i></p> <hr/> <p>(b) <i>N/A</i></p> <hr/> <p>(c) <i>N/A</i></p>
Descriptive data	<p>4* (a) <i>Nível de expressão de Cofilina-1</i></p> <hr/> <p>(b) <i>Estádio clínico</i></p> <hr/> <p>(c) <i>Performance Status</i></p>
Outcome data	<p>5* <i>Sobrevida Global, Controle Local</i></p> <hr/> <p><i>Case-control study— N/A</i></p> <hr/> <p><i>Cross-sectional study— N/A</i></p>
Main results	<p>6 (a) <i>Alta e Média expressao de cofilina-1 associadas a pior sobrevida</i></p> <hr/> <p>(b) <i>Controle local não se associou à cofilina-1</i></p> <hr/> <p>(c) <i>N/A</i></p>
Other analyses	<p>7 <i>N/A</i></p>
Discussion	
Key results	<p>8 <i>N/A</i></p>
Limitations	<p>9 <i>N/A</i></p>
Interpretation	<p>0 <i>A expressão de cofilina-1 está relacionada à sobrevida em pacientes com carcinoma brônquico tratados com radioterapia e existe uma tendência a melhor controle local com baixa expressão da proteína.</i></p>
Generalisability	<p><i>N/A</i></p>

---

1

---

Other information

---

Funding                      Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if  
2                      applicable, for the original study on which the present article is based

## 7.4 Anexo 4

### 7.4.1 Capítulo de livro publicado em “*Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition*”

# *CFL1*

Fernanda M. Lopes<sup>1,2</sup>, Juliano Cé Coelho<sup>1</sup>, Matheus H. Leal<sup>1</sup>, Richard B. Parsons<sup>2</sup>,  
Fabio Klamt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90035-003 Porto Alegre (RS) Brazil (00025267@ufrgs.br);

<sup>2</sup>Institute of Pharmaceutical Science, Kings’s College London, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, UK.

## Synonyms

*CFL1*

Cofilin-1 (Non-Muscle)

Cofilin-1, Non-Muscle Isoform

## Historical Background

Cofilin-1 is a major mediator of cytoskeleton dynamics as it regulates the remodeling of actin filaments (Carlier et al., 1999). It is ubiquitously expressed in all eukaryotes and has a

broad tissue distribution. In mammals, for instance, it can be found in the brain, gastrointestinal tract and lymphocytes. It was originally purified from avian and porcine brain as a 15-21 kDa globular protein with a core consisting of four or five beta-sheets surrounded by four or five alpha-helices. Its amino acid sequence and structure is highly conserved from yeast to human. *In vivo* and *in vitro* studies shows that cofilin-1 protein can exist as both a monomer and oligomer, due mainly to the presence of four cysteine residues (Cys 39, Cys 80, Cys 139 and Cys 147) which are potential targets for oxidation (Figure 1). This process can lead to disulfide bond formation, causing conformational changes in cofilin-1 (Bernstein & Banburg, 2010). Another important residue of cofilin-1 is Ser-3, which upon phosphorylation results in its inactivation (Yang et al., 1998). Besides actin dynamics, cofilin-1 is also involved in pathological processes.

### INSERT FIGURE 1

**Figure 1. Cofilin-1.** Representation of cofilin-1 structure (blue), highlighting the presence of the four cysteine residues and its interaction with monomeric actin (green). (Kindly generated by Prof. Dr. Hugo Verli/UFRGS).

#### 1. Physiology

##### - Actin dynamics

The major function of cofilin-1 is the regulation of actin dynamics. Actin is a family of globular proteins that form microfilaments as part of the cell cytoskeleton. Actin can be present either as a free monomer called G-actin or as part of linear polymer microfilament

called F-actin (Carlier et al., 1999). At steady state, F-actin grows at one end through ATP-loaded G-actin molecule association. At the opposite end of the filament, monomers undergo dissociation *via* the hydrolysis of ATP bound to ADP. To enter into a new polymerization cycle, ADP-loaded actin needs to exchange ADP for ATP.

Cofilin-1 controls actin dynamics by binding to both F-actin and G-actin. Studies have suggested that, depending on its concentration, cofilin-1 can promote assembly or disassembly of actin filaments (Bernstein & Banburg, 2010). When only a few cofilin-1 molecules are bound to F-actin, it leads to filament breakage. On the other hand, when the concentration of cofilin-1 is high, severing is no longer observed. In this case, there is dissociation from the pointed ends of the microfilament, which is related to cofilin-1's capacity to enhance Pi release and thus promote transformation of filaments to their ADP-loaded state. Furthermore, very high cofilin-1 concentration leads to increased nucleation and actin assembly promotion (Bernstein & Banburg, 2010).

Therefore, since actin dynamics plays a role in the control of cellular morphology, cell migration, cell division, endocytosis, intracellular transport and neuronal development, cofilin-1 is a fundamental protein in biological systems.

## 2. Regulation

Cofilin-1 has highly complex modes of regulation, which can lead to inactivation and activation, as well as changes in actin-binding affinity. Three mechanisms have been widely described: *(i)* phosphorylation, *(ii)* increase of the pH and binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), and *(iii)* oxidation. Evidence indicates that these three factors can also act in concert (Bernstein and Bamburg, 2010).

The best characterized mechanism of cofilin-1 regulation is the Ser-3 phosphorylation by LIM (1 and 2) or TES (testicles) kinases (TESK) (Arber et al., 1998) and its dephosphorylation by Slingshot phosphatase isoform 1 (SSH1) (Bernstein & Banburg, 2010). Phosphorylation of CFL1 results in protein inactivation and subsequent elimination of its actin-binding function (Arber et al., 1998). The phosphorylation of CFL1 is also mediated by upstream enzymes that regulates LIMK activity, such as Rho/Rac GTPases-PAK pathways (Yang et al. 1998). On the other hand, cofilin-1 is activated by dephosphorylation by SSH-1), which is activated by calcineurin, a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphatase (Wang et al., 2005).

Another regulation mechanism of cofilin-1 is the dissociation of PIP2 binding and the increase of pH levels. A study using yeast cofilin-1 showed that the PIP2 binding site is a large positively-charged surface that consists of residues in helix 3 as well as residues in other parts of the cofilin-1 molecule. Moreover, PIP2 binding overlaps F-actin binding sites, which can explain the decrease in actin activity upon PIP2 binding. The pH control of cofilin-1 activity is related to the deprotonation of His133 in the F-actin binding site. *In vitro*, its activity increased in neutral and alkaline pHs. However, these two mechanisms can interact with each other as when intracellular pH increases *via* the influx of  $\text{Na}^+$  and efflux of  $\text{H}^+$ , cofilin-1 is released from its PIP2 inhibitory binding.

Oxidative stress can also mediate the regulation of actin dynamics. A study using human T cells treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  demonstrated the formation of an intramolecular disulfide bridge between Cys-39 and Cys-80, causing a conformational change in the molecule. Furthermore, it was found that oxidized (and dephosphorylated) cofilin-1 is unable to regulate actin dynamics. Hence, although dephosphorylated cofilin-1 is able to bind to F-actin, oxidised cofilin-1 leads to its inactivation (Klemke et al., 2008). Studies have established the key role

of *CFL1* in oxidant-induced apoptosis in tumor cells (Klamt et al., 2009). Mechanistically, once oxidized, cofilin-1 translocates to the mitochondria where it induces swelling and cytochrome *c* release by mediating the opening of the permeability transition pore (PTP). Knockdown of endogenous *CFL1* using targeted siRNA inhibits oxidant-induced apoptosis, which is restored by re-expression of wild-type *CFL1* but not by *CFL1* containing Cys-to-Ala mutations (a non-oxidizable form of the protein). Thus, this data suggests that oxidized *CFL-1* mediates mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by oxidants in tumor cells.

### 3) Pathology

#### - Neurodegeneration

There is a link between impaired synaptic plasticity observed with both age and neurodegenerative diseases and the cofilin-1 pathway. Cofilin-1 is highly concentrated in the growth cone and dendritic spine of neurons. Overexpression of Cofilin-1 and its non-phosphorylatable S3A mutant can induce more growth cone-like waves and result in longer axons. On the other hand, overexpression of LIMK-1 disrupts the growth cone structure and axon elongation (Flynn et al., 2009). Thus, cofilin-1 may play a crucial role in synaptic plasticity through the regulation of the growth cone and spine dynamics *via* phosphorylation/dephosphorylation. Additionally, studies have shown that LIMK-1 knockout causes an abnormal elevation of CFL1 activity. This leads to the distortion of spine morphology and may be correlated with William's syndrome (Frangiskakis et al., 1996). Lastly, hyperphosphorylation of cofilin-1 results in a reduction in dendrite number, leading to the neurodegeneration found in Alzheimer's disease. Furthermore, cofilin-1 has also been shown to be present beside amyloid plaques in human brain (Heredia et al., 2006).



Recently, a growing body of evidence suggests that actin/cofilin-1 rod formation (aggregates composed primarily of actin and cofilin-1) may be a central initiation step for neurodegeneration. Actin/cofilin-1 rods can be generated by the excessive expression of active *CFLI* and by cellular stress. Cofilin-1 oxidation may directly facilitate actin/cofilin-1 rod formation by the actin bundling activity of cofilin-1 oligomers or by the impairment of cofilin-1 phosphorylation. In neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, neuronal cytoplasmic rods accumulate within neurites, where they disrupt synaptic function and are a likely early cause of synaptic loss without neuronal loss (Bamburg and Bernstein, 2016) (Schönhofen et al., 2014).

#### - Cancer

Cell motility is the cornerstone event of the invasion and metastasis found in aggressive cancers. It is clear in cancer models that the activation of the motility cycle is required for cell migration and invasion, tumor progression and metastasis. In this scenario, cofilin-1 arises as a key player in cell migration, contributing in actin polymerization and in the formation of free barbed ends. The ability of cofilin-1 to interact with the actin cytoskeleton molecules suggests it has a direct role in the processes of cell polarity, migration and chemotaxis (Wang et al., 2007).

The importance of cofilin-1 in cancer cell motility and migration, plus its role in oxidants-induced apoptosis, suggests that this protein is a marker of an aggressive cancer phenotype (Wang et al., 2007) (Müller et al., 2011). Moreover, cofilin-1 has been associated with chemotherapy resistance, especially towards alkylating drugs and as such is a possible target for cancer treatment (Castro et al., 2010) (Becker et al., 2013).

Several *in vitro* and *in vivo* studies have correlated the expression of cofilin-1 with the potential for tumor cells to migrate and generate metastases. An imbalance of this pathway has been described for different tumors, including breast, lung, ovarian, head and neck, melanoma, gastrointestinal, genitourinary and central nervous system tumors. Several studies, including meta-analysis of microarray data, cultures of human cancer cell lines, and small clinical retrospective cohorts, have demonstrated that aggressive cancer behavior correlates with high expressions levels of cofilin-1, with similar results in the different tumors studied. As such, cofilin-1 expression levels may be a useful tool for discriminating between high and low aggressiveness tumors, and possibly between good and bad prognoses (Castro et al. 2010).

A current challenge in the modern era of oncology is the concept of personalized medicine. In this setting, targeted treatments to driver molecules are becoming the focus of therapeutic intervention, and several drugs have already being approved for use in clinical practice. The first study of cofilin-1 as a target for cancer treatment was undertaken in human breast cancer cells and a cancer metastasis xenograft models. JG6, a novel marine-derived oligosaccharide, was used to bind to cofilin-1 and inhibit cofilin-actin turnover by disrupting their interaction. JG6 was the first compound to demonstrate a positive effect in the inhibition of cell migration and prevention of cancer cell metastases. It is important to point out that JG6 effects was dependent of high levels of cofilin-1 and did not had an inherent cytotoxic effect (Huang et al., 2014).

Although tumor aggressiveness and its potential to generate metastasis are very important tumor characteristics, chemoresistance is also a major issue in the clinical setting. Two studies in lung cancer and one in an ovarian cell lines attempted to correlate cofilin-1 expression and chemotherapeutic resistance. Analysis of microarray data

obtained from 6 human non-small cell lung cancer cell lines with different degrees of cofilin-1 expression revealed a positive correlation between high levels of *CFLI* mRNA and resistance against different anticancer drugs. When these cell lines were exposed to different concentrations of chemotherapy drugs, resistance to alkylating agents (cisplatin and carboplatin) was observed (Castro et al. 2010). This correlation was validated in another study with lung cancer adenocarcinoma cell lines where cofilin-1 was overexpressed and drug sensitivity/resistance was evaluated (Becker et al. 2013). Another study using ovarian cell lines cancer evidenced that taxol-resistant cells had a higher expression level of cofilin-1 showed an upregulation of the protein in the taxol-resistant samples (Li et al. 2013).

Studies have also shown that cofilin-1 expression confers radiation resistance in tumors. Lee and colleagues demonstrated that high cofilin-1 expression enhanced cellular radiosensitivity in H1299 cells (non-small cell lung carcinoma), which is possibly due to reduced capacity to repair double-strand breaks in DNA (Lee et al., 2005). At the same time, Wei et al reported that cofilin-1, among other proteins, could predict multidrug resistance (MDR) and elevated radioresistance (RDR) (Wei et al., 2012). This study consisted of the irradiation of A549 lung cancer cell cultures with 6 MV photon beams of different doses, following evaluation of upregulated proteins by immunohistochemistry. The evaluation of radiation response of astrocytomas indicated that cofilin-1 might be involved in the radioresistant phenotype. All the data correlating cofilin-1 and cancer clearly demonstrate a positive link between high expression levels of the protein and a more aggressive cancer phenotype. This relationship can be observed in different tumors subtypes, both in microarray data and in culture cell. The major challenge now is to translate all these laboratory data to the clinical setting. It is imperative to further

investigate cofilin-1 as a candidate for cancer treatment and also to obtain a better understanding of its role in the mechanisms of chemoresistance and radiation response.

## Summary

Cofilin-1 is one of the major proteins responsible in cell migration, playing a key role in actin filament dynamics. The regulation mechanisms of this protein are phosphorylation (inactivation)/dephosphorylation (activation), *via* LIM kinase/TESK and SSH, subcellular localization, pH and oxidation of its internal cysteine residues. Since actin dynamics plays a role in morphology, cell migration, cell division, endocytosis, intracellular transport and neuronal development, cofilin-1 is a fundamental protein in biological systems. Moreover, imbalance in the physiology of this protein plays a major role in several pathological processes, such as neurodegenerative diseases and cancer.

## References

1. Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Nov 26 [cited 2016 Aug 24];274(48):33827–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567336>
2. Bernstein BW, Bamburg JR. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* [Internet]. NIH Public Access; 2010 Apr [cited 2016 Aug 24];20(4):187–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133134>
3. Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* [Internet]. 1998 Jun 25 [cited 2016 Mar 22];393(6687):809–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655398>

4. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* [Internet]. 1998 Jun 25 [cited 2016 Feb 16];393(6687):805–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655397>
5. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2016 Feb 20];280(13):12683–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671020>
6. Klemke M, Wabnitz GH, Funke F, Funk B, Kirchgessner H, Samstag Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity* [Internet]. 2008 Sep 19 [cited 2016 Aug 24];29(3):404–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771940>
7. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2016 Mar 23];11(10):1241–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3393095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Flynn KC, Pak CW, Shaw AE, Bradke F, Bamberg JR. Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2016 Mar 22];69(12):761–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, et al. LIM-kinase1 hemizygosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* [Internet]. 1996 Jul 12 [cited 2016 Mar 22];86(1):59–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8689688>
10. Heredia L, Helguera P, de Olmos S, Kedikian G, Solá Vigo F, LaFerla F, et al. Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Jun 14 [cited 2016 Mar 22];26(24):6533–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775141>

11. Bamburg JR, Bernstein BW. Actin dynamics and cofilin-actin rods in Alzheimer disease. *Cytoskeleton (Hoboken)* [Internet]. 2016 Feb 13 [cited 2016 Mar 23]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26873625>
12. Schönhofen P, de Medeiros LM, Catain CP, Bristot IJ, Klamt F. Cofilin/actin rod formation by dysregulation of cofilin-1 activity as a central initial step in neurodegeneration. *Mini Rev Med Chem* [Internet]. [cited 2016 Aug 24];14(5):393-400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813767>
13. Wang W., Eddy R., Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007 Jun 7 [cited 2016 Aug 24];(6):429-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522712>
14. Müller CB, de Barros RL, Castro MA, Lopes FM, Meurer RT, Roehe A, et al. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. *J Cancer Res Clin Oncol.* [Internet] 2011 Sep [cited 2016 Aug 24];137(9):1309-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735353>
15. Castro MAA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, Soares M, Müller CB, Lopes FM, et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2016 Mar 22];116(15):3645–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564088>
16. Becker M, De Bastiani MA, Müller CB, Markoski MM, Castro MA, Klamt F. High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas. *Tumour Biol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Mar 22];35(2):1233-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018823>
17. Huang X, Sun D, Pan Q, Wen W, Chen Y, Xin X, Huang M, Ding J, Geng M. JG6, a novel marine-derived oligosaccharide, suppresses breast cancer metastasis via binding to cofilin. *Oncotarget* [Internet]. 2014 Jun 15 [cited 2016 Mar 22];5(11):3568-78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003327>
18. Li M, Yin J, Mao N, Pan L. Upregulation of phosphorylated cofilin 1 correlates with taxol resistance in human ovarian cancer in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* [Internet]

- 2013 Jan;29 [cited 2016 Mar 22];(1):58-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064469>
19. Lee Y-J, Sheu T-J, Keng PC. Enhancement of radiosensitivity in H1299 cancer cells by actin-associated protein cofilin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2005 Sep 23 [cited 2016 Aug 26];335(2):286–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061204>
20. Wei R, Zhang Y, Shen L, Jiang W, Li C, Zhong M, et al. Comparative proteomic and radiobiological analyses in human lung adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Aug 26];359(1-2):151–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822689>

## 7.4.2 Carta de aceite do livro

Correio :: Caixa de Entrada: Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition – Contribution: Cofilin-1

9/5/16, 4:43 PM

---

**Data:** Sun, 4 Sep 2016 09:27:43 +0200 [04-09-2016 04:27:43 BRT]

---

**De:** Springer Editorial Platform <meteor.info@springer.com>

---

**Para:** fabio.klamt@ufrgs.br

---

**Cc:** tina.shelton@springer.com, vasowati.shome@springer.com

---

**Responder para:** sangdunchoi@ajou.ac.kr

---

**Assunto:** Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition – Contribution: Cofilin-1

---

Dear Dr. Klamt,

Congratulations! The Editorial Board has **accepted** your manuscript "**Cofilin-1**".

The manuscript will soon be put into production and in a few weeks the first author of this chapter will receive the proofs for review where you can make any corrections if necessary.

With thanks and best regards,  
*Sangdun Choi, Ph.D/Professor*  
*Editor, Encyclopedia of Signaling Molecules*

---