

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COMBINADA COM CATALASE NA EFICÁCIA  
DE DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS EM ADENOCARCINOMA DE  
PULMÃO**

VALESKA AGUIAR DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COMBINADA COM CATALASE NA EFICÁCIA  
DE DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS EM ADENOCARCINOMA DE  
PULMÃO**

ALUNO: VALESKA AGUIAR DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO KLAMT

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, como requisito  
para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biológicas: Bioquímica.

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2014.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (laboratório 24), Departamento de Bioquímica Prof. Tuiscon Dick do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Fabio Klamt, um grande apaixonado pela pesquisa, pela confiança em mim depositada, oferecendo a oportunidade para realizar esse trabalho. Também pela amizade, dedicação e preocupação, não apenas com os resultados, mas também com as coisas da vida.

À Fernanda Lopes, minha “soul sister” que desde o meu primeiro momento no laboratório me recebeu carinhosamente. SEMPRE disponível a ajudar e solucionar qualquer que fosse o imprevisto. Fê te agradeço muito por toda a parceria, e por tudo que me ensinou, por todos os galhos quebrados, mas principalmente pela amizade. Com certeza tu és iluminada e teu sucesso está garantido, pois és muito inteligente e competente. Ainda, agradeço por tornar todo trabalho uma diversão e aturar meu “bom humor”. Pode contar sempre comigo e espero levar essa amizade para o resto da vida, love you!

Ao Leonardo Motta, agradeço pela imensa contribuição nas discussões e na realização de boa parte desse trabalho. “Bem ou mal”, tua ajuda foi importantíssima.

À soul sister “Laina”, grande amiga, sempre contribuindo muito nas discussões científicas e dos problemas da vida. Love you, too!

Ao Rochezinho, amigo querido, inteligentíssimo e nosso professor querido. Certamente sem tuas aulas de dois anos atrás eu não estaria aqui hoje. Que nossa amizade permaneça!

À Lili, parceira de IC desde o início. Obrigada por muiitos galhos quebrados, e muitos feriados e finais de semanas divertidos, seja no lab ou nas “confraternizações”.

Aos colegas do Lab 24, Pati, Ivi, Mery, Marco, Cassio, Sandro, Bem-Hur, Rico, por aturarem meu “ótimo humor” matinal e alto limiar de paciência, tornando meus dias MUITO mais alegres e também por de uma forma outra sempre ajudarem. Certamente a companhia diária de vocês é um dos principais estímulos pra trabalhar.

Aos meus pais Junior e Lisiane, por todo o sacrifício que sempre fizeram para que hoje eu estivesse aqui. Por todo incentivo para seguir estudando e por todas as oportunidades que me deram, por toda a confiança que em mim depositaram, por todo amor e dedicação.

Aos meus avós Otamiro e Carminha, meus segundos pais. Agradeço por todo amor e educação que sempre me deram. Por me mostrarem a importância de se ter disciplina e bom caráter, e principalmente, por toda a dedicação na minha criação. Também quero agradecer aos meus avós José e Elza, que me acolheram e ampararam em uma nova etapa da minha vida, sempre apoiando e incentivando a seguir batalhando.

Ao meu namorado Joce, por me apoiar sempre, incentivando a seguir em frente, por toda parceria, por toda compreensão, por toda paciência com minha falta de tempo, por todo carinho e amor.

À toda minha família que sempre me apoiou, agradeço muito por todo amor, preocupação e compreensão quando, muitas vezes, estive ausente. Com certeza, sem vocês eu nada seria.

## ÍNDICE

<b>Parte I:</b> .....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	5
Lista de abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	9
1.1 Câncer de pulmão.....	9
1.2 Quimioterapia.....	10
1.2.1 Cisplatina.....	11
1.2.2 Paclitaxel.....	15
1.2.3 5-Fluorouracil .....	16
1.2.4 Hidroxiuréia.....	17
1.2.5 Daunorrubicina.....	17
1.3 Câncer de Pulmão e Metabolismo Redox.....	18
1.4 NFκB.....	22
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivos Gerais.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
<b>Parte II:</b> .....	25
3. Resultados.....	26
3.1. Manuscrito submetido para publicação.....	27
<b>Parte III:</b> .....	61
4. Discussão.....	62
5. Conclusão.....	71
6. Referências Bibliográficas.....	72

## **PARTE I**

## RESUMO

O câncer de pulmão permanece a neoplasia mais letal com cerca de 1,59 milhões de mortes por ano em todo o mundo, com eficácia terapêutica limitada e mau prognóstico. Aproximadamente 80 % dos casos são de câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), desses, cerca de 50 % são os adenocarcinomas (AdC). Atualmente o tratamento padrão-ouro no tratamento de AdC pulmonar é baseado em agentes de platina (cisplatina, carboplatina) normalmente administrados em combinação com outros agentes, entretanto a doença é raramente curável. Vários fatores contribuem para a alta taxa de mortalidade e um dos mais comuns é a quimioresistência. Portanto, existe uma necessidade urgente de terapias mais eficazes em aumentar a sobrevida global dos pacientes com essa patologia. Tendo em vista que o desenvolvimento de novos medicamentos requer muito tempo e investimento financeiro, o uso de drogas existentes como terapia combinada torna-se uma boa abordagem.

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que a agressividade do AdC de pulmão está associada com elevado estresse oxidativo onde o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) tem um papel crucial, uma vez que o tratamento com a enzima antioxidante catalase (CAT) atenuou a agressividade do tumor. Assim, este estudo avaliou a eficácia da terapia combinada com CAT na linhagem celular A549 de AdC humano. Primeiramente, a adição de CAT causou uma inibição dose-dependente da proliferação celular com um efeito máximo na dose de 1000 U/mL. Essa inibição foi relacionada a um efeito citostático, não citotóxico, do consumo de  $H_2O_2$  intracelular, já que a retirada da CAT restaurou a taxa proliferativa celular a níveis de controle. Após, a avaliação do “status” de ativação do  $NF\kappa B$  mostrou um aumento de 2,9 vezes no imunocontéudo citosólico da subunidade p65, sugerindo uma diminuição da ativação do  $NF\kappa B$  em células tratadas com CAT. A análise do efeito do tratamento de CAT em parâmetros redox mostrou uma redução nos níveis intracelulares de tióis (-SH) e no potencial antioxidante total (TRAP) e um aumento na produção de  $H_2O_2$  e nos níveis de glutathiona (GSH). Entre as drogas testadas (Cisplatina, 5-Fluorouracil, Paclitaxel, Hidroxiuréia e Daunorrubicina), apenas o tratamento com paclitaxel e hidroxiureia mostraram aumento da produção de  $H_2O_2$  quando comparados com o veículo. No entanto, o co-tratamento com CAT e paclitaxel não alterou a produção de  $H_2O_2$ . Hidroxiuréia e CAT promoveu uma redução na produção de  $H_2O_2$ , quando comparado com a droga sozinha. A cisplatina, por si só não teve efeito na produção de  $H_2O_2$ , mas cisplatina e CAT promoveram um aumento na produção de  $H_2O_2$ . A eficácia da terapia combinada com CAT em potencializar a citotoxicidade dos quimioterápicos, foi analisada pelo ensaio SRB e pelo software CalcuSyn®. Pela análise dos valores de “Combination Index” (CI) observamos que, com a exceção da combinação de CAT e paclitaxel, que gerou antagonismo, as combinações de CAT com cisplatina, 5-fluorouracil e



hidroxiuréia exibiram um efeito sinérgico na eliminação de células da linhagem de AdC humano A549.

Dessa forma, os dados aqui apresentados sugerem que a terapia combinada de CAT com cisplatina, 5-fluorouracil e hidroxiuréia pode surgir como uma nova estratégia terapêutica para o AdC.

Palavras chave: A549, câncer de pulmão, catalase, agressividade do tumor, quimioterapia combinada

## ABSTRACT

Lung cancer remains the most lethal malignant disease with nearly 1.59 million deaths annually worldwide, limited efficacy of current therapeutics and dismal prognostic. Approximately 80% of the cases are non-small cell lung cancer (NSCLC), of these, roughly 50% are adenocarcinomas (AdC). Currently, the gold standard treatment for AdC is based on platinum agents, usually given in combination with other agents. Despite these therapies, the disease is rarely curable. Several factors contribute to the high mortality rate and one of the most common includes tumor cell chemoresistance to cytotoxic drugs. Therefore, there is an urgent need for more effective therapies that could increase the overall survival of lung AdC patients. With the notion that the development of novel drugs require much time and financial investment, the use of existing drugs as adjuvant treatment becomes a good approach.

Previous studies of our group demonstrated that lung AdC aggressiveness is associated with elevated intracellular oxidative stress, in which hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) plays a crucial role, since the exogenous treatment with the antioxidant enzyme catalase (CAT) attenuated tumor aggressiveness. Then, this study evaluated the efficacy of CAT adjuvant treatment in the human AdC cell line A549. Firstly, exogenous addition of CAT caused a dose dependent inhibition on cellular proliferation with a maximal dose effect of 1000 U/mL. Growth inhibition was related to a cytostatic, not cytotoxic, effect of intracellular  $H_2O_2$  consumption, since CAT washout readily restored cellular proliferative rate similar to control. After that, evaluation of  $NF\kappa B$  activation status showed a 2.9-fold increase in the cytosolic immuncontent of the  $NF\kappa B$  subunit p65, suggesting a decreased  $NF\kappa B$  activation in CAT-treated cells. Analysis of CAT treatment effect in redox parameters showed decreased intracellular thiol levels (-SH) and non-enzymatic antioxidant potential (TRAP) and increases the  $H_2O_2$  production and glutathione levels (GSH). Among drugs tested (cisplatin, paclitaxel, 5-fluorouracil, daunorubicin, hydroxyurea) ( $GI_{50}$ ), only paclitaxel and hydroxyurea showed increased production of  $H_2O_2$  when compared with vehicle. However, co-treatment with CAT and paclitaxel had no alteration in the  $H_2O_2$  production. Hydroxyurea plus CAT had a decreased in  $H_2O_2$  production when compared with the drug alone. Cisplatin, alone had no

effect in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, but cisplatin plus CAT, had an increased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Regarding the effectiveness of adjuvant CAT treatment in potentiate chemotherapeutic drugs cytotoxicities, we used de SRB assay and CalcuSyn Software to access this interaction. From analyzes of combination index (CI) values, generated by CalcuSyn, we observed that with the exception of CAT plus paclitaxel, all combinations exhibited a synergistic effect.

Taken together, data presented here suggest that adjuvant CAT treatment can act synergistically with chemotherapeutics and modulate tumor-associated signaling pathways providing a new therapeutic strategy for AdC therapy.

Key words: A549, lung cancer, catalase, tumor aggressiveness, adjuvant chemotherapy.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CPNPC: câncer de pulmão de não-pequenas células

CPPC: câncer de pulmão de pequenas células

AdC: adenocarcinoma;

ER: espécies reativas

ERO: espécies reativas de oxigênio

RL: radicais livres

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio;

CAT: catalase;

ARE: antioxidant responsive element

GSH: glutationa reduzida

GST: glutationa-S-transferase

SOD: superóxido dismutase

SOD2: superóxido dismutase 2

MnSOD: superóxido dismutase manganês

TRAP – potencial antioxidante reativo total

SH: grupos sulfidril

NFκB: fator nuclear kappa B

Cisp: cisplatina

5-FU: 5-Fluorouracil

PT: paclitael

Dauno: daunorrubicina

HU: hidroxiuréia

TTP: trifosfato de timidina

F-UMP: 5-fluoroxiuridina

AP-1: activator Protein-1

MMP: metaloproteinases de matriz

NER: reparo por excisão de nucleotídeos

ABC: ATP binding cassette

MRP: multidrug resistance protein

MMR: mismatch repair

ERCC1: excision repair cross-complementing 1

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 and 2

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

JNK: c-Jun N-terminal kinase

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

c-FLIP: Cellular FLICE-like inhibitory protein

EGFR: epidermal growth factor receptor

SRB - sulforodamina B;

SFB: soro fetal bovino

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer de Pulmão**

O câncer de pulmão permanece uma doença altamente letal, sendo a causa mais comum de morte relacionada ao câncer. Atualmente é responsável por aproximadamente 1,59 milhões de mortes por ano em todo mundo (World Health Organization, 2014). No Brasil é o mais comum de todos os tumores malignos, possuindo uma estimativa de 27 mil novos casos de câncer de pulmão em 2014 (INCA, 2014).

Devido a sintomatologia dos estágios iniciais não ser evidente (McWilliams, MacAulay, Gazdar and Lam 2002), a detecção precoce torna-se difícil, refletindo diretamente nas taxas de mortalidade pois quando o diagnóstico é realizado em estágios avançados normalmente o tumor não pode ser removido e a quimioterapia associada ou não à radioterapia (Ramalingam and Belani 2008) é utilizada, porém com eficácia reduzida (Beasley, Brambilla and Travis 2005). Ou seja, apesar dos progressos no diagnóstico e tratamento, o prognóstico do câncer de pulmão permanece extremamente ruim, e o arsenal terapêutico incapaz de melhorar o prognóstico dos pacientes com CPNPC (Subramanian and Govindan 2007), dos quais a sobrevida média cumulativa total em 5 anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

Exposição a agentes químicos, fatores dietéticos, doença pulmonar obstrutiva crônica e fatores genéticos estão entre os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão (INCA, 2014). Porém, o tabagismo é o principal, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos. O risco de desenvolver câncer de pulmão em fumantes é cerca de 20 a 30 vezes maior do

que em não fumantes (Jamnik, Santoro, Borges, Uehara and da Silva 2009). Com isso, o câncer de pulmão tornou-se uma das principais causas de morte evitáveis (INCA, 2014).

Existem dois principais tipos de câncer de pulmão com origem epitelial: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) (Mountzios, Dimopoulos, Soria, Sanoudou and Papadimitriou 2010). Este último é um tipo menos agressivo quando comparado ao CPPC, no entanto, compreende aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão (Sher, Dy and Adjei 2008) e é dividido em três principais subtipos histológicos: adenocarcinoma (AdC), carcinoma de células grandes e carcinoma epidermóide (Beadsmoore and Screatton 2003, Beasley, et al. 2005).

## **1.2 Quimioterapia**

Como citado anteriormente, os estágios iniciais são assintomáticos e o AdC pulmonar é normalmente diagnosticado tardiamente. Para esses pacientes a quimioterapia constitui a base do tratamento, sendo normalmente paliativo e crítico para determinar sua sobrevivência e qualidade de vida.

Atualmente, o tratamento padrão-ouro de AdC é baseado em agentes platinados como cisplatina, carboplatina ou oxaliplatina e normalmente é administrado em combinação com outros agentes como paclitaxel e etoposide, por exemplo. Infelizmente, apesar desses tratamentos, a doença ainda possui um mau prognóstico, sendo a intervenção raramente curativa (Ramalingam, et al. 2008). Vários fatores contribuem para a alta taxa de mortalidade, entre os

mais comuns está a quimioresistência das células tumorais aos agentes citotóxicos.

A quimioresistência pode ser inata ou adquirida e pode aplicar-se a um único agente ou a uma classe de agentes antineoplásicos com mecanismos de ação semelhantes. Além disso, a quimioresistência também é um aspecto que contribui para a agressividade tumoral. Portanto, existe uma necessidade urgente de terapias mais eficazes, drogas ou tratamentos que possam ajudar a aumentar a taxa de sobrevida desses pacientes. Tendo em vista que o desenvolvimento de novos medicamentos requer muito tempo e investimento financeiro, o uso de drogas existentes como terapia combinada torna-se uma boa abordagem, uma vez que as combinações de duas drogas são o esteio da terapia sistêmica para AdC (Ramalingam, et al. 2008).

### **1.2.1 Cisplatina**

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina) (Cis) é um agente alquilante a base de platina. Constituída por um complexo inorgânico neutro e planar que reage com o DNA para induzir efeitos biológicos característicos, os quais podem ser de ativação dos mecanismos de reparo do DNA, com consequente sobrevivência celular, ou de ativação irreversível das cascatas apoptóticas (Rabik and Dolan 2007). Sua principal ação citotóxica se dá por ligações covalentes nos sítios nucleofílicos N7 das purinas de DNA para formar interações proteína-DNA, ligações cruzadas inter e intrafitas e monoadutos com o DNA (Eastman and Barry 1987, Siddik 2003, Rabik, et al. 2007) afetando, assim, a replicação do DNA e sendo essas as principais lesões responsáveis pela morte celular (Siddik 2003). Estudos relatam que a morte



celular por apoptose também ocorre pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela cisplatina (Wang, et al. 2008).

Contudo, para que a cisplatina interaja com o DNA é necessário uma série de reações espontâneas para que a cisplatina seja ativada. A forma resultante é altamente reativa, não apenas com seu alvo de interesse, mas também com nucleofílicos endógenos como a glutathione (GSH), o resíduo metionina, e proteínas como a melatonina, (Kartalou and Essigmann 2001, Rabik, et al. 2007)

Estudos de meta-análise de vários ensaios clínicos randomizados demonstraram que a quimioterapia baseada em cisplatina estava associada a uma taxa de sobrevivência de 1 ano (Ramalingam, et al. 2008). Por esse motivo, agentes alquilantes começaram a ser combinados com outros medicamentos no intuito de melhorar a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes.

Uma das principais limitações do tratamento com cisplatina é a aquisição de resistência a esse quimioterápico. Com isso, a droga pode não interagir com o DNA ou haver interferência na ativação da resposta aos efeitos citotóxicos, ou ambos os processos. Entre os principais mecanismos envolvidos nessa resistência estão: a redução do acúmulo intracelular da droga, maior inativação intracelular da droga e aumento na eficiência do reparo ao DNA.

*Redução do Acúmulo Intracelular da Droga:* inibição da captação da droga, aumento no efluxo da droga, ou ambos estão relacionados a redução no acúmulo intracelular de cisplatina em células resistentes. No contexto do aumento no efluxo da cisplatina estão incluídas várias proteínas

transmembrana, em especial proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MDR, MRP e BCRP) da família de transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*). No CPNPC, o grupo de proteínas MRP, composto de pelo menos 7 membros (MRP1-7), foram os principais alvos de investigação (Borst, Evers, Kool and Wijnholds 2000). No entanto, apenas MRP2 (cMOAT) parece estar envolvida na resistência à cisplatina (Siddik 2003). Observa-se, portanto, que o mecanismo de redução do acúmulo intracelular da droga está fortemente associado com a resistência de diversas linhagens tumorais, não somente contra cisplatina, mas também contra diversos outros fármacos utilizados na clínica.

*Aumento da Inativação Intracelular da Droga por Moléculas Contendo Tióis:* as reações de inativação da cisplatina podem ser espontâneas, devido à alta reatividade da molécula de cisplatina após hidratação no meio intracelular, ou catalisadas por enzimas, como glutathione S-transferases e o sistema de peroxiredoxinas (Tew 1994, Pedersen, Larsen, Stoltenberg and Penkowa 2009). A cisplatina pode ser inativada por inúmeros constituintes citoplasmáticos, incluindo a abundante molécula nucleofílica glutathione (GSH) e as metalotioneínas ricas em cisteínas ativas.

Uma vez que as metalotioneínas são ricas em cisteínas, os quais são centros de interação ideais para a cisplatina, não é inesperado que aumentos nos níveis celulares de metalotioneínas tenham sido observados em modelos celulares de resistência à cisplatina. Da mesma maneira, concentrações elevadas de moléculas contendo tiol produzem resistência por diminuir os níveis de agente antitumoral disponível para interação com o DNA. Elevações na quantidade de GSH intracelular podem ocorrer como resultado de um

aumento de expressão do gene de  $\gamma$ -glutamilcisteíno sintetases ( $\gamma$ -GCS), cujo produto é uma enzima limitante na biossíntese de GSH (Siddik 2003). Esse aumento no conteúdo de GSH foi demonstrado em vários modelos tumorais de resistência à cisplatina, e confirmados em estudos clínicos.

Devido a alta reatividade da cisplatina aquosa sua interação com GSH pode ocorrer de uma maneira não enzimática. Porém, a reação de conjugação da cisplatina com GSH também pode ser catalisada pela glutathione S-transferase  $\pi$  (GST $\pi$ ), a qual é membro de uma família de enzimas envolvidas nas reações de detoxificação de xenobióticos. O aumento na expressão de GST $\pi$ , junto com elevados níveis de GSH em células tumorais resistentes, sugerem que a inativação enzimática da cisplatina contribui significativamente para o fenótipo em nível clínico e o aumento nas reações de conjugação entre GSH e cisplatina são geralmente aceitas como um fator significativo na resistência (Siddik 2003).

*Aumento da Eficácia dos Mecanismos de Reparo ao DNA:* para que a indução do efeito citotóxico da droga culmine em apoptose da célula tumoral, é crucial que haja a formação e a persistência dos adutos resultantes da interação entre a cisplatina ativada e o DNA. Dessa forma, um aumento na taxa de reparo desses adutos atenuaria o processo apoptótico. Este aumento, mesmo que limitado é considerado como significativo uma vez que a inativação dos adutos é em grande parte devido ao reparo do DNA. A principal via para remoção do dano ao DNA pela cisplatina é o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, ou NER (do inglês “nucleotide excision repair”). Dentre as 17 diferentes proteínas que compõem o sistema NER, parece que o aumento de

expressão de somente algumas proteínas-chave é necessário para aumentar a capacidade de reparo em células tumorais. Dentre as principais proteínas descritas estão ERCC1 ou o complexo ERCC1/XPF e XPA (Siddik 2003).

Além do NER, o sistema de reparo de mau pareamento, ou MMR (do inglês “mismatch repair”) também parece estar envolvido na resistência à cisplatina. Entretanto, esse sistema atua no reconhecimento de dano, apresentando um papel crítico na manutenção da integridade do genoma durante a replicação, e não participa ativamente no reparo de adutos de cisplatina. Uma hipótese proposta é de que o MMR reconhece a lesão causada pela droga e inicia a cascata de indução de apoptose. Dessa forma, se houver um defeito ou perda de eficácia desse sistema, o sinal de apoptose mediado pelo MMR deixa de existir e isso confere a resistência observada (Fink, Aebi and Howell 1998, Martin, Hamilton and Schilder 2008). Além disso, para manter a estabilidade genômica, é vital que o reparo do DNA ocorra antes da replicação. Contudo, a resistência advém quando as células aumentam sua capacidade de replicar o DNA passando o aduto e, então, iniciando o reparo no período pós-replicação. Isto aumenta a habilidade das células tumorais de tolerar altos níveis de DNA danificado induzido por cisplatina. É notável que o aumento da tolerância para os adutos de DNA não somente está ligada à deficiência no sistema MMR, mas também ocorre acompanhada de uma má função da proteína p53. De fato, uma disfunção na p53 exacerba a resistência à cisplatina em células tumorais deficientes em MMR (Siddik 2003).

### **1.2.2 Paclitaxel**

Originalmente obtido da *Taxus brevifolia*, o paclitaxel (PT) possui atividade antineoplásica por induzir a formação de dímeros de tubulina e

consequentemente a agregação dos microtúbulos. Estando os microtúbulos estabilizados não ocorre os ciclos de despolimerização, resultando em inibição da mitose e, portanto da divisão celular. No entanto, um dos mecanismos de resistência a esse agente antineoplásico se dá justamente por uma falha na indução da estabilização dos microtúbulos. Porém, as vias moleculares a cerca da estabilização de microtúbulos do fuso, levando à morte das células permanecem pouco compreendidos. Ainda, estudos demonstraram que o PT induz a produção de ER e que o  $H_2O_2$  está envolvido na morte celular induzida por essa droga (Alexandre, Hu, Lu, Pelicano and Huang 2007). Além disso, a administração de antioxidantes levou a uma redução na suscetibilidade de células de câncer de mama a essa droga, sugerindo que a produção de ER estaria entre os mecanismos de ação do PT (Panis, et al. 2012). Outros estudos sugerem que a ativação do  $NF\kappa B$  também seria um mecanismo de resistência à essa droga, uma vez que esse fator de transcrição regula diversas vias, inclusive anti-apoptóticas (Nakanishi and Toi 2005).

### **1.2.3 5-Fluorouracil**

Análogo do nucleosídeo de pirimidina, o 5-fluorouracil (5-FU) é um antimetabolito com atividade antineoplásica via diferentes mecanismos de ação. *In vivo*, o fluorouracil é convertido no metabolito ativo monofosfato de 5-fluoroxiuridina (F-UMP), substituindo o uracil, F-UMP incorpora no RNA e inibe o processamento do RNA, inibindo assim o crescimento celular. Outro metabolito activo, 5-5-fluor-2'-desoxiuridina-5'-O-monofosfato (dUMP-F), inibe a timidilato sintase, resultando numa depleção de trifosfato de timidina (TTP), um dos quatro trifosfatos de nucleótidos utilizados nas síntese *in vivo* de DNA. Outros metabolitos fluorouracil incorporam no RNA e DNA, a incorporação no

RNA resulta em maiores efeitos tanto sobre as funções quanto processamento (Mojardín, Botet, Quintales, Moreno and Salas 2013). Os mecanismos moleculares de resistência à essa droga ainda não estão bem elucidados. Sugere-se que possa ser via ativação do fator de transcrição NFκB (Nakanishi, et al. 2005). Ainda, dados sugerem que a sensibilidade ao 5-FU também esteja relacionada com os níveis de expressão da enzima dihidropirimidina desidrogenase, com o estado genético de p53 e com o sistema de reparo de mau pareamento ou MMR (do inglês “mismatch repair”) (Wang, Cassidy, O'Brien, Ryan and Collie-Duguid 2004).

#### **1.2.4 Daunorrubicina**

A daunorrubicina (Dauno) é uma antraciclina com atividade antibiótica e antineoplásica. Sua citotoxicidade ocorre através de sua interação com o DNA via inibição da topoisomerase II, inibindo, assim, a replicação e reparo do DNA e síntese de RNA e de proteínas (National Cancer Institute, 2014). Seus mecanismos de resistência também não estão bem elucidados. No entanto, alguns estudos relacionam sua resistência a ativação do fator de transcrição NFκB (Nakanishi, et al. 2005).

#### **1.2.5 Hidroxiuréia**

Classificada como antimetabolito, a hidroxiuréia (HU) começou a ser utilizada como agente antitumoral por volta de 1960. Apesar de não ter mecanismos de ação bem elucidados, sabe-se que essa droga atua inibindo seletivamente a enzima ribonucleosido difosfato redutase, necessária para converter difosfatos de ribonucleosidos em difosfato de desoxirribonucleosidos, impedindo assim síntese de DNA (Saban and Bujak 2009), sem interferir na

síntese de RNA e proteínas. Este agente também exibe atividade radiosensibilizante pela manutenção de células em fase G1 e interferindo com a reparação do DNA (National Cancer Institute, 2014).

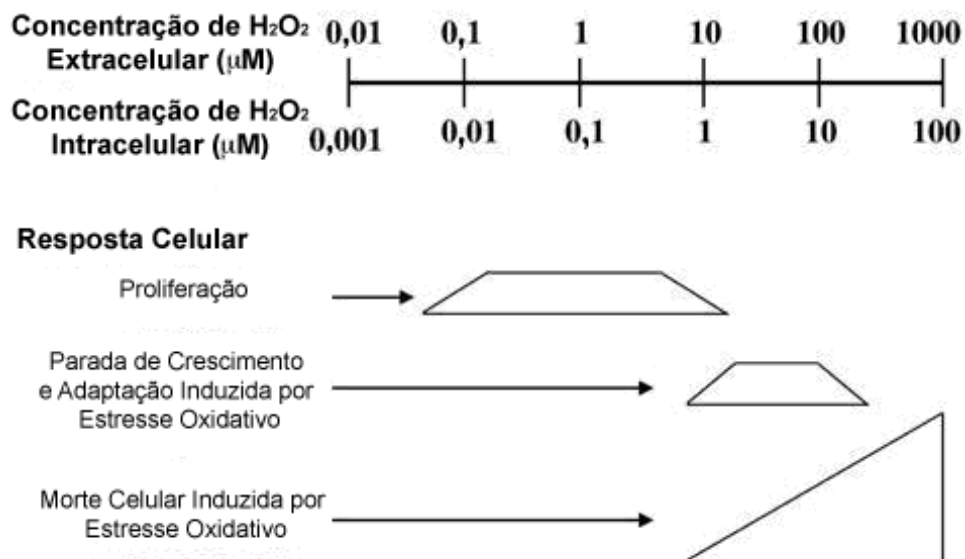
### **1.3 Câncer de Pulmão e Metabolismo Redox**

Espécies reativas (ER) são intermediários no metabolismo dos Radicais Livres (RL), os quais possuem, obrigatoriamente, elétrons desemparelhados, e, portanto, são radicalares (Halliwell 2006). ER possuem alta capacidade oxidante, mesmo não sendo necessariamente radicalares. Os RL e outras ER são gerados fisiologicamente nas células e a homeostase é mantida pelos sistemas antioxidantes (Halliwell 2006). Esses sistemas antioxidantes podem ser constituídos por defesas enzimáticas ou não enzimáticas. Dentre as defesas não enzimáticas temos o tripeptídeo glutathiona (GSH, na forma reduzida) e vitaminas como o alfa-tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C). Já como defesas enzimáticas podemos citar como exemplo as enzimas superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1), glutathiona peroxidase (GPx) (E.C. 1.11.1.9) e a catalase (CAT) (E.C. 1.11.1.6). No momento em que essa homeostase é perdida, o aumento das ER pode levar ao estresse oxidativo, gerando morte celular pelo acúmulo de biomoléculas oxidadas (Halliwell 2007). Entretanto, apesar de seus efeitos nocivos, as ER podem atuar também como sinalizadores celulares, promovendo proliferação migração, diferenciação e sobrevivência celular (Policastro, et al. 2004, Storz 2005) pela ativação de fatores de transcrição como NF $\kappa$ B (do inglês “Nuclear Factor Kappa B”) e AP-1 (do inglês “Activator Protein-1”). Além disso, diversos trabalhos sugerem que todas as etapas envolvidas na transformação

maligna de um tecido são influenciadas pelo metabolismo redox (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic and Mazur 2006, Visconti and Grieco 2009). Dessa forma, as ER atuam mediando um fenótipo oncogênico (Polytarchou, Hatziapostolou and Papadimitriou 2005, Valko, et al. 2006), demonstrando que o desequilíbrio no metabolismo redox tem um papel significativo na patogênese do câncer de pulmão.

Nesse contexto, a espécie reativa peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) mostrou-se crucial na sobrevivência e proliferação de células tumorais, embora a resposta celular ao  $H_2O_2$  esteja relacionada com as doses as quais essas células são expostas, como podemos observar na figura 1. Atualmente, sabe-se que o  $H_2O_2$  pode atuar estimulando a transição G1/S no ciclo celular, uma vez que a superexpressão da CAT atenua a proliferação celular (Policastro, et al. 2004). Além disso, o  $H_2O_2$  atua como segundo mensageiro na rota proliferativa estimulada por fatores de crescimento (EGF, PDGF) via MAP cinases (MAPK). Ainda, o  $H_2O_2$  pode inibir fosfatases, intensificando o sinal das cinases (Burhans and Heintz 2009). Uma vez que muitas das proteínas da rota das MAP cinases são oncogenes, a superexpressão destas e o aumento na produção de  $H_2O_2$  podem atuar em sinergismo contribuindo para o perfil proliferativo de tumores. Ainda,  $H_2O_2$  exógeno é capaz de reverter parcialmente a inibição da proliferação por contato celular (Pani, Galeotti and Chiarugi 2010).





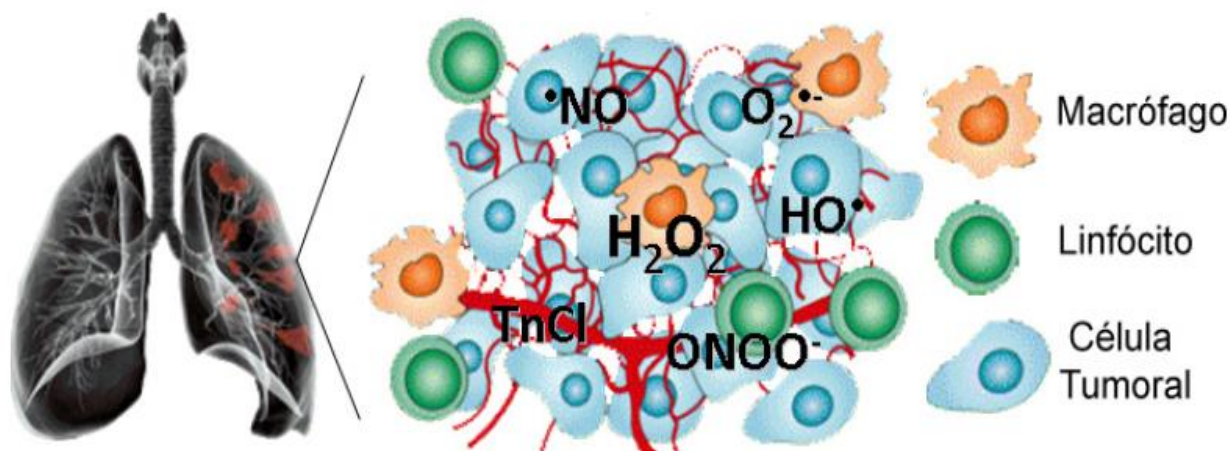
**Figura 1. Resposta celular à exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Exposição de células em cultura a baixas concentrações (0,1-7 µM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulta em níveis intracelulares em torno de 0,01-0,07 µM e estimula diretamente a proliferação celular. Níveis mais elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20-200 µM) inicialmente estimulam parada de crescimento, o qual pode ser seguido por adaptação ou estresse oxidativo. Quantidade crescente de morte celular ocorre em concentrações superiores a 10 µM. O ponto de transição preciso para estas respostas celulares pode variar dependendo do tipo celular e das condições de cultura. Adaptado de (Stone and Yang 2006).

Outra característica importante para o fenótipo metastático é a capacidade de migrar e invadir tecidos adjacentes através da degradação da matriz extracelular (Connor, et al. 2007). Para isso a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) é fundamental (Nelson, et al. 2006). Nesse contexto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também se torna importante, já que está relacionado com a atividade de MnSOD (Connor, et al. 2007) e a expressão de MMP também está

associada a um aumento da atividade dessa enzima (Nelson, et al. 2003) via ativação de ERK 1/2, a qual é dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ranganathan, et al. 2001) e JNK (Nelson, et al. 2006). Desta forma, assim como na proliferação, o aumento nos níveis de ER pode favorecer o fenótipo tumoral.

Corroborando com os achados acima citados, estudos prévios demonstraram que a agressividade do AdC de pulmão está associada com um desbalanço intracelular pró-oxidativo. Nesse desbalanço, novamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou-se crucial para a proliferação das células tumorais, uma vez que o tratamento com a enzima antioxidante CAT que decompõe o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzindo água e oxigênio: ( $2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) foi capaz de atenuar parâmetros de malignidade (da Motta, et al. 2014). Outros estudos, porém com superexpressão de CAT, também demonstraram reversão de características malignas em diferentes linhagens tumorais pela redução dos níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Policastro, et al. 2004).

Nos pulmões, o efeito das ER é especialmente importante, pois o microambiente pulmonar possui uma alta quantidade de células inflamatórias e uma concentração de oxigênio maior do que em outros órgãos, pois o pulmão está constantemente exposto ao oxigênio do meio ambiente. Além disso, os pulmões estão expostos a radicais livres exógenos, como a fumaça do cigarro ou poluentes atmosféricos. Todos esses fatores contribuem para o aumento de ER e, portanto, um ambiente particularmente pró-inflamatório e pró-oxidante, como pode se observar na figura 2 (Rahman, Biswas and Kode 2006). Conseqüentemente, essas peculiaridades do microambiente pulmonar refletem no desenvolvimento, proliferação e agressividade de tumores nesse órgão.



**Figura 2. Infiltração pro-inflamatória em tumores sólidos.** Esquema do microambiente tumoral demonstrando a presença de células do sistema imune que contribuem para produção de espécies reativas.  $H_2O_2$  – peróxido de hidrogênio;  $O_2^{\bullet-}$  – superóxido;  $HO^{\bullet}$  – hidroxil; TnCl – taurina cloramina;  $NO^{\bullet}$  – óxido nítrico;  $ONOO^-$  – peroxinitrito.

#### 1.4 $NF\kappa B$

O  $NF\kappa B$  (fator nuclear kappa B) é um importante fator de transcrição que modula a expressão gênica em resposta a fatores de crescimento, agentes pró-inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), drogas citotóxicas e estresse oxidativo (Bowie and O'Neill 2000, Sakon, et al. 2003, Nakanishi, et al. 2005, Zanotto-Filho, et al. 2010).

A família do  $NF\kappa B$  contém cinco membros (p50/p105, p52/p100, p65, c-Rel e RelB), os quais formam homo e heterodímeros e normalmente estão no

citoplasma celular de forma inativa, ligado ao seu inibidor I $\kappa$ B. A forma mais comum do NF $\kappa$ B é o heterodímero p65/p50 que quando ativado transloca do citoplasma para o núcleo, onde ativa a transcrição dos genes alvo (Perkins 2007).

Fortes evidências associam o NF $\kappa$ B à regulação de oncogenes, progressão tumoral e quimioresistência, uma vez que ele pode induzir proliferação celular, progressão do ciclo celular, angiogênese e metástases pela indução da transcrição de genes antiapoptóticos e antioxidantes como Bcl-xL, c-FLIP, SOD2 e glutathione S-transferase (Schreck, Rieber and Baeuerle 1991, Nakanishi, et al. 2005, Baud and Karin 2009, Zanotto-Filho, et al. 2009), atribuindo-lhe, assim, o papel de fator de sobrevivência em células tumorais e, portanto, um potencial alvo para terapia (Zanotto-Filho, et al. 2010).

Diversos estudos mostraram que NF $\kappa$ B é constitutivamente ativado em algumas linhagens celulares de câncer de pulmão. Além disso, em resposta ao peróxido de hidrogênio e ao tratamento com drogas citotóxicas, tais como cisplatina, daunorrubicina, paclitaxel e 5-Fluorouracil, o NF $\kappa$ B também pode ser ativado (Nakanishi, et al. 2005). Assim, os compostos que são capazes de reduzir a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem se tornar um alvo futuro para intervenções terapêuticas de forma combinada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o efeito da terapia combinada com catalase na resposta a diferentes quimioterápicos e avaliar o padrão de ativação do NFκB em função das alterações redox que favorecem a agressividade em adenocarcinoma de pulmão humano.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliação do efeito da adição exógena de CAT na proliferação da linhagem celular de AdC humano A549;
- Avaliação do efeito do tratamento com CAT nos estado redox intracelular da linhagem celular de AdC humano A549;
- Determinação da citotoxicidade ( $GI_{50}$ ) de diferentes drogas antineoplásicas em células da linhagem A549 através da técnica de SRB;
- Avaliação do efeito do tratamento com CAT e quimioterápicos sobre produção de  $H_2O_2$  em células da linhagem de Adc humano A549 pela técnica Amplex Red<sup>®</sup>;
- Determinação do efeito da terapia combinada com CAT e quimioterápicos sobre a proliferação de células da linhagem de Adc humano A549 através da técnica de SRB;
- Determinação do imunocnteúdo da subunidade p65 do NFκB em células da linhagem de Adc humano A549 tratadas com CAT através de *western blot*, verificando o estado de ativação desse fator de transcrição.

## PARTE II

### **3. RESULTADOS**

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo científico que será submetido para publicação (Seção 3.1).

### **3.1 Manuscrito a ser submetido ao periódico BBA General Subjects**



**Title:**

Evaluation of the Efficacy of Catalase Combined Therapy with Different Chemotherapeutic Drugs in Human Lung Adenocarcinoma

**Authors:**

Valeska Aguiar de Oliveira<sup>1,2</sup>, Leonardo Lisbôa da Motta<sup>1,2</sup>, Fernanda Martins Lopes<sup>1,2</sup>, Marco Antônio De Bastiani<sup>1,2</sup>, Bernardo Papini Gabiatti<sup>1,2</sup>, Fabio Klamt<sup>1,2</sup>

**Filiation:**

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, 90035-003 Porto Alegre (RS), Brazil;

<sup>2</sup>National Institutes of Science & Technology – Translational Medicine (INCT-TM), 90035-903 Porto Alegre (RS), Brazil.

**\*Corresponding author:** Prof. Fábio Klamt, Ph.D. Departamento de Bioquímica, ICBS/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre/RS, 90035-003, Brasil. Phone: +55 51 3308-5556; Fax: +55 51 3308-5535; e-mail: fabio.klamt@ufrgs.br

## ABSTRACT

**Background:** Lung cancer remains the most lethal cancer-related disease worldwide. Approximately 80% of lung cancer cases are non-small cell lung cancer (NSCLC), in which roughly 50% are adenocarcinomas (AdC). Since survival rates remain poor, there is an urgent need for more effective therapies that could increase the overall survival of these patients. Studies demonstrated that hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) plays a crucial role, since treatment with the antioxidant enzyme catalase (CAT) attenuated tumor aggressiveness. This study evaluated the efficacy of CAT combined therapy in the human AdC cell line A549 and its effect in redox parameters.

**Methods:** SRB assay was used to assess the effect of CAT and chemotherapy treatment in growth inhibition. CalcuSyn<sup>®</sup> software was used to assess drug interactions (synergism or antagonism). Amplex Red<sup>®</sup> to evaluate  $H_2O_2$  generation.

**Results:** CAT caused a cytostatic effect in cell proliferation and decreased NF $\kappa$ B activation. Also, decreased thiol levels (-SH) and total reactive antioxidant potential (TRAP), increases the  $H_2O_2$  production and glutathione levels (GSH). Among drugs tested, paclitaxel and hydroxyurea showed increased production of  $H_2O_2$ . Cisplatin alone had no effect in  $H_2O_2$  production. CI values showed that, except for CAT plus paclitaxel, all combinations exhibited a synergistic effect.

**Conclusions:** These data suggest that CAT treatment acts synergistically with Cisplatin, 5-Fluorouracil and Hydroxyurea chemotherapeutic drugs, providing a new therapeutic strategy for the management of lung AdC.

**General Significance:** Catalase combined therapy against lung AdC showed significant synergistic effect with the combination with Cisplatin, 5-Fluorouracil and Hydroxyurea and antagonism with Paclitaxel.

**Key words:** A549, lung cancer, catalase, combined chemotherapy, lung adenocarcinoma.

## INTRODUCTION

Lung cancer remains the most common and lethal cancer-related pathology with nearly 1.59 million deaths annually worldwide [1]. There are two main types of lung cancer with epithelial origin: small cell (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) [2]. The latter comprises more than 80% of all cases of lung cancer, and of these, roughly 50% are lung adenocarcinomas (AdC) [3]. Despite progress in molecular research, the therapeutic armamentarium remains poor [4] and unable to improve NSCLC patients outcome, which have a 5 year survival rates of only 2% for advanced stages [1].

Once the initial stages of lung cancer are asymptomatic, the disease is typically diagnosed in advanced stages. For these patients, chemotherapy forms the foundation of their treatment, which is usually palliative. Currently, the gold standard treatment for lung AdC is based on platinum agents such as cisplatin, carboplatin or oxaliplatin and usually given in combination with other agents such as paclitaxel and etoposide. Unfortunately, despite these therapies, the disease is rarely curable and prognosis is poor [5]. Several factors contribute to the high mortality rate (which outranks prostate, colorectal and pancreatic cancer cases combined) and one of the most common includes lung tumor cell resistance to cytotoxic drugs [1]. Chemoresistance may be innate or acquired and may apply to a single agent or to a class of agents with same or similar antineoplastic mechanisms of action [6-8]. Therefore, there is an urgent need for more effective therapies, drugs, or treatments that could help increase the overall survival of lung AdC patients. With the notion that the development of novel drugs require much time and financial investment, the use of existing

drugs as combined treatment becomes a needed and appropriated approach, since two-drug combinations are the mainstay of systemic therapy for lung AdC [5]. Thus, compounds or drugs that interfere with aberrant pathways or physiopathological processes known to be altered in lung cancer should be rationally used in order to identify potential combined strategies for novel interventional regimens.

Lung cancer cells are consistently exposed to a particular pro-inflammatory and pro-oxidant environment, derived from the high environmental oxygen pressure and exogenous oxidants, such as cigarette smoke and air pollutants [9]. In this context, an imbalance in antioxidants mechanisms plays a significant role in the pathogenesis of lung cancer. Numerous reports showed that reactive oxygen species (ROS), mainly hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), act as endogenous drivers of the oncogenic phenotype, by the modulation of cellular proliferation, migration, survival and multidrug resistance [10, 11]. Most of these processes are regulated by redox-responsive transcriptional factors such as Nuclear Factor Kappa B (NF $\kappa$ B), Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and activator protein-1 (AP-1) [10, 12]. Moreover, previous studies of our group demonstrated that lung AdC aggressiveness is associated with elevated intracellular oxidative stress, where  $H_2O_2$  plays a crucial role, since the exogenous treatment with the antioxidant enzyme catalase (CAT) (E.C. 1.11.1.6), but not Trolox<sup>®</sup> (synthetic analog of alpha-tocopherol) or N-acetylcysteine (NAC, a glutathione precursor), attenuated tumor aggressiveness [13]. CAT overexpression reverts malignant features in different cell lines [14] and prevented tumor growth and metastasis in mouse [14]. Moreover, mitochondrial-targeted CAT suppresses invasive breast cancer in mice [15] and

the role of CAT has already been established for *in vivo* models [14]. Thus, compounds that are able to specifically scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could provide a future venue to the development of combined therapeutics interventions that may enable therapeutic selectivity and to overcome drug resistance.

This way, the present study aimed to establish the role of CAT combined treatment on chemotherapy efficacy and evaluate the pattern of activation of NFκB depending on the redox changes that favor aggressiveness in lung AdC. For this purpose, the human AdC cell line A549 was treated with exogenous CAT and the proliferative behavior, intracellular redox status and p65 nuclear and cytosolic immunocent were evaluated. Also, cells were co-treated with CAT and several chemotherapeutic drugs with different mechanisms of action: platinum agents (Cisplatin); antimetabolites (5-Fluorouracil and Hydroxyurea); microtubule stabilizing (Paclitaxel); topoisomerase inhibitor (Daunorubicin), aiming to access the potential synergistic, additive or antagonistic effect of CAT on these drugs.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Reagents and Equipment***

Materials used in cell culture were acquired from Gibco®/Invitrogen (São Paulo, SP, Brazil). Chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) except where indicated. Spectrophotometric measurements were assayed in a 96-well microplate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices).

### ***Cell Lines and Cell Culture***

Exponential growing human A549 AdC cell line, obtained from NCI-Frederick Cancer DCTD cell line repository, was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 10,000 U/mL penicillin G, 10,000 µg/mL streptomycin sulfate and 25 µg/mL amphotericin B at 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub>.

### ***CAT Treatment and Growth Inhibition Assays***

The cells redox state was modulated by addition of purified active or heat-inactivated CAT (1,000 U/mL). For this, cells ( $2 \times 10^4$ ) were seeded in a 12 well plate and, after adherence, cell number was evaluated each 24 h treatment using Neubauer chamber cell counting and Sulforhodamine B (SRB) assay. SRB assay is based on the ability of SRB to bind to protein components of cells that have been fixed to microplates by trichloroacetic (TCA) [16]. Data is expressed as “cell number” with a standard curve (cell number X SRB<sub>abs</sub>). To revert CAT effects in A549 cells, the enzyme was washed out after 48 h of treatment.

### ***NFκB activity***

NFκB activity was determined by western blot immune quantification of p65 levels in cytosolic and nuclear fractions of control and treated cells. Briefly, cells were scraped, harvested and collected by centrifugation (4,000 rpm/ 4 min). Cells were then lysed by resuspension in hypotonic buffer (10mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, proteases inhibitor cocktail (Roche®), 1 mM sodium orthovanadate, 5

mM sodium fluoride) and incubated on ice for 15 min. After, 10% IGEPAL<sup>®</sup> was added and cells were disrupted by vortexing (every 15 s for 5 min). The resulting suspension was centrifuged at (14,000 rpm/30 seg), and the supernatant (cytosolic extract) was separated and stored at -80°C. The nuclear pellet was washed with cytosolic extraction buffer and then resuspended in high salt buffer consisting 20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, proteases inhibitor cocktail (Roche<sup>®</sup>), and 25% glycerol and incubated for 40 min in ice and vortexed for 15 s every 5 min to releasing soluble proteins from the nuclei. After, the nuclear fraction was centrifuged (12,000g/ 10 min) and supernatant containing soluble nuclear proteins was stored at -80°C until experiments. The protein concentration was determined by Bradford assay [17].

Cytosolic and nuclear proteins extracts (25 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred onto a PVDF membrane. Thereafter, nonspecific binding was blocked with 5% of BSA in TTBS for 1h at room temperature. Membranes were than incubated overnight at 4°C with primary antibodies rabbit anti-p65 (1:500) (Abcam<sup>®</sup>), rabbit anti-lamin (1:1,000) (Abcam<sup>®</sup>) as a nuclear fraction marker and rabbit anti-β-actin (1:5,000) (Cell Signaling<sup>®</sup>) as cytosolic fraction marker . After washing in TTBS, blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2,000) (Dako<sup>®</sup>, Glostrup, DK) for 2 h at room temperature. Bands were visualized with Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate (PIERCE<sup>®</sup>, Rockford, IL,USA) and quantified using Image-J 1.36b software (National Institutes of Health).



### ***Samples Preparation for Redox Profile Analysis***

For the total reactive antioxidant potential (TRAP) assay and evaluation of Elman's sulfhydryl group, cells ( $2 \times 10^4$  cells/well) were cultivated in 12 well plates, treated with CAT (1,000 U/mL) for 48 and 96 h, washed with PBS and frozen-and-thawed in 10 mM PBS three times prior to harvesting and then centrifuged (400g / 6 min). The supernatant protein concentration was determined by Lowry's [18] for data normalization.

For the evaluation of intracellular reduced glutathione levels (GSH) cells were seeded into flasks of 75 cm<sup>3</sup> ( $4 \times 10^5$ ) and treated with CAT (1,000 U/mL) for 48 and 96 h. After that, washed with PBS, removed with a cell scraper and centrifuged at 1,000g for 5 min at 4°C. The supernatant was discarded, pellet resuspended in lise buffer (HEPES 20 mM/CHAPS1%), incubated on ice for 15 min (cells were disrupted by vortexing every 5 min) and centrifuged at 1,000g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected, protein concentration determined by Bradford assay [17] for data normalization.

To access the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production, cells were seeded in 96-wells plate at density of  $2 \times 10^3$  cells/well and incubated with CAT (1,000 U/mL) or chemotherapy (GI<sub>50</sub>) or with a combination of both in the same doses. Also, the washout was performed at the time 48 h and to these cells added chemotherapy (GI<sub>50</sub>) and incubated for another 48 h.

### ***Redox Parameters***

#### ***Total Radical-Trapping Antioxidant Potential***

The non-enzymatic antioxidant capacity of cells was evaluated by total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) assay. This test is based on oxidized luminol-chemoluminescence measurement induced by AAPH (2,2'-Azobis 2-amidinopropane) decomposition in glycine buffer (pH 8.6) [19]. After system stabilization (buffer plus luminol and AAPH), sample was added (20 µg of protein) and the chemoluminescence decreases proportionally to the amount of non-enzymatic antioxidants monitored in a Wallace 1450 MicroBetaTriLux Liquid Scintillation Counter & Luminometer (Perkin Elmer). A time per chemoluminescence curve was obtained and the relative "area under the curve" (AUC) in the recovery phase used to analysis, as previously established [19].

### ***Reduced Thiol Levels (-SH)***

To measure sulfhydryl groups (-SH) levels samples (35 µg) were diluted in PBS 10 mM and buffer (10 mM boric acid, 0.2 mM EDTA pH 8.5). DTNB 10 mM (5, 5'-dithionitrobis 2-nitrobenzoic acid) was added and -SH levels were determined by reacting samples with 5-thio-2-nitrobenzoic acid (Nbs). Absorbance was read at 412 nm ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 27,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Results are expressed as nmol -SH/mg protein [20].

### ***GSH Levels***

To determine the intracellular reduced glutathione levels (GSH), after proteins precipitation with picric acid, samples were neutralized com Kpi 0,1 M (ph 7,0) and mixed with Glutathione Reductase (GR) 5 U/mL and Mix solution (KPi, NADPH 100 mM, DTNB 5 mM). Once GSH is oxidized by DTNB to form the yellow derivative 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) and glutathione disulfide

(GSSG) the formation rate of TNB is monitored spectrophotometrically at 412 nm and is proportional to the sum of GSSG and GSH present whereas GSSG formed can be recycled to GSH by GR in the presence of NADPH. Results are expressed as nmol GSH/ $\mu\text{g}$  protein [21].

### ***Measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production***

Amplex Red<sup>®</sup> fluorescence dye was used to determine intracellular *steady-state* generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After treatment, the medium was removed, cells were washed with PBS and the determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by treated cells was performed using 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red<sup>®</sup> reagent) which is a substrate for horseradish peroxidase (HRP) that enables selective detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [22, 23]. In the presence of peroxidase, this reagent reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce resorufin. Fluorescence due to resorufin formation from 50  $\mu\text{M}$  of Amplex Red<sup>®</sup> in the presence of 0,02 U/mL HRP was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 530 nm and emission at 590 nm at 37°C. Results are expressed as RFU.min<sup>-1</sup>/10<sup>5</sup> cells.

### ***CAT and Chemotherapeutics Treatment and Growth Inhibition***

#### ***Assays***

To evaluate the effect of combined treatment with CAT, first, cells ( $2 \times 10^3$ ) were seeded in a 96 well plate and treated with different concentrations of Cisplatin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel, Hydroxyurea and Daunorubicin for 48 h to determine their GI<sub>50</sub> values. After that, cells were treated with CAT (1,000 U/mL) or chemotherapy (GI<sub>50</sub>) or with a combination of both in the same doses. Also,

the washout was performed at the time 48 h and to these cells added chemotherapy ( $GI_{50}$ ) and incubated for another 48 h. The growth inhibition was accessed by SRB assay.

To evaluate the effect of drug interactions, we used CalcuSyn<sup>®</sup> software (Biosoft, Ferguson, MO, USA). Combination index (CI) of CAT combined treatment with each drug tested was obtained and ranks as synergism, additivity and antagonism as CI values of  $CI < 0.9$ ,  $CI = 0.9-1.1$  and  $CI > 1.1$  respectively [24, 25].

### ***Statistical analysis***

Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. (standard error of mean) of at least 3 independent experiments in triplicate with significance level considered  $P < 0.05$ . For statistical analysis, data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test with GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA version 5.0.

## **RESULTS**

### ***Growth Inhibition by CAT***

Exogenous addition of CAT caused a dose dependent inhibition on cellular proliferation of human lung A549 AdC cells (Fig. 1a) [13], with a maximal dose effect of 1000 U/mL, which as the dose selected for the following experiments. This inhibition in cellular proliferation was observed in 24 h of treatment and maintained over 4 days of treatment. Growth inhibition was related to a cytostatic, not cytotoxic, effect of intracellular  $H_2O_2$  consumption,

since CAT washout readily restored cellular proliferative rate similar to control A549 cells (Fig.1b). Based on the abovementioned data, we used 1000 U/mL of CAT by 48 and 96 h of treatment for the following experiments.

### ***NFκB Activation***

When we evaluated NFκB activation status (p65 subcellular compartmentalization/distribution) in CAT-treated A549 cells, we found a 2.9-fold increase in the cytosolic immunocontent of the NFκB subunit p65, suggesting a significant decrease in NFκB activation (Fig. 1c).

### ***CAT influence in AdC intracellular redox state***

CAT-treated cells presented lower antioxidant potential (Fig. 2a) and thiol levels (Fig. 2b) when compared to untreated cells. Notably, the decrease in antioxidant potential was time dependent for both groups, in contrast to thiol levels. CAT washout was able to restore both thiol and antioxidant potential levels. Interestingly, GSH Levels (Fig. 2c) and intracellular *steady-state* generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 2d) were significantly increased in CAT-treated cells as compared to untreated cells.

### ***Chemotherapeutic drugs cytotoxicity***

SRB assay was used to determine the cytotoxicity curves of the antineoplastic drugs in human AdC cell line A549. Figure 3 shows the GI<sub>50</sub> value of each drug obtained in 48 h of incubation, which was used to evaluate the combined effect of CAT treatment in the following experiments.

### ***CAT combined treatment with Chemotherapeutics drug***

After that, we accessed the combined effect of CAT treatment in the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the chemotherapeutic drugs. Among the drugs tested, only Paclitaxel and Hydroxyurea showed basal increased production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when compared with vehicle alone (Fig.4a). However, when chemotherapeutics drugs were co-treated with CAT, only the combination of Paclitaxel plus CAT had no alteration in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Hydroxyurea plus CAT, as expected, had a decreased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production when compared with the drug alone. Cisplatin, although alone had no effect in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, when treated with CAT, presented almost a 3-fold increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.

Regarding the effectiveness of combined CAT treatment in potentiate chemotherapeutic drugs cytotoxicities, we used de SRB assay and dose-effect analyzer to access this interaction (Figure 5). Table 1 present the drug Combination Index (CI) values, where we observe that Cisplatin, 5-Fluorouracil and Hydroxyurea exhibited a synergistic effect when co-administrated with CAT. In contrast, Paclitaxel showed an antagonist effect co-administrated with CAT.

### **DISCUSSION**

Among malignancies, lung cancer ranks as one of the most common and lethal. Although chemotherapy presents efficacy for some patients with lung cancer, effective therapeutic options for advanced stages of the disease remain limited and cure rates are low [26]. For example, the treatment of NSCLC had been revolutionized by the development of targeted agents (*e.g.*, the FDA-approved drugs *erlotinib* and *gefitinib* for patients harboring specific EGFR mutations), but decision in NSCLC management is still mainly based on the

anatomic extent of the disease. Among the factors that generate the high mortality rate, multidrug resistance is one of the most common. In this context, new combined therapies are important to overcome drug resistance and to improve the NSCLC patient prognosis.

Whereas lung tumors developed in an atypical pro-inflammatory and pro-oxidant microenvironment [9], RS is believed to be especially important in tumor pathogenesis and chemotherapy effectiveness. As previously reported, lung AdC cells have an imbalance in redox parameters compared to normal cells, presenting a high reactive species *steady-state* generation that follows tumor progression and, presumptively, must somehow confer a selective advantage, as well as any cancer phenotypic property [13]. In A549 cells, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging with the exogenous addition of CAT causes an inhibition of cellular proliferation. CAT washout readily restored cellular proliferative rate compared to control cells. Therefore, this was related to a cytostatic, not cytotoxic effect of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption. The difference in cellular proliferation was statistically significant at 48 h and 96 h of CAT treatment.

Once CAT treatment was effective in inhibit cellular proliferation, and many reports suggest that the mechanism of action of several chemotherapeutic drugs commonly used in the clinics involves the generation of reactive species and oxidative stress, we aimed to determine if this cytostatic effect was related to changes in intracellular antioxidant defenses. Surprisingly, our results demonstrated that CAT treatment significantly decreased endogenous thiol levels and the non-enzymatic antioxidant capacity. In contrast, intracellular GSH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were increased in CAT-treated cells. This can be explained by the fact CAT does not penetrate cell membranes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is

able to diffuse through membranes [27]. Addition of CAT in the extracellular environment would result in an efflux of  $H_2O_2$  and consequently reduction in intracellular  $H_2O_2$  concentration to maintain chemical equilibrium. As a result, cell proliferation was reduced, since  $H_2O_2$  is an important proliferation cell signaling. Assuming this reduction in intracellular  $H_2O_2$  concentration, this could be related to increased levels of reduced glutathione (GSH) as it can be oxidized by  $H_2O_2$  to form glutathione disulfide (GSSG). In response to the lower intracellular  $H_2O_2$  concentration, A549 cells may decrease the synthesis of endogenous antioxidants defenses, thus justifying the reduction of thiols and Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) found in CAT-treated cells. Moreover, Amplex Red<sup>®</sup> assay showed that the steady state level of  $H_2O_2$  production was found to be increased in CAT-treated cells. Even though puzzling, these data could be related to an attempt of tumor cells to overcome the cytostatic effect of CAT-treatment.

Reactive species (RS) are predominantly known for causing cell damage. However cumulative information has related increases in basal levels of RS in cancer cells with tumor progression [28], since RS play a major physiological role in the control of redox-sensitive transcriptional factors such as NF $\kappa$ B. Nuclear Factor Kappa B (NF $\kappa$ B) is a major transcription factor that modulates gene expression in response to growth factors, pro-inflammatory agents such as interleukin-1 (IL-1), tumor-necrosis factor (TNF), oxidants and cytotoxic drugs [29-32]. The most common form of NF $\kappa$ B is the p65/p50 heterodimer that exist in the cytoplasm in an inactive state bound to inhibitory protein I $\kappa$ B and, when stimulated, translocate to the nucleus, where activates transcription of target genes [33]. Substantial studies indicate that NF $\kappa$ B regulates



oncogenesis, tumor progression and chemotherapy resistance by enhancing the transcription of anti-apoptotic and antioxidant genes including Bcl-xL, SOD2, and Glutathione S-Transferase [30, 32, 34-36]. Furthermore, numerous reports showed that NF $\kappa$ B is constitutively activated in some lung cancer cell lines. In addition, in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and to treatment with cytotoxic drugs, such as Cisplatin, Daunorubicin, Paclitaxel and 5-Fluorouracil, NF $\kappa$ B can be activated [30, 37]. Here, we observed an increase in the cytosolic p65 immunoccontent, indicating a reduction in activation of this transcriptions factor. However, NF $\kappa$ B does not seem to be related with chemoresistence in A549 cell, since dose-effect analyzes by CI showed a synergistic interaction with CAT and drugs that are reported to activate NF $\kappa$ B such as Cisplatin, Daunorubicin and 5-Fluorouracil. Moreover, paclitaxel also showed a decrease in efficacy when co-treated with CAT.

Additionally, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may influence cellular response to antineoplastic drug such as cisplatin and other alkylating agents, which are the gold standard treatment for lung AdC. Besides, in AdC cell lines, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can up-regulates APE-1 (a key enzyme in DNA repair) expression [38], which can confer cisplatin resistance [39]. Thus, redox imbalance favoring intracellular oxidative stress and higher RS production can influence cisplatin resistance (as well as others alkylating agents), contributing to tumor aggressiveness. In this way, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging maybe enhances cisplatin treatment effectiveness. Our results corroborate with this, since, among cisplatin showed a synergistic interaction with CAT combined treatment.

Although high GSH levels have been reported as chemoresistance mechanism of cisplatin, studies have shown that oxidants as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are able to

interact with promoter region gene of antioxidant-responsive element (ARE) which is involved in promote transcription of GST genes [40]. In this case, we have a reduction of intracellular  $H_2O_2$  concentration, reducing GST levels cisplatin is not inactivated and are able to exercise cytotoxic effect.

Therefore, compounds that are able to scavenging  $H_2O_2$  could provide a future target to combined therapeutics interventions that may enable therapeutic selectivity and to overcome drug resistance.

## **CONCLUSIONS**

Taken together, data presented here suggest that combined CAT treatment can act synergistically with Cisplatin, 5-Fluorouracil and Hydroxyurea and antagonism with Paclitaxel chemotherapeutics drug. This effect is probably related to amplification in *steady-state*  $H_2O_2$  generation by the drugs. Our data pointed into a potential beneficial effect of CAT combined therapy for the management of lung AdC providing a new therapeutic strategy for the management of lung AdC.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Brazilians funds MCT/CNPq Universal (470306/2011-4), PRONEX/FAPERGS (1000274), PRONEM/FAPERGS (11/2032-5), PqG/FAPERGS (2414-2551/12-8) and MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7) provided the financial support without interference in the ongoing work.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare none.

## **HIGHLIGHTS**

CAT treatment inhibits cell proliferation in A549 cell line.

CAT treatment reduce NF $\kappa$ B activation.

CAT combined treatment had a synergistic effect wen co-treated with  
Cisplatin, 5-Fluorouracil and Hydroxyurea.

## REFERENCES

- [1] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, A. Jemal, Cancer statistics, 2014, CA: a cancer journal for clinicians, (2014).
- [2] G. Mountzios, M.A. Dimopoulos, J.C. Soria, D. Sanoudou, C.A. Papadimitriou, Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: a review of published data, Crit Rev Oncol Hematol, 75 (2010) 94-109.
- [3] J.-H. Ko, W. Gu, I. Lim, H. Bang, E.A. Ko, T. Zhou, Ion Channel Gene Expression in Lung Adenocarcinoma: Potential Role in Prognosis and Diagnosis, PLoS One, 9 (2014) e86569.
- [4] J. Subramanian, R. Govindan, Lung cancer in never smokers: a review, J Clin Oncol, 25 (2007) 561-570.
- [5] S. Ramalingam, C. Belani, Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions, The Oncologist, 13 (2008) 5-13.
- [6] T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi, Y. Yoshida, M. Tanabe, T. Yoshida, T. Igarashi, I. Niina, T. Wakasugi, T. Imaizumi, Y. Momii, M. Kuwano, K. Kohno, Cisplatin resistance and transcription factors, Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents, 5 (2005) 15-27.
- [7] A. Chang, Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC, Lung Cancer, 71 (2011) 3-10.
- [8] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, Oncogene, 22 (2003) 7265-7279.

- [9] I. Rahman, S.K. Biswas, A. Kode, Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases, *European journal of pharmacology*, 533 (2006) 222-239.
- [10] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact*, 160 (2006) 1-40.
- [11] R. Visconti, D. Grieco, New insights on oxidative stress in cancer, *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12 (2009) 240-245.
- [12] C. Polytarchou, M. Hatzia Apostolou, E. Papadimitriou, Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affinity regulatory peptide gene, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 40428-40435.
- [13] L.L. da Motta, C.B. Müller, M.A. De Bastiani, G.A. Behr, F.S. França, R.F. da Rocha, J.B. Minotto, R.T. Meurer, M.C. Fernandes, A. Roehle, Imbalance in redox status is associated with tumor aggressiveness and poor outcome in lung adenocarcinoma patients, *Journal of cancer research and clinical oncology*, (2014) 1-10.
- [14] M. Nishikawa, M. Hashida, Y. Takakura, Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis, *Advanced drug delivery reviews*, 61 (2009) 319-326.
- [15] J. Goh, L. Enns, S. Fatemie, H. Hopkins, J. Morton, C. Pettan-Brewer, W. Ladiges, Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice, *BMC Cancer*, 11 (2011) 191.
- [16] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat Protoc*, 1 (2006) 1112-1116.

- [17] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- [18] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265-275.
- [19] M.T. Dresch, S.B. Rossato, V.D. Kappel, R. Biegelmeyer, M.L. Hoff, P. Mayorga, J.A. Zuanazzi, A.T. Henriques, J.C. Moreira, Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential, *Anal Biochem*, 385 (2009) 107-114.
- [20] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys*, 82 (1959) 70-77.
- [21] I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nature protocols*, 1 (2007) 3159-3165.
- [22] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Analytical biochemistry*, 253 (1997) 162-168.
- [23] J. Mohanty, J.S. Jaffe, E.S. Schulman, D.G. Raible, A highly sensitive fluorescent micro-assay of  $H_2O_2$  release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative, *Journal of immunological methods*, 202 (1997) 133-141.
- [24] T. Chou, The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism, *Synergism and antagonism in chemotherapy*, 61 (1991).

- [25] T.-C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Advances in enzyme regulation*, 22 (1984) 27-55.
- [26] J.R. Molina, P. Yang, S.D. Cassivi, S.E. Schild, A.A. Adjei, Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship, *Mayo Clin Proc*, 83 (2008) 584-594.
- [27] A.B. Fisher, Redox signaling across cell membranes, *Antioxid Redox Signal*, 11 (2009) 1349-1356.
- [28] L. Policastro, B. Molinari, F. Larcher, P. Blanco, O.L. Podhajcer, C.S. Costa, P. Rojas, H. Duran, Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide, *Mol Carcinog*, 39 (2004) 103-113.
- [29] S. Sakon, X. Xue, M. Takekawa, T. Sasazuki, T. Okazaki, Y. Kojima, J.H. Piao, H. Yagita, K. Okumura, T. Doi, H. Nakano, NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death, *EMBO J*, 22 (2003) 3898-3909.
- [30] C. Nakanishi, M. Toi, Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs, *Nat Rev Cancer*, 5 (2005) 297-309.
- [31] A. Bowie, L.A. O'Neill, Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries, *Biochem Pharmacol*, 59 (2000) 13-23.
- [32] A. Zanutto-Filho, A. Delgado-Canedo, R. Schroder, M. Becker, F. Klamt, J.C. Moreira, The pharmacological NFkappaB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation, *Cancer Lett*, 288 (2010) 192-203.

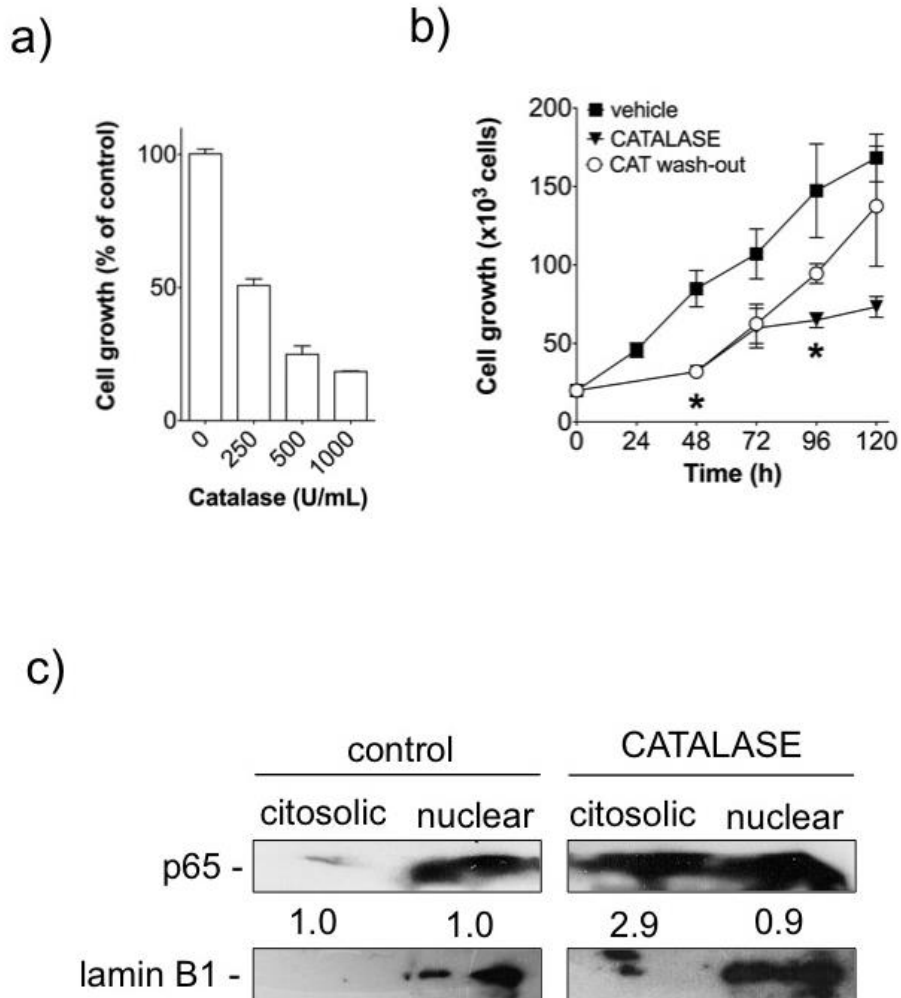
- [33] N.D. Perkins, Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (2007) 49-62.
- [34] A. Zanotto-Filho, D.P. Gelain, R. Schroder, L.F. Souza, M.A. Pasquali, F. Klamt, J.C. Moreira, The NF kappa B-mediated control of RS and JNK signaling in vitamin A-treated cells: duration of JNK-AP-1 pathway activation may determine cell death or proliferation, *Biochem Pharmacol*, 77 (2009) 1291-1301.
- [35] V. Baud, M. Karin, Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls, *Nat Rev Drug Discov*, 8 (2009) 33-40.
- [36] R. Schreck, P. Rieber, P.A. Baeuerle, Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1, *EMBO J*, 10 (1991) 2247-2258.
- [37] P. Godwin, A.-M. Baird, S. Heavey, M. Barr, K. O'Byrne, K. Gately, Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy, *Frontiers in oncology*, 3 (2013).
- [38] D.G. Yoo, Y.J. Song, E.J. Cho, S.K. Lee, J.B. Park, J.H. Yu, S.P. Lim, J.M. Kim, B.H. Jeon, Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems, *Lung Cancer*, 60 (2008) 277-284.
- [39] D. Wang, D.-B. Xiang, X.-q. Yang, L.-S. Chen, M.-X. Li, Z.-Y. Zhong, Y.-S. Zhang, APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells, *Lung Cancer*, 66 (2009) 298-304.
- [40] J. Scandalios, Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38 (2005) 995-1014.



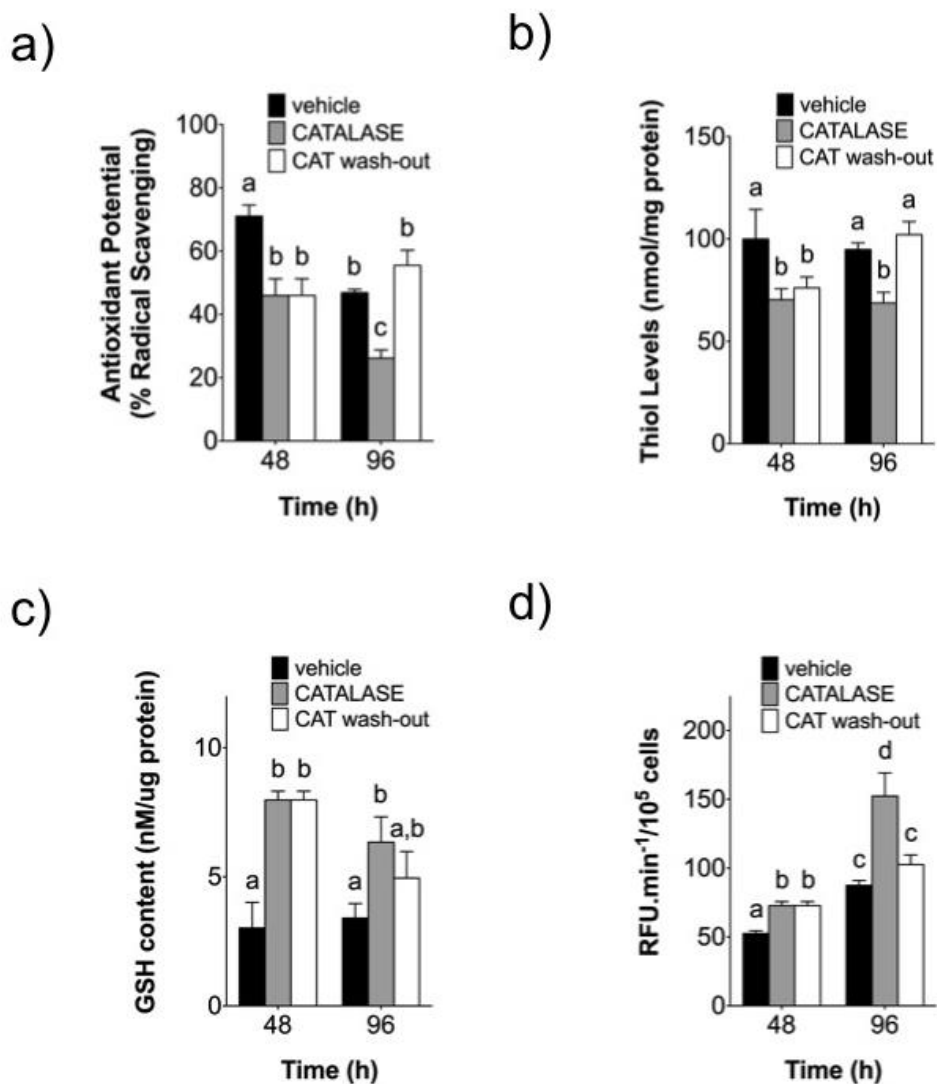
**Table 1:** Dose-effect analysis

Drug tested	Combination	CI	Interpretation	Mechanism of action
Cisplatin	CAT (1000 U/mL) + Cis (13.3 $\mu$ M)	0.563	Synergism	Alkylating agent
5-Fluorouracil	CAT (1000 U/mL) + 5-FLU (3.2 $\mu$ M)	0.483	Synergism	Antimetabolic agent
Paclitaxel	CAT (1000 U/mL) + PT (7 nM)	1.475	Antagonism	Microtubule stabilizer
Daunorubicin	CAT (1000 U/mL) + Dauno (0.16 $\mu$ M)	0.852	Slight Synergism	Topoisomerase inhibitor
Hydroxyurea	CAT (1000 U/mL) + HU (0.68 mM)	0.402	Synergism	Antimetabolic agent

Combination index values (CI) of cisplatin, 5-fluorouracil, paclitaxel, danunorubicin, hydroxyurea in combination with CAT. CI values were calculated from cellular growth inhibition assay. The data represent them mean of at least three independent experiments.

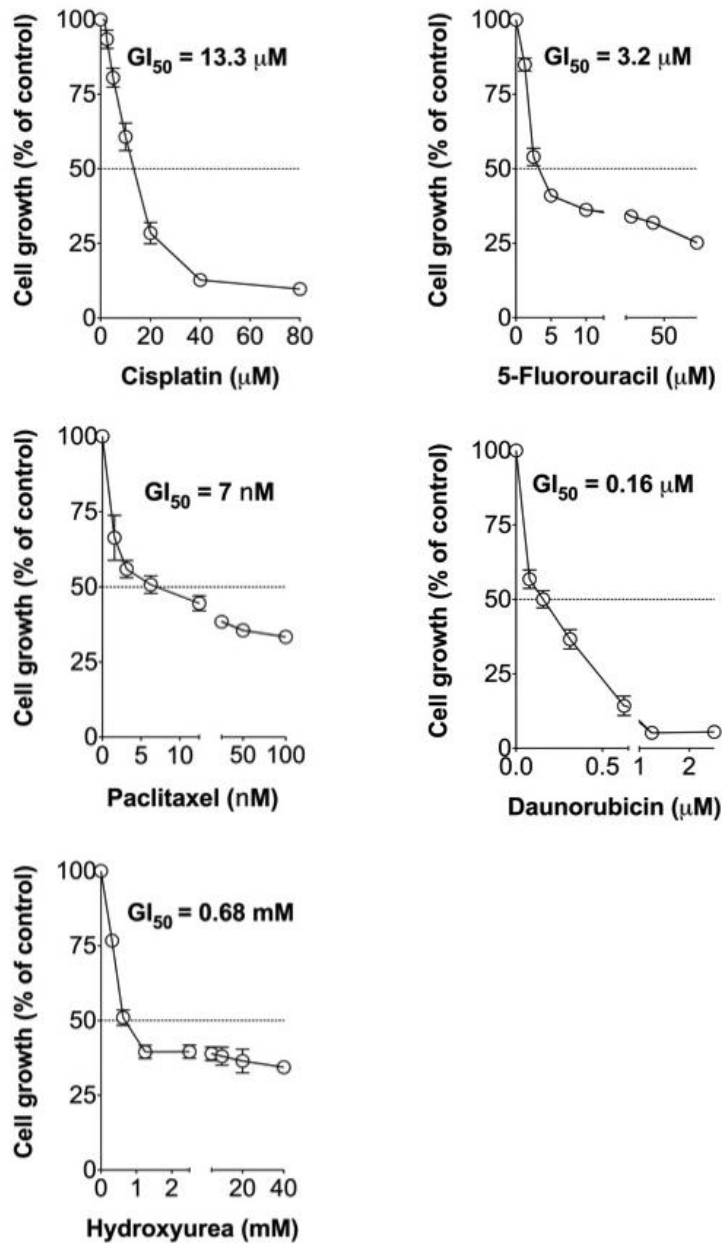


**Figure 1. CAT treatment causes reversible growth inhibition and increases p65 cytosolic immunocontent in human AdC cell line A549.** (a) Exogenous CAT addition (125 -1,000 U/mL) for 72 h to A549 cell culture inhibited cellular proliferation in a dose-dependent fashion. (b) Growth inhibition was reverted by CAT washout after 48 h of incubation allowed cells to return to usual proliferation rate. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared with control using t-test. (c) p65 subunit immunocontent and representative bands of cytosolic and nuclear fraction. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M.. \* $P < 0.05$  compared with control using t-test.



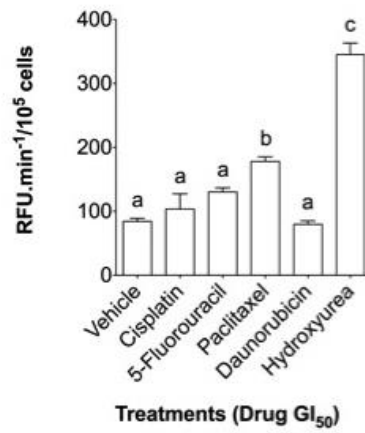
**Figure 2. CAT treatment modulates intracellular redox state in human AdC cell line A549.** (a) Total antioxidant potential and (b)Thiol levels were significantly lower in CAT-treated cells. Both parameters were reverted by CAT washout after 48h. Two-way ANOVA showed that antioxidant potential was affected by time of incubation. (c) Intracellular reduced glutathione (GSH) levels and (d) Intracellular generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in CAT-treated cells for 48h and 96h

were increased. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  using two-way ANOVA and Tukey post-test among groups.



**Figure 3. Cytotoxicity curves of the antineoplastic drugs in human AdC cell line A549.** Anticancer drugs dose response curve were evaluated for 48 h of treatment using SRB assay. *Dashed line* represents  $GI_{50}$  value of drug. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  using for five independent experiments carried out in quintuplicate (n=5).

a)



b)

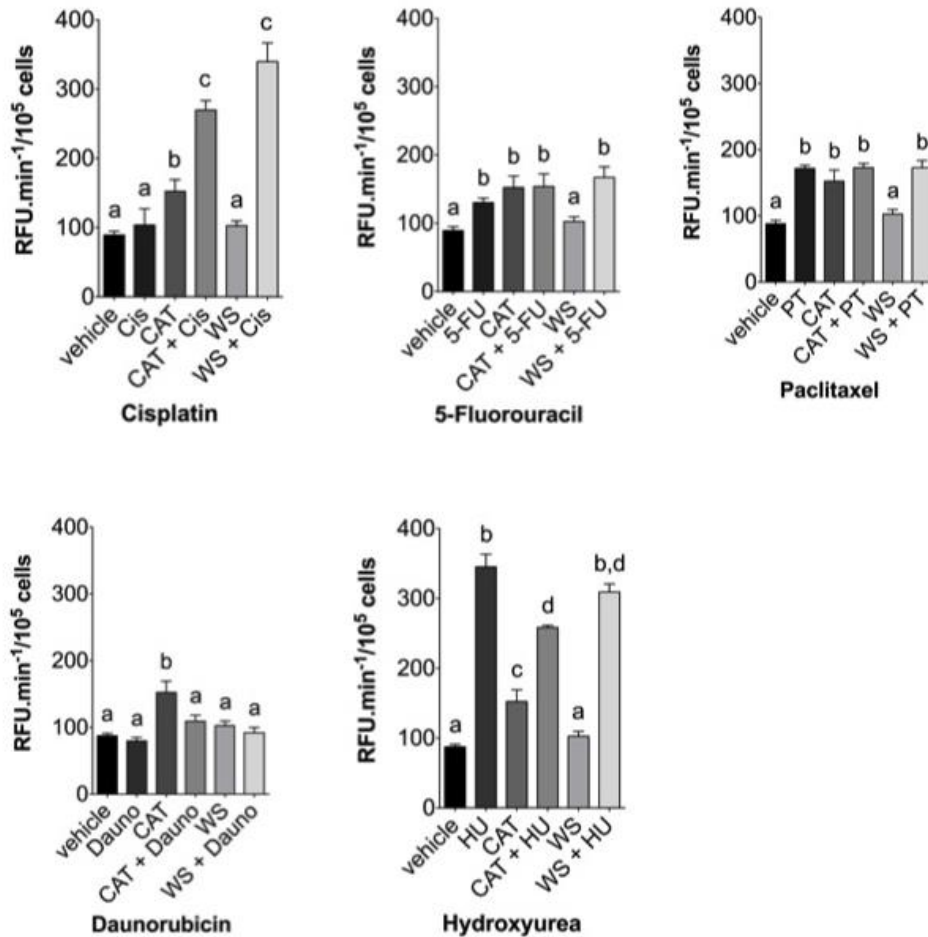
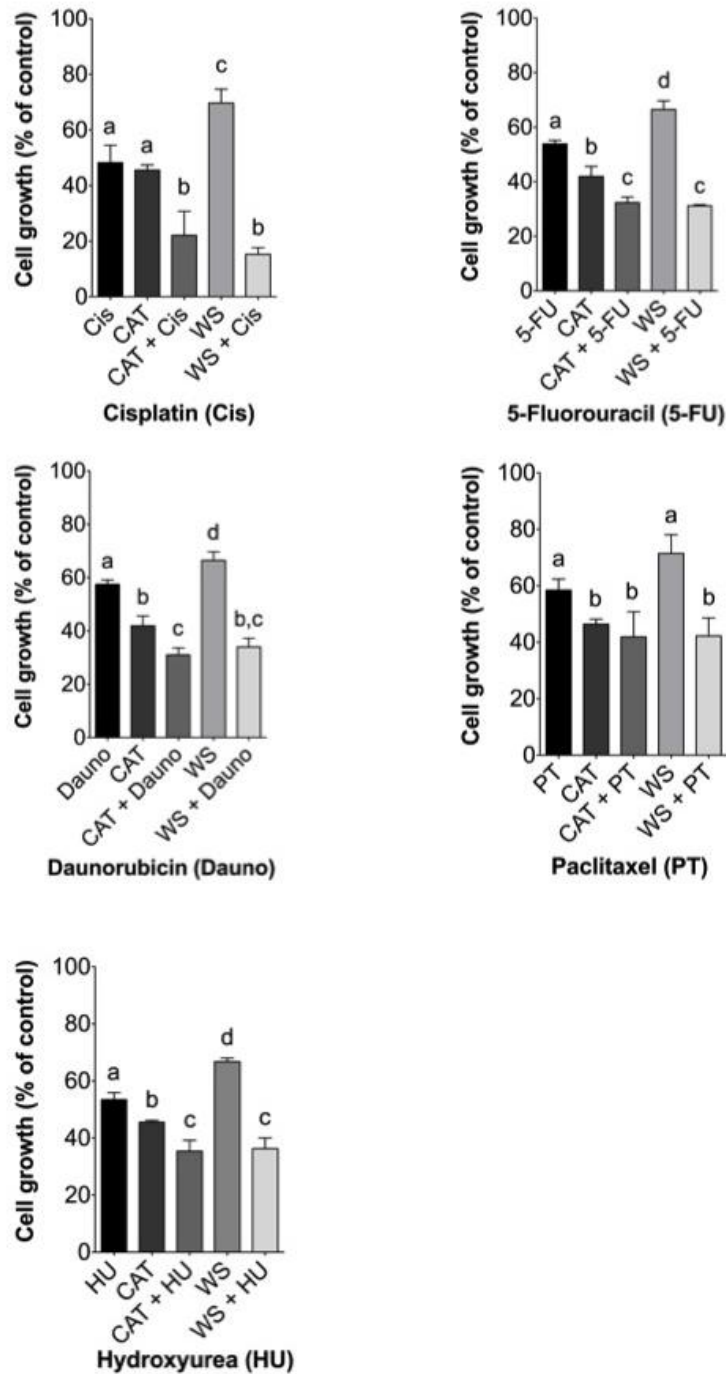


Figure 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by different anticancer drugs and the effect of combined CAT-treatment in human AdC cell lines. Amplex Red<sup>®</sup> assay was

performed to access the intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. (a) Cells were treated with GI<sub>50</sub> of chemotherapeutics for 48h. (b) A549 cells were treated with CAT (1,000 U/mL) or chemotherapy (GI<sub>50</sub>) or with a combination of both. Also, the washout was performed at the time 48 h and to these cells added chemotherapy (GI<sub>50</sub>) and incubated for another 48 h. Data are presented as mean ± S.E.M. \**P* < 0.05 using two-way ANOVA and tukey post-test among groups.



**Figure 5. Co-treatment with CAT and different antineoplastic drugs in human AdC cell line A549.** A549 cells were treated with CAT (1,000 U/mL) or chemotherapy ( $GI_{50}$ ) or with a combination of both. Also, the washout was performed at the time 48 h and to these cells added chemotherapy ( $GI_{50}$ ) and



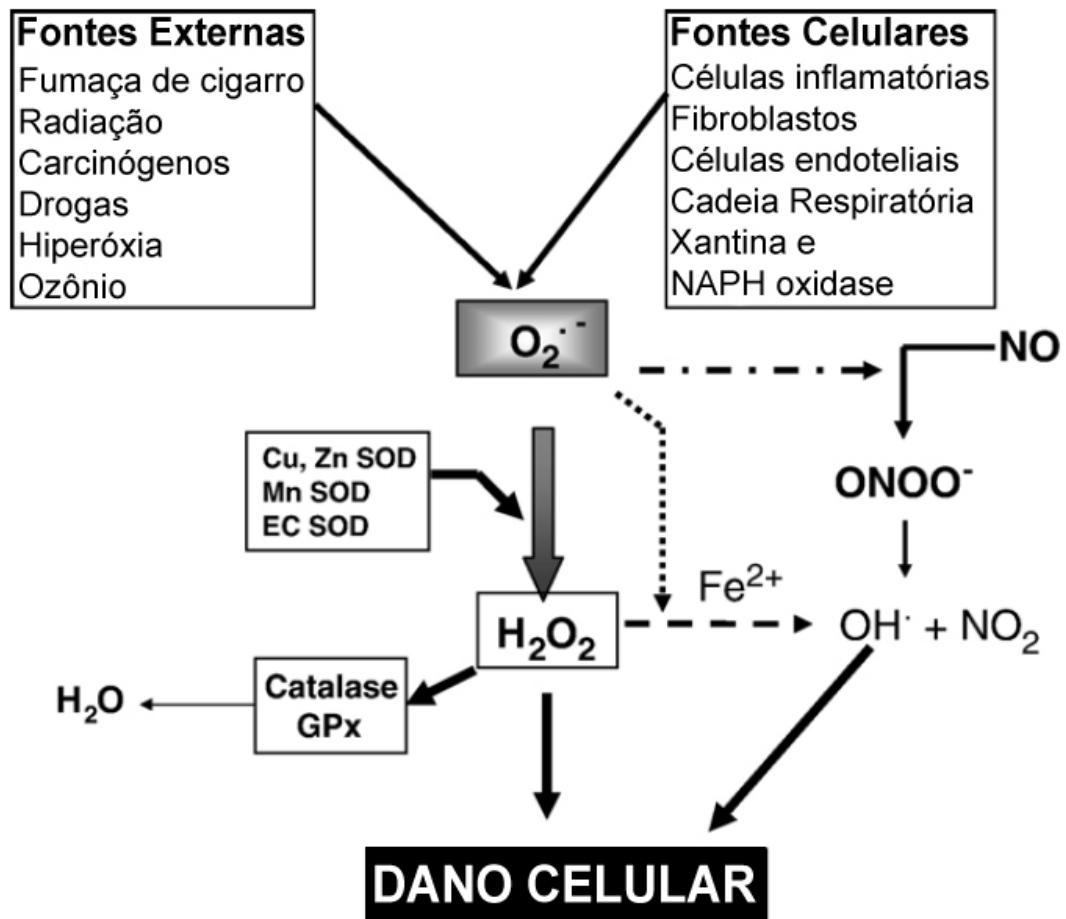
incubated for another 48 h. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  using two-way ANOVA and Tukey post-test among groups.

### **PARTE III**

#### 4. DISCUSSÃO

Entre as neoplasias, o câncer de pulmão é classificado como um dos mais comuns e letais. Embora a quimioterapia apresente eficácia para alguns pacientes com câncer de pulmão, as opções terapêuticas eficazes para estágios avançados da doença continuam limitadas e as taxas de cura são baixas (Molina, Yang, Cassivi, Schild and Adjei 2008). Por exemplo, o tratamento de CPNPC foi revolucionado pelo desenvolvimento de agentes alvos como erlotinib e gefitinib, aprovados pela FDA para pacientes portadores de mutações específicas em EGFR (Ramalingam, et al. 2008). Porém, a decisão do manejo dos pacientes com CPNPC ainda é baseada na extensão anatômica da doença. Entre os fatores que geram a alta taxa de mortalidade, a quimioresistência é um dos mais comuns. Neste contexto, novas terapias combinadas são importantes para superar a resistência às drogas e melhorar o prognóstico dos pacientes com CPNPC.

Considerando que os tumores de pulmões desenvolvem-se em um microambiente pró-inflamatório e pró-oxidante atípico (figura 3) (Rahman, et al. 2006), as ER são especialmente importantes na patogênese do tumor e na eficácia da quimioterapia (Polytarchou, et al. 2005). Como relatado anteriormente, as células cancerígenas têm um desequilíbrio nos parâmetros redox em comparação com as células normais, possuindo um elevado nível “*steady-state*” na produção de ER, que segue a progressão do tumor e, presumivelmente, deve conferir uma vantagem selectiva, bem como qualquer propriedade fenotípica tumoral (da Motta, et al. 2014).



**Figura 3. Equilíbrio redox de células pulmonares.** Fontes de espécies celulares incluem mecanismos intracelulares e células do microambiente adjacente. O desbalanço entre os níveis de oxidantes e antioxidantes pode levar ao dano por estresse oxidativo ou o acúmulo de algum intermediário específico (Rahman, et al. 2006).

Embora, resultados controversos têm sido relatados sobre o envolvimento de  $H_2O_2$  na proliferação celular (Rahman, et al. 2006), previamente nosso grupo demonstrou que a agressividade do AdC de pulmão está relacionada com um elevado estresse oxidativo. Nesse contexto, o  $H_2O_2$  demonstrou-se de suma importância para a proliferação de células tumorais

uma vez que a adição exógena da enzima antioxidante CAT, mas não do Trolox<sup>®</sup> (análogo sintético do alfa-tocoferol) ou N-acetil-cisteína (NAC, um precursor da glutatona), atenuou a agressividade tumoral em linhagens tumorais de câncer de pulmão (da Motta, et al. 2014). Ainda, em outro trabalho em que a CAT foi superexpressada houve reversão das características malignas em linhagens celulares diferentes e o crescimento do tumor e a metástase foram impedidos em modelos animais (Nishikawa, Hashida and Takakura 2009). Dessa forma, tratamos as células A549 com a enzima antioxidante CAT e a diminuição dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causou a inibição da proliferação celular. Assim o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> confirmou-se como um mediador necessário para a proliferação dessas células. A retirada da CAT prontamente restaurou a taxa proliferativa celular aos níveis do controle. Portanto, demonstrando um efeito citostático e não citotóxico, do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular. A diferença na proliferação celular foi estatisticamente significativa nos tempos 48 h e 96 h de tratamento.

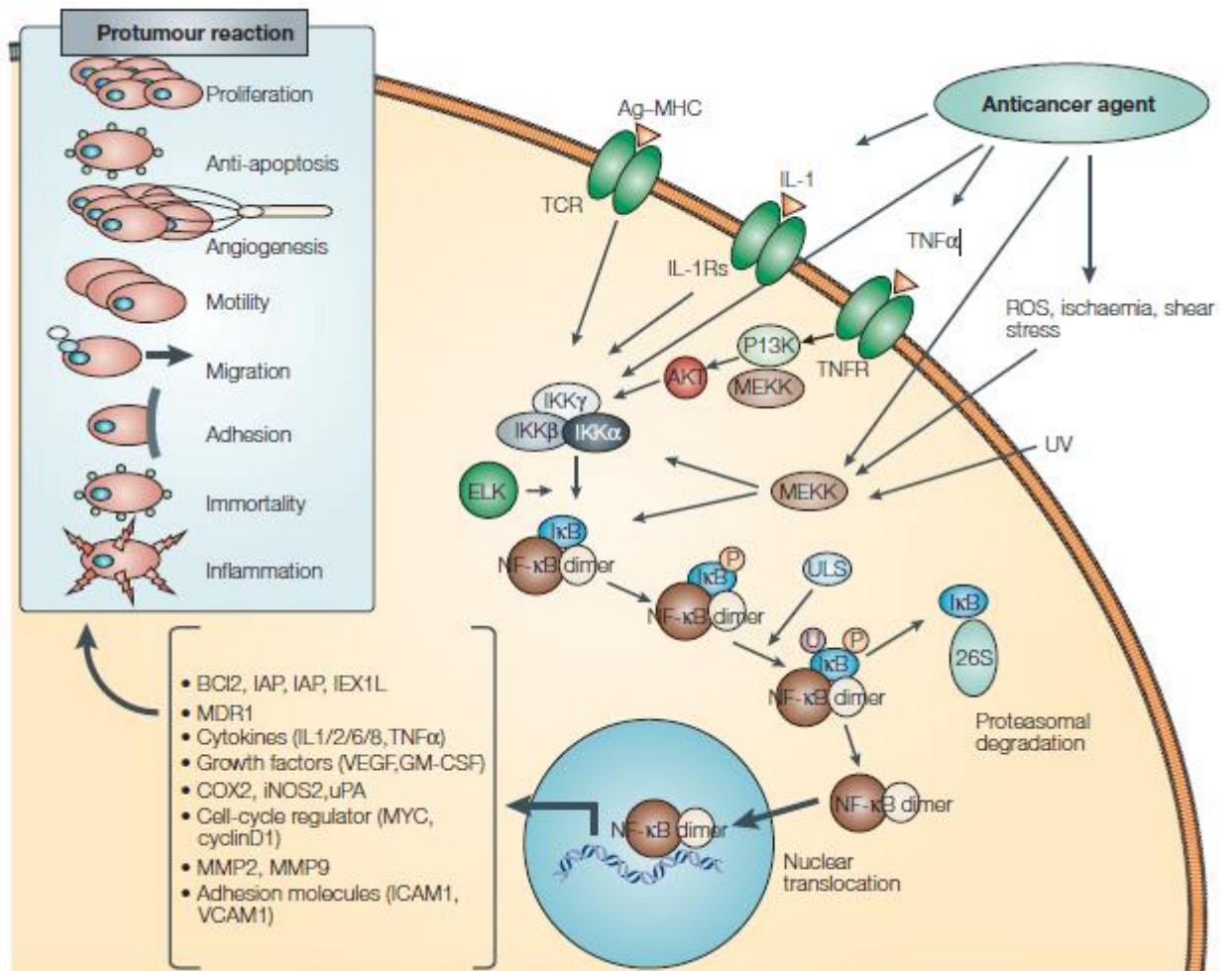
Uma vez que o tratamento com CAT foi eficaz na inibição da proliferação celular, e muitos estudos sugerem que o mecanismo de ação de vários quimioterápicos comumente usados na clínica envolve a geração de espécies reativas, procuramos determinar se este efeito citostático estava relacionado com alterações nas defesas antioxidantes intracelulares. Assim, analisamos os níveis intracelulares de tióis e GSH, o potencial antioxidante e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos tempos de incubação acima citados para avaliar a potencial relação entre as taxas de proliferação celular com o estado redox intracelular. Surpreendentemente nossos resultados demonstraram que o tratamento com CAT diminuiu significativamente os níveis endógenos de tióis (-SH) e a

capacidade antioxidante não enzimática (TRAP). No entanto, os níveis intracelulares de GSH e a produção  $H_2O_2$  foram elevados pelo tratamento com CAT.

Isto pode ser explicado pelo fato da CAT não atravessar as membranas celulares e o  $H_2O_2$  ter a capacidade de difundir-se através das membranas. Assim, para manutenção do equilíbrio químico, a adição de CAT no meio extracelular levaria a um efluxo de  $H_2O_2$  e uma conseqüente redução na concentração de  $H_2O_2$  intracelular. Com isso, a proliferação celular foi reduzida, uma vez que o  $H_2O_2$  é um importante sinalizador para a proliferação celular. Assumindo que a redução na concentração intracelular de  $H_2O_2$  pode estar relacionado com o aumento dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), uma vez que a oxidação da GSH à glutathiona oxidada (GSSG) está diminuída pela menor concentração de  $H_2O_2$ . Ainda, em resposta à menor concentração de  $H_2O_2$  intracelular, as células A549 podem diminuir a síntese de defesas antioxidantes endógenas, justificando, assim, a redução de tióis (-SH) e potencial antioxidante total (TRAP) encontrados em células tratadas com CAT. Além disso, o ensaio com Amplex Red<sup>®</sup> mostrou que o “*steady-state*” de produção de  $H_2O_2$  estava aumentado em células tratadas com CAT. Embora intrigante, estes dados podem estar relacionados com a tentativa de células tumorais para superar o efeito citostático do tratamento com CAT.

Espécies reativas (ER) são predominantemente conhecidas por causar danos às células. No entanto, estudos têm relacionado aumentos nos níveis basais de ER em células tumorais com a progressão tumoral (Policastro, et al. 2004), uma vez que ER desempenham um papel fisiológico importante no controle da sensibilidade redox de factores de transcrição tais como NF $\kappa$ B. O

Factor Nuclear kappa B (NFκB) é um dos principais factores de transcrição que modulam a expressão de genes em resposta a factores de crescimento, agentes pró-inflamatórios, tais como a interleucina-1 (IL-1) fator de necrose tumoral (TNF), oxidantes e também drogas citotóxicas, como demonstrado na figura 3 (Nakanishi, et al. 2005, Zanotto-Filho, et al. 2010). Estudos substanciais indicam que o NFκB regula a oncogênese, progressão tumoral e resistência a quimioterapia, aumentando a transcrição de genes anti-apoptóticos e anti-oxidantes , incluindo Bcl-xL , SOD2 , e a glutathione S – transferase (Schreck, et al. 1991, Nakanishi, et al. 2005, Zanotto-Filho, et al. 2009, Zanotto-Filho, et al. 2010). Além disso, inúmeros relatos mostraram que o NFκB é constitutivamente ativado em algumas linhagens de células de câncer de pulmão. Ainda, em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ao tratamento com fármacos citotóxicos, tais como a cisplatina, daunorrubicina, paclitaxel e 5-Fluorouracil, NFκB pode ser ativado (Nakanishi, et al. 2005, Godwin, et al. 2013). Neste trabalho, observamos um aumento no imunoconteúdo citosólico da subunidade p65 do NFκB, indicando uma redução da ativação deste fator de transcrição. No entanto, o NFκB não parece estar relacionado com quimioresistência em células A549, já que análise dose-efeito pelo CI mostrou uma interação sinérgica com a CAT e as drogas que ativam NFκB como Cisplatina, Daunorubicina e 5- Fluorouracil. Além disso, o paclitaxel também mostrou uma diminuição da eficácia quando co-tratado com CAT.



**Figura 4. Ativação do Fator de Transcrição NFκB (Factor Nuclear kappa B).** Drogas antineoplásicas induzem a translocação do NFκB e a consequente ativação de seus genes alvo (Nakanishi, et al. 2005).

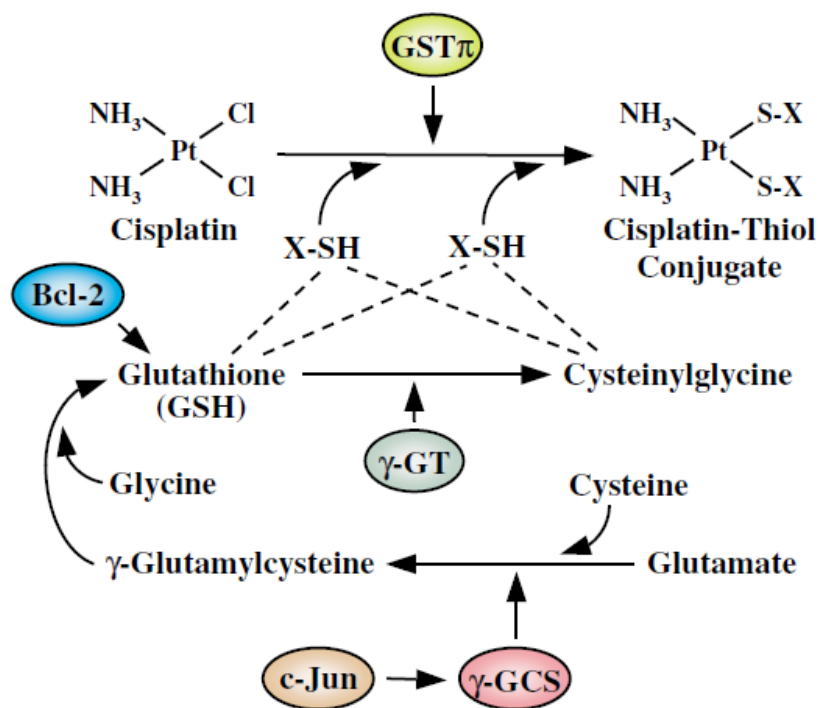
Outro fator que pode ser influenciado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode influenciar é a resposta celular a fármacos antineoplásicos como a cisplatina e outros agentes alquilantes, que são o padrão-ouro para o tratamento de AdC de pulmão. Além disso, em linhagens celulares de AdC, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode aumentar a expressão de APE-1 (uma enzima chave na reparação do DNA) (Yoo, et al. 2008), o que pode conferir resistência a cisplatina (Wang, et al. 2008). Deste modo, o



desequilíbrio redox favorecendo o estresse oxidativo intracelular e a produção de ER elevada pode influenciar a resistência a cisplatina (bem como outros agentes alquilantes), contribuindo para a agressividade do tumor. Desta forma, a retirada de  $H_2O_2$  poderia aumentar a eficácia do tratamento com cisplatina. Nossos resultados corroboram com isso, uma vez que a cisplatina apresentou um efeito sinérgico quando combinada com CAT.

Outro mecanismo redox que pode conferir quimioresistência a cisplatina é o aumento dos níveis de GSH encontrado em células de diversos tipos de câncer, incluindo carcinomas pulmonares (Cook, et al. 1991, Hao, Bergh, Brodin, Heltman and Mannervik 1994). Sabe-se que a reação de conjugação da cisplatina com GSH pode ser catalisada pela glutathione S-transferase  $\pi$  ( $GST\pi$ ) como demonstrado na figura 3, a qual é membro de uma família de enzimas envolvidas nas reações de detoxificação de xenobióticos. O aumento na expressão de  $GST\pi$ , junto com elevados níveis de GSH em células tumorais resistentes, sugerem que a inativação enzimática da cisplatina contribui significativamente para o fenótipo em nível clínico e o aumento nas reações de conjugação entre GSH e cisplatina são geralmente aceitas como um fator significativo na resistência (Siddik 2003). No entanto, estudos mostraram que os oxidantes como o  $H_2O_2$  são capazes de interagir com a região promotora do gene do elemento de resposta antioxidante (ARE), que está envolvida em promover a transcrição dos genes de  $GST\pi$  (Scandalios 2005). Neste caso, uma vez que pela adição da enzima antioxidante CAT temos uma redução da concentração intracelular de  $H_2O_2$ , temos níveis reduzidos de  $GST\pi$ , pois haverá uma menor transcrição de seus genes. Dessa

forma, a cisplatina não é inativada, sendo capaz de exercer seu efeito citotóxico.



**Figura 5. Inativação da cisplatina por GSH.** X-SH = glutathione ou cisteinilglicina (Siddik 2003).

Contudo, embora dentre as drogas testadas apenas a cisplatina seja o padrão-ouro para o tratamento de AdC de pulmão, testamos outras drogas com diferentes mecanismos de ação para avaliar quais estariam sendo beneficiados pela terapia combinada com a enzima antioxidante CAT. Observamos que, além da cisplatina que é um agente aquilante de DNA, a 5-Fluorouracil e a Hidroxiuréia que são antimetabólitos também tiveram um efeito sinérgico quando co-tratadas com CAT. Com isso, nos levando a pensar que essas

drogas também se beneficiam de alguma forma da redução da concentração de  $H_2O_2$  para exercerem seus efeitos citotóxicos.

Quanto ao Paclitaxel a literatura relata que ele necessitaria do  $H_2O_2$  (Alexandre, et al. 2006) para exercer seu efeito citotóxico, de certa forma, nossos resultados corroboram com esses achados, uma vez que pela análise do CI, observamos um efeito antagonista no co-tratamento com CAT.

Dessa forma, compostos que são capazes de reduzir a concentração de  $H_2O_2$  poderiam ser alvos futuros para intervenções terapêuticas combinadas que podem permitir a selectividade terapêutica e superar a resistência a medicamentos que atuam de alguma forma via espécies reativas.

## 5. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos, podemos concluir que a CAT atua inibindo o crescimento celular de forma citostática, onde o  $H_2O_2$  mostrou-se crucial para a proliferação celular. Ainda, os dados aqui apresentados sugerem que a terapia combinada com CAT pode agir sinergicamente com Cisplatina , 5- Fluorouracil e Hidroxiuréia e de forma antagonista com o Paclitaxel. Este efeito está, provavelmente, relacionado com a amplificação da geração de  $H_2O_2$  em *steadt-state* pelas drogas. Nossos dados apontaram para um potencial efeito benéfico da terapia combinada com CAT para o AdC pulmão, fornecendo uma nova estratégia terapêutica para o AdC pulmão.

Desta forma, propomos o uso da terapia combinada com CAT para aumentar a eficácia da cisplatina 5-fluorouracil e hidroxiureia em AdC de pulmão.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, J., et al. (2006), "Accumulation of Hydrogen Peroxide Is an Early and Crucial Step for Paclitaxel-Induced Cancer Cell Death Both in Vitro and in Vivo," *International journal of cancer*, 119, 41-48.

Alexandre, J., Hu, Y., Lu, W., Pelicano, H., and Huang, P. (2007), "Novel Action of Paclitaxel against Cancer Cells: Bystander Effect Mediated by Reactive Oxygen Species," *Cancer research*, 67, 3512-3517.

Baud, V., and Karin, M. (2009), "Is Nf-Kappab a Good Target for Cancer Therapy? Hopes and Pitfalls," *Nat Rev Drug Discov*, 8, 33-40.

Beadsmoore, C. J., and Screaton, N. J. (2003), "Classification, Staging and Prognosis of Lung Cancer," *Eur J Radiol*, 45, 8-17.

Beasley, M. B., Brambilla, E., and Travis, W. D. (2005), "The 2004 World Health Organization Classification of Lung Tumors," in *Seminars in roentgenology*, WB Saunders, pp. 90-97.

Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (2000), "A Family of Drug Transporters: The Multidrug Resistance-Associated Proteins," *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1295-1302.

Bowie, A., and O'Neill, L. A. (2000), "Oxidative Stress and Nuclear Factor-Kappab Activation: A Reassessment of the Evidence in the Light of Recent Discoveries," *Biochem Pharmacol*, 59, 13-23.

Burhans, W. C., and Heintz, N. H. (2009), "The Cell Cycle Is a Redox Cycle: Linking Phase-Specific Targets to Cell Fate," *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 1282-1293.

Connor, K. M., et al. (2007), "Manganese Superoxide Dismutase Enhances the Invasive and Migratory Activity of Tumor Cells," *Cancer research*, 67, 10260-10267.

Cook, J. A., et al. (1991), "Cellular Glutathione and Thiol Measurements from Surgically Resected Human Lung Tumor and Normal Lung Tissue," *Cancer research*, 51, 4287-4294.

da Motta, L. L., et al. (2014), "Imbalance in Redox Status Is Associated with Tumor Aggressiveness and Poor Outcome in Lung Adenocarcinoma Patients," *Journal of cancer research and clinical oncology*, 1-10.

Eastman, A., and Barry, M. A. (1987), "Interaction of Trans-Diamminedichloroplatinum (II) with DNA: Formation of Monofunctional Adducts and Their Reaction with Glutathione," *Biochemistry*, 26, 3303-3307.

Fink, D., Aebi, S., and Howell, S. B. (1998), "The Role of DNA Mismatch Repair in Drug Resistance," *Clinical Cancer Research*, 4, 1-6.

Godwin, P., et al. (2013), "Targeting Nuclear Factor-Kappa B to Overcome Resistance to Chemotherapy," *Frontiers in oncology*, 3.

Halliwell, B. (2006), "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life," *Plant Physiol*, 141, 312-322.

Halliwell, B. (2007), "Biochemistry of Oxidative Stress," *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.

Hao, X.-Y., Bergh, J., Brodin, O., Heltman, U., and Mannervik, B. (1994), "Acquired Resistance to Cisplatin and Doxorubicin in a Small Cell Lung Cancer Cell Line Is Correlated to Elevated Expression of Glutathione-Linked Detoxification Enzymes," *Carcinogenesis*, 15, 1167-1173.

INCA, 2014. <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em 04 de fevereiro de 2014.

Jamnik, S., Santoro, I. L., Borges, E. L., Uehara, C., and da Silva, V. V. (2009), "Estudo Comparativo De Fatores Prognósticos Em Portadores De Carcinoma Não-Pequenas Células De Pulmão: Sobrevida Superior a Cinco Anos E Inferior a Um Ano," *Revista Brasileira de Cancerologia*, 55, 5-10.

Kartalou, M., and Essigmann, J. M. (2001), "Mechanisms of Resistance to Cisplatin," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478, 23-43.

Martin, L. P., Hamilton, T. C., and Schilder, R. J. (2008), "Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways," *Clinical Cancer Research*, 14, 1291-1295.

McWilliams, A., MacAulay, C., Gazdar, A. F., and Lam, S. (2002), "Innovative Molecular and Imaging Approaches for the Detection of Lung Cancer and Its Precursor Lesions," *Oncogene*, 21, 6949-6959.

Mojardín, L., Botet, J., Quintales, L., Moreno, S., and Salas, M. (2013), "New Insights into the Rna-Based Mechanism of Action of the Anticancer Drug 5'-Fluorouracil in Eukaryotic Cells," *PLoS One*, 8, e78172.

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., and Adjei, A. A. (2008), "Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship," *Mayo Clin Proc*, 83, 584-594.

Mountzios, G., Dimopoulos, M. A., Soria, J. C., Sanoudou, D., and Papadimitriou, C. A. (2010), "Histopathologic and Genetic Alterations as Predictors of Response to Treatment and Survival in Lung Cancer: A Review of Published Data," *Crit Rev Oncol Hematol*, 75, 94-109.

Nakanishi, C., and Toi, M. (2005), "Nuclear Factor-KappaB Inhibitors as Sensitizers to Anticancer Drugs," *Nat Rev Cancer*, 5, 297-309.

National Cancer Institute, 2014. <http://www.cancer.gov/>. Acesso em 03 de fevereiro de 2014.

Nelson, K. K., et al. (2003), "Elevated Sod2 Activity Augments Matrix Metalloproteinase Expression Evidence for the Involvement of Endogenous Hydrogen Peroxide in Regulating Metastasis," *Clinical Cancer Research*, 9, 424-432.

Nelson, K. K., et al. (2006), "Redox-Dependent Matrix Metalloproteinase-1 Expression Is Regulated by Jnk through Ets and Ap-1 Promoter Motifs," *Journal of Biological Chemistry*, 281, 14100-14110.

Nishikawa, M., Hashida, M., and Takakura, Y. (2009), "Catalase Delivery for Inhibiting Ros-Mediated Tissue Injury and Tumor Metastasis," *Advanced drug delivery reviews*, 61, 319-326.

Pani, G., Galeotti, T., and Chiarugi, P. (2010), "Metastasis: Cancer Cell's Escape from Oxidative Stress," *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 351-378.

Panis, C., et al. (2012), "Oxidative Stress and Hematological Profiles of Advanced Breast Cancer Patients Subjected to Paclitaxel or Doxorubicin Chemotherapy," *Breast cancer research and treatment*, 133, 89-97.

Pedersen, M. Ø., Larsen, A., Stoltenberg, M., and Penkowa, M. (2009), "The Role of Metallothionein in Oncogenesis and Cancer Prognosis," *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 44, 29-64.

Perkins, N. D. (2007), "Integrating Cell-Signalling Pathways with Nf-KappaB and Ikk Function," *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 49-62.

Policastro, L., et al. (2004), "Imbalance of Antioxidant Enzymes in Tumor Cells and Inhibition of Proliferation and Malignant Features by Scavenging Hydrogen Peroxide," *Mol Carcinog*, 39, 103-113.

Polytarchou, C., Hatziapostolou, M., and Papadimitriou, E. (2005), "Hydrogen Peroxide Stimulates Proliferation and Migration of Human Prostate Cancer Cells through Activation of Activator Protein-1 and up-Regulation of the Heparin Affin Regulatory Peptide Gene," *Journal of Biological Chemistry*, 280, 40428-40435.

Rabik, C. A., and Dolan, M. E. (2007), "Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents," *Cancer treatment reviews*, 33, 9-23.

Rahman, I., Biswas, S. K., and Kode, A. (2006), "Oxidant and Antioxidant Balance in the Airways and Airway Diseases," *European journal of pharmacology*, 533, 222-239.

Ramalingam, S., and Belani, C. (2008), "Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions," *The Oncologist*, 13, 5-13.

Ranganathan, A. C., et al. (2001), "Manganese Superoxide Dismutase Signals Matrix Metalloproteinase Expression Via  $H_2O_2$ -Dependent Erk1/2 Activation," *Journal of Biological Chemistry*, 276, 14264-14270.

Saban, N., and Bujak, M. (2009), "Hydroxyurea and Hydroxamic Acid Derivatives as Antitumor Drugs," *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 64, 213-221.

Sakon, S., et al. (2003), "Nf-Kappab Inhibits Tnf-Induced Accumulation of Ros That Mediate Prolonged Mapk Activation and Necrotic Cell Death," *EMBO J*, 22, 3898-3909.

Scandalios, J. (2005), "Oxidative Stress: Molecular Perception and Transduction of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014.

Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991), "Reactive Oxygen Intermediates as Apparently Widely Used Messengers in the Activation of the Nf-Kappa B Transcription Factor and Hiv-1," *EMBO J*, 10, 2247-2258.



Sher, T., Dy, G. K., and Adjei, A. A. (2008), "Small Cell Lung Cancer," *Mayo Clin Proc*, 83, 355-367.

Siddik, Z. H. (2003), "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance," *Oncogene*, 22, 7265-7279.

Stone, J. R., and Yang, S. (2006), "Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger," *Antioxidants & redox signaling*, 8, 243-270.

Storz, P. (2005), "Reactive Oxygen Species in Tumor Progression," *Front Biosci*, 10, 1881-1896.

Subramanian, J., and Govindan, R. (2007), "Lung Cancer in Never Smokers: A Review," *J Clin Oncol*, 25, 561-570.

Tew, K. D. (1994), "Glutathione-Associated Enzymes in Anticancer Drug Resistance," *Cancer research*, 54, 4313-4320.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006), "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer," *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.

Visconti, R., and Grieco, D. (2009), "New Insights on Oxidative Stress in Cancer," *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12, 240-245.

Wang, L., et al. (2008), "Peroxide Is a Key Mediator of Bcl-2 Down-Regulation and Apoptosis Induction by Cisplatin in Human Lung Cancer Cells," *Molecular pharmacology*, 73, 119-127.

Wang, W., Cassidy, J., O'Brien, V., Ryan, K. M., and Collie-Duguid, E. (2004), "Mechanistic and Predictive Profiling of 5-Fluorouracil Resistance in Human Cancer Cells," *Cancer research*, 64, 8167-8176.

World Health Organization, 2014. <http://www.who.int/en/>. Acesso em 03 de fevereiro de 2014.

Yoo, D. G., et al. (2008), "Alteration of Ape1/Ref-1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: The Implications of Impaired Extracellular Superoxide Dismutase and Catalase Antioxidant Systems," *Lung Cancer*, 60, 277-284.

Zanotto-Filho, A., et al. (2010), "The Pharmacological Nfkappab Inhibitors Bay117082 and Mg132 Induce Cell Arrest and Apoptosis in Leukemia Cells through Ros-Mitochondria Pathway Activation," *Cancer Lett*, 288, 192-203.

Zanotto-Filho, A., et al. (2009), "The Nf Kappa B-Mediated Control of Rs and Jnk Signaling in Vitamin a-Treated Cells: Duration of Jnk-Ap-1 Pathway Activation May Determine Cell Death or Proliferation," *Biochem Pharmacol*, 77, 1291-1301.