

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Efeitos do co-tratamento de ácido retinoico e cisplatina sobre processos
envolvendo senescência celular em células da linhagem A549**

DIEGO AUGUSTO DOMINGUES

Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Efeitos do co-tratamento de ácido retinoico e cisplatina sobre processos
envolvendo senescência celular em células da linhagem A549**

DIEGO AUGUSTO DOMINGUES

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Banca examinadora:

Dr. Cristiano Feijó Andrade (UFRGS)

Dr. Guido Lenz (UFRGS)

Dra. Florência Maria Barbé-Tuana (PUCRS)

Porto Alegre

2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer meu orientador, o Prof. José Cláudio Fonseca Moreira, por ter me acolhido carinhosamente em seu laboratório. Agradeço a ele por toda a confiança e paciência para comigo. O período do mestrado foi muito conturbado pessoalmente falando, e o Zé conseguiu me manter até o fim. Obrigado por tudo Zé!!

Quero agradecer à minha família que me apoia sempre, principalmente ao meu pai, Cesar, à minha mãe Simoni, à minha irmã Larissa, e à minha avó Dalva. Sem a base da educação que eles me ofereceram, com certeza não estaria aqui hoje.

Muito obrigado aos amigos Giovanni Andrade e a Amanda que me ajudaram diretamente no trabalho e fizeram com que a rotina se tornasse mais prazerosa. Agradeço também o auxílio indispensável dos professores Daniel Gelain e Fabrício Figueiró para a conclusão do trabalho. E agradecer a todos os amigos e colegas do laboratório 32, principalmente ao Giovanni, Lucas, Gabriel, Carol, Henrique, Alexandre, Suelen, Roberto, Alana e Nauana.

Agradeço ao PPGBCM como um todo por ter me proporcionado esta experiência. Obrigado também a todos os professores e funcionários do CBIOT e do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Quero agradecer principalmente a Sílvia da secretaria do PPGBCM por ser a pessoa mais eficiente que já conheci, além de espalhar alegria por onde passa.

E por último, obrigado aos membros da banca pelo aceite e obrigado por tomarem parte de seu tempo para contribuir com este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIACOES.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Senescência celular e câncer	10
1.1.1) Visão geral.....	10
1.1.2) Definições.....	11
1.1.3) Abordagens terapêuticas.....	13
1.2 Cisplatina, cido retinoico e câncer	15
1.2.1) Cisplatina.....	15
1.2.2) cido retinoico	17
1.3 Modelo de estudo	19
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos	20
4. ARTIGO CIENTÍFICO	21
5. CONSIDERAOES FINAIS E CONCLUSÃO	48
6. PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

As terapias tradicionais no combate ao câncer baseiam-se em estratégias de tratamento citotóxicas onde a completa destruição celular otimiza o potencial de sobrevivência dos pacientes. Porém, muitas abordagens são limitadas devido aos efeitos colaterais, que incluem o desenvolvimento de resistência ao tratamento e recorrência tumoral. Buscando-se otimizar as respostas aos tratamentos surgem novas combinações de fármacos, como é o caso da combinação de cisplatina e ácido retinoico em câncer de pulmão. Apesar disso, a cisplatina é uma droga indutora de senescência celular em diferentes linhagens. Células senescentes permanecem viáveis e metabolicamente ativas, paradas no ciclo celular, e em contraste às células sujeitas a apoptose em resposta a drogas citotóxicas, células senescentes podem persistir no microambiente tumoral. Desta forma torna-se necessário um melhor entendimento dos efeitos dessas combinações e a relação destas com os processos celulares de adaptação ao estresse. O objetivo principal do trabalho foi avaliar os efeitos da combinação de cisplatina e ácido retinoico no tratamento de uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar chamada A549, investigando o papel da senescência celular e sua relação com processos celulares como apoptose e autofagia. O tratamento foi desenhado da seguinte forma: pré-incubação com ácido retinoico durante 24 horas, seguido de co-tratamento com cisplatina e ácido retinoico em períodos de 24, 48 e 72 horas. As doses de cisplatina dos grupos variaram de 0, 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto que a dose de ácido retinoico foi de 20 μM . As células positivas para senescência celular foram identificadas por microscopia ótica através do ensaio da β -galactosidase associada à senescência, mostrando que grupos contendo somente cisplatina induzem a senescência celular de maneira dose e tempo dependente, enquanto que grupos contendo ácido retinoico demonstraram uma evasão da indução do processo senescente. O ensaio de ciclo celular revelou que os grupos tratados somente com cisplatina tiveram uma desregulação do ciclo celular, quando comparados aos grupos tratados com cisplatina e ácido retinoico, causando uma mudança nos estados de G1 para estados S/G2 do ciclo celular. O ensaio de anexina V-FITC revelou que os grupos tratados com ácido retinoico tiveram a viabilidade celular aumentada quando comparadas com grupos com apenas cisplatina. O ensaio de laranja de acridina apontou que os grupos tratados com ácido retinoico tiveram maior taxa de células marcadas para autofagia quando comparadas

tanto ao controle quanto a grupos tratados somente com cisplatina. Já os ensaios de MitoStatus TMRE mostraram que os grupos contendo ácido retinoico tiveram o potencial de membrana aumentado quando comparado aos outros grupos, inferindo que a viabilidade celular geral é diretamente relacionada à viabilidade ou saúde mitocondrial. Esses resultados sugerem que a cisplatina combinada ao ácido retinoico no tratamento contra câncer de pulmão na clínica deve ser reinvestigado e reconsiderado, tendo em vista que o escape do processo de senescência celular é um mecanismo conhecido de desenvolvimento de tumor em diversas células imortalizadas humanas. Além disso, grupos contendo ácido retinoico demonstraram uma morfologia e fisiologia mais saudável em relação aos grupos que continham cisplatina, significando que o ácido retinoico pode impactar na genotoxicidade da cisplatina. Em uma situação onde a cisplatina tem um papel na senescência induzida por terapia, seria sensato adotar o uso de agentes senolíticos como uma segunda linha de tratamento para minimizar a possível recuperação de subpopulações e evitar a recorrência da doença.

ABSTRACT

Traditional cancer therapies rely on cytotoxic treatment strategies where the complete cellular destruction of tumour optimizes the potential for patient survival. However, many approaches are limited due to side effects, including development of resistance to treatment and cancer recurrence. In attempt to optimize treatment response, new drugs combinations emerged, such as the combination of cisplatin and retinoic acid in lung cancer. However, cisplatin seems to induce cellular senescence in different cell lines. Senescent cells remain viable and metabolically active, while cell-cycle arrested; and in contrast to cells subjected to apoptosis in response to cytotoxic drugs, senescent cells can persist in the tumour microenvironment. Thus, a better understanding of the effects of these combinations and their relationship with cellular processes of stress adaptation becomes necessary. The main objective of this work was to evaluate the effects of the combination of cisplatin and retinoic acid treatment in A549 human lung carcinoma cell line, inspecting the role of senescence and the relation between cellular processes such as apoptosis and autophagy. The treatment was designed thusly: pre-incubation with retinoic acid during 24 hours, followed by co-treatment with cisplatin and retinoic acid in periods of 24, 48 and 72 hours. Cisplatin doses in groups were 0, 1 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, along with retinoic acid in 20 μM . Positive senescent cells were identified through the SA- β -Gal assay by optical microscopy, showing us that cisplatin only groups induces cell senescence in a dose and time-dependent manner, meanwhile groups containing retinoic acid leads to evasion from the senescence induction by cisplatin. The cell cycle assay revealed that cisplatin-only treated groups showed a cell cycle deregulation compared to retinoic acid + cisplatin groups causing a shift from G1 state to a S/G2 cell cycle state. The annexin V-FITC assay unveiled that groups treated with retinoic acid had their cellular viability raised when compared to cisplatin-only groups. Acridine orange staining assay uncovered that retinoic acid groups augmented autophagy cell state compared both to controls and to cisplatin-only groups. MitoStatus TMRE assay showed us that groups containing retinoic acid had their mitochondria membrane potential state augmented when compared to cisplatin-only groups, inferring that the overall cell viability is related to overall mitochondrial health. Results have suggested that retinoic acid combined to cisplatin use in treatment against lung adenocarcinoma in clinic should be re-investigated and reconsidered as escape from senescence is a well-

known mechanism of tumour development in many immortalized human cells. Besides that, retinoic acid groups showed a healthier morphology and physiology when compared to cisplatin groups, meaning that retinoic acid might impact cisplatin genotoxicity. In a situation where cisplatin plays role in a therapy-induced senescence, it would be wise to adopt the use of so called senolytic agents as a second line treatment to minimize subpopulation recovery and avoid disease recurrence.

LISTA DE ABREVIações

AR: ácido todo-trans-retinoico

Bax: regulador da apoptose, membro da família Bcl2

BCL: grupo de família de proteínas reguladoras da apoptose

CAF: fibroblastos relacionados ao câncer

EROs: espécies reativas de oxigênio

FDA: Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos

HRASG12V: variante oncogênica do oncogene homólogo do sarcoma viral de camundongo de Harvey

LMA: leucemia mieloide aguda

NF-κB: fator nuclear kappa B

NSCLC: câncer de pulmão de não pequenas células

OPAS: Organização Pan Americana da Saúde

RAR: receptor de ácido retinoico

RAREs: elementos responsivos ao ácido retinoico

RXR: receptores X de retinoides

SAHF: heterocromatina foci associada à senescência

SASPs: fenótipo secretor associado a senescência

SA-β-GAL: β-galactosidase associada à senescência

TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Senescência celular e câncer

1.1.1) Visão geral

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e é responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. Em escala global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença. Os tipos mais comuns de câncer são o de pulmão, mama, colorretal e de próstata, somando juntos mais de 7,6 milhão de casos, porém os mais letais são os cânceres de pulmão, colorretal, estômago, fígado e mama, que juntos somam 4,814 milhões de mortes (Organização Pan-Americana da Saúde, 2018). As modalidades no tratamento de câncer mais utilizadas segundo o órgão norte-americano NCDB (*National Cancer Data Base*) são a cirurgia, a terapia por radiação, e tratamento sistêmico, incluindo quimioterapia, terapia-alvo, terapia hormonal, e imunoterapia (Miller et al. 2019). As terapias no tratamento de câncer tradicionais baseiam-se em abordagens citotóxicas, onde a completa destruição celular do tumor otimiza as chances de sobrevivência do paciente. Porém, essas abordagens são comumente limitadas por agregarem efeitos colaterais, que podem incluir resistência ao tratamento, reações alérgicas, surgimento de cânceres secundários, e recorrência tumoral. Uma estratégia promissora, de segunda linha, fundamenta-se na indução de citoestase por senescência celular induzida por terapia, com posterior uso de drogas chamadas senolíticas, que visa a remoção e/ou morte das células senescentes como alvo específico, geralmente inibindo tanto proteínas de sobrevivência da família BCL, quanto outros efetores anti-apoptóticos (Short et al. 2019). Neste contexto, células danificadas, que possuem risco de transformação neoplásica, podem ser neutralizadas por apoptose ou engajadas a entrar no processo de senescência, cuja característica implica em uma parada de proliferação e que possui um secretoma bioativo, modulando o sistema imune. Células apoptóticas são reconhecidas por remodelar o microambiente tumoral atraindo macrófagos para os sítios onde estão presentes fatores de membrana com sinais de morte, facilitando o processo de fagocitose. Dessa forma, a invasão de macrófagos e outras células do sistema imune no tumor é acompanhada pela secreção de fatores de crescimento e citocinas

modulatórias que podem impactar na capacidade maligna da população tumoral (Lauber et al. 2003).

Apesar de no aspecto evolutivo o processo senescente ser visto como benéfico, protegendo contra malignidades causadas por acúmulo de dano celular; no envelhecimento, o acúmulo dessas células nos tecidos e órgãos acaba por causar patologias com efeitos prejudiciais. Além disto, estudos recentes mostram que células tumorais induzidas a estado de senescência a partir de exposição de drogas quimioterápicas podem renovar sua capacidade proliferativa. Dessa forma, células senescentes tumorais que sobreviveram à terapia podem representar uma forma de dormência tumoral; onde a senescência se torna uma via à qual células tumorais evadem diretamente do impacto citotóxico da terapia, entrando em um estado de parada proliferativa —onde raras células tumorais proliferativas podem reemergir meses ou até anos após pacientes terem sido curados da doença primária (Saleh, Tyutyunyk-Massey e Gewirtz 2019). Por causa do aumento de terapias relacionadas com o programa senescente estar em ascensão, cada vez mais torna-se importante entender os efeitos prejudiciais da relação complexa entre o câncer e a senescência celular.

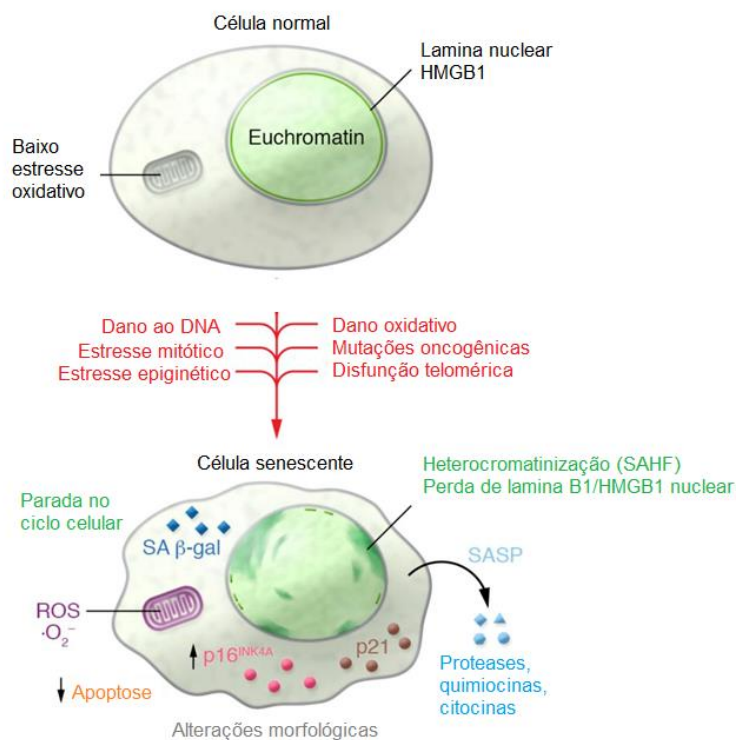
1.1.2) Definições

Hayflick e Moorhead em 1961 observaram um fenômeno em cultura celular, onde fibroblastos humanos normais não conseguiam se proliferar indefinidamente e as células gradualmente paravam de se multiplicar e sofriam alterações fenotípicas, como aumento de tamanho e surgimento de grânulos citosólicos. Além disso, Hayflick e Moorhead especularam a existência de fatores celulares que poderiam estar envolvidos no processo de envelhecimento organismal. Esse fenômeno foi nomeado de senescência celular (Hayflick e Moorhead 1961) (Hayflick 1965). A senescência celular é um estado de parada do ciclo celular, usualmente através da expressão e ativação da via de p16^{INK4a}-Rb (retinoblastoma) e/ou de p53 e seus mediadores. Além disto, estas células apresentam resistência à apoptose em resposta a diversos estímulos de dano. Estes estímulos ou sinais podem advir de diversas condições, dentre elas a disfunção telomérica, estresse oxidativo, mudanças na arquitetura da cromatina, disfunção mitocondrial, estresse mitótico e proteotoxicidade (Fig. 1)

(Childs et al. 2015) (Muñoz-Espín e Serrano 2014) (Van Deursen 2014). As características moleculares de senescência celular incluem a regulação positiva de inibidores de ciclo celular como p21 e/ou p16, a marcação positiva da β -galactosidase associada à senescência (*SA- β -GAL*) (He et al. 2017) (Dimri 1995), a formação de heterocromatina foci associada à senescência (*SAHF*) (Yamauchi et al. 2017), e a indução de dano ao DNA associado à senescência (Kim et al. 2017).

Senescência celular é um processo que apresenta efeito dual e/ou controverso; em um sentido dispõe de potencial mecanismo molecular para uma célula evitar transformação maligna; e de outro, há evidências que demonstram alterações no microambiente tumoral através de fenótipo secretor associado a senescência (*SASP*), que inclui expressão e excreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e proteases; ocasionando um estímulo no desenvolvimento do câncer (Coppe 2008). A senescência durante o tratamento do câncer pode impactar de forma ambígua a resposta ao tumor, que exemplifica a complexidade desse processo *in vivo* e eleva questões em relação à irreversibilidade da senescência celular (Zeng, Shen, e Liu 2018).

Figura 1: Características do processo senescente. Estressores tanto intrínsecos quanto extrínsecos podem estimular a conversão de uma célula normal para uma célula senescente. Uma vez neste processo, múltiplos fenótipos podem ser observados, que dependem do tipo celular e do estímulo indutor de senescência (adaptado de Baker e Petersen, 2018 – doi: 10.1172/JCI95145).



1.1.3) Abordagens terapêuticas

Drogas citotóxicas e genotóxicas são amplamente utilizadas em terapias no tratamento do câncer, e geralmente têm como alvo os mecanismos de divisão celular de células proliferativas (Dy e Adjei 2008). Entretanto, diversos efeitos colaterais são atrelados a esse uso em humanos, dentre eles destacam-se a imunossupressão, fadiga, náusea, diarreia e alopecia (Schunemann e Rauchhaus 2008). Complementarmente, quando esse grupo de drogas ocasiona a destruição aguda de células malignas, os conteúdos celulares são liberados para o ambiente extracelular, elevando assim drasticamente os níveis de ácido úrico, potássio e fósforo, promovendo a condição de síndrome de lise tumoral, podendo acarretar disfunção renal, convulsões e até morte súbita (Darmon et al. 2008). Além disso, estudos em pacientes infanto-juvenis sobreviventes de câncer demonstraram patologias a longo prazo relacionadas ao envelhecimento, que inclui disfunção de órgãos, distúrbios cognitivos, e neoplasmas secundários (Hudson et al. 2013).

A literatura recente sugere que a quimioterapia citotóxica induz senescência celular em humanos. Wood e colaboradores em 2016 mostraram que a quimioterapia em pacientes de mieloma altera a composição das células T, reduz o tamanho dos telômeros, e induz senescência celular através da expressão de p16^{INK4a}. Além disso, os autores, ao observarem diferenças na expressão de p16^{INK4a} entre pacientes que tiveram terapias diferentes; um recebendo agentes alquilantes e antraciclinas e outro recebendo drogas não-citotóxicas como bortezomibe e lenalidomida, sugeriram que a quimioterapia citotóxica em mieloma pode ser mais promotora de envelhecimento que drogas não-citotóxicas.

Em 2017, Demaria e colegas demonstraram, em modelo de camundongo p16-3MR (cujas células senescentes p16^{INK4}-positivas podem ser detectadas *in vivo*), uma indução de senescência ocasionada por diversos agentes quimioterápicos comumente utilizados no tratamento de cânceres, como doxorrubicina, paclitaxel, temozolamida e cisplatina. Adicionalmente, estas drogas provocaram adversidades como dano ao DNA, ativação de genes codificando fatores de SASPs, que contribuíram para inflamação sistêmica, e disfunção cardíaca —complicações as quais foram atenuadas após morte das células senescentes utilizando tratamento com ganciclovir, referido como droga senolítica em recentes estudos.

Saleh et al., em 2019, constatou um resgate da capacidade proliferativa de células tumorais de diferentes linhagens (H460, HCT116 e 4T1) induzidas a senescência por etoposídeo e doxorubicina. As células que continham o fenótipo senescente também foram capazes de formar tumores *in vivo*, quando implantados em camundongos imunocompetentes e imunodeficientes. Este trabalho sugeriu que a parada na proliferação é apenas temporária e que a recuperação proliferativa é dependente da manutenção e/ou estabilidade do fenótipo senescente, onde apenas uma subpopulação terá competência para escapar do estado de parada do ciclo celular. Sendo assim, as células tumorais senescentes podem se manter viáveis e dormentes mesmo após longos períodos de tempo após tratamento citotóxico e eventualmente contribuir para a recorrência da doença.

Diante desta problemática, novas estratégias surgiram para a terapia do câncer, como a incorporação de agentes senolíticos, cuja função parece eliminar as células senescentes, mas não as células normais proliferativas ou quiescentes. Por exemplo, *in vivo*, a combinação de dasatinibe e quercetina foi eficiente em reduzir a carga de células senescentes em camundongos velhos expostos à radiação. Além disso, foi relatada melhora do condicionamento físico e motor e da função cardíaca e reatividade vascular apenas cinco dias após uma única dose. A administração periódica do tratamento também estendeu a expectativa de vida de camundongos *Ercc1* (Delta/-), retardando e aliviando sintomas relacionados ao envelhecimento, incluindo osteoporose e perda de proteoglicanos do disco intervertebral (Zhu et al. 2015). Uma das vantagens do uso de senolíticos sobre terapias tradicionais de câncer é que células senescentes não são geneticamente instáveis, significando que a resistência tumoral a senolíticos pode não desenvolver com a mesma velocidade como vista nas outras terapias de câncer (He e Sharpless 2017).

Outro tipo de estratégia ainda muito utilizada no combate ao câncer é o uso combinatório de drogas. No caso específico de câncer de pulmão, combinações de drogas como cisplatina, paclitaxel e ácido retinoico sugerem aumentar a taxa de resposta e a sobrevida livre de progressão em pacientes com câncer de pulmão de não-pequenas células (do inglês *non small cell lung cancer* – NSCLC) (Arrieta et al. 2010). Alguns outros resultados pré-clínicos também demonstraram eficácia na combinação de cisplatina e ácido retinoico em células de câncer de pescoço, de câncer de cabeça, e células de adenocarcinoma ovariano. Esta interação foi relatada

mostrando efeito sinérgico, induzindo um aumento de morte por apoptose, e diminuindo expressão da proteína Bcl-2 relativa a Bax (Aebi et al. 1997). Além disso, a combinação de cisplatina e ácido retinoico parece diminuir neuropatias induzidas por quimioterapia e aumentar níveis do fator de crescimento nervoso (do inglês *nerve growth factor* – NGF) em pacientes de com câncer de pulmão de não-pequenas células (Arrieta et al. 2011). Apesar da interação de cisplatina e ácido retinoico mostrarem-se benéficos, outros dados da literatura demonstram um efeito contrário causado pelo ácido retinoico, onde este dispõe de atividade anti-apoptótica e melhora a sobrevivência de células progenitoras da retina (Kholodenko et al. 2007); além de também aumentar o crescimento e melhorar a sobrevivência geral de células de câncer de mama em camundongos (Schug et al. 2007). Desta forma, é necessário um melhor entendimento molecular da interação entre cisplatina e ácido retinoico, e seus processos relacionados, se quisermos estender seu uso de forma clínica.

1.2 Cisplatina, ácido retinoico e câncer

1.2.1) Cisplatina

A cisplatina [cis-diaminodicloroplatina (II)] é uma das substâncias mais utilizadas como terapia de primeira linha no tratamento de diversos tipos de câncer sólidos, como câncer de pulmão, ovário, testículo, cabeça e pescoço. Seus efeitos colaterais, no entanto, podem envolver nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náusea, vômitos, alopecia, esterilidade, infarto do miocárdio, trombose cerebrovascular, dentre outros (Thirumaran, Prendergast e Gilman 2007). Sua atividade como droga anticâncer foi descoberta por Rosenbert et al. em 1969, e desde então, tornou-se o primeiro composto baseado em platina a ser aprovado pelo órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*). A molécula de cisplatina, que possui um átomo central de platina em sua estrutura, reage aos resíduos de purina tendo efeito direto com o DNA em dois sítios distintos formando ligações cruzadas do tipo inter e intrafilamentares, levando à uma inibição da síntese e transcrição do DNA através da estagnação da forquilha de replicação e da quebra da dupla fita de DNA (Fig. 2A) (de Almeida et al. 2005).

Pelo fato de a cisplatina induzir ativação de vias de resposta a estresse oxidativo e genotoxicidade, a resistência é bastante comum em pacientes que

receberam tratamento com esta droga. A aquisição de resistência pode estar relacionada à entrada da cisplatina nas células. Alterações da captação da droga pela membrana plasmática através de transportadores ativos e efluxo podem ser responsáveis pela redução do acúmulo das drogas em células resistentes. Outros mecanismos moleculares de resistência à cisplatina foram relatados *in vitro*, dentre eles: (i) mutações na proteína supressora de tumor p53, (ii) detoxificação pela conjugação de cisplatina a glutathione, associada a um aumento do processo de exportação, e (iii) aumento das vias de reparo de dano ao DNA. (Hall et al. 2008) (Perego et al. 1996) (Oliver et al. 2010).

Apesar da cisplatina ser extensivamente utilizada visando a indução da apoptose ou morte celular programada, diversos trabalhos na literatura demonstram evidências da indução de senescência celular por cisplatina de forma dose e linhagem-dependente. Xianghong et al., em 1998, demonstrou uma parada na proliferação em células de carcinoma nasofaríngeo CNE1 quando tratadas com cisplatina, acompanhada de alterações morfológicas como aumento de volume celular, aparição de formas celulares vacuolizadas e multinucleares, além da presença de fenótipos senescentes. O tratamento com doses de 0,5 µg/mL apontou uma indução de células positivas para SA-β-Gal em 40 a 96% da população enquanto que doses mais altas de 1 e 2 µg/mL demonstraram indução de 30 a 70% da população. Este estudo também verificou que as células positivas para senescência diminuíram após 96h de tratamento, havendo recuperação da proliferação celular, sugerindo que a resposta senescente em uma dose subletal de cisplatina pode ser reversível. Estudo realizado por Li et.al em 2014 afirma que a proteína regulada por glicose de 78 kDa (GRP78) funciona como bloqueador na indução de senescência por cisplatina através da expressão de genes da via de sinalização de ataxia telangiectasia mutada (ATM) e efluxo de cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma em linhagens de células de câncer de ovário (A2780 e C13K). As células A2780, cuja expressão de GRP78 é baixa, demonstraram-se sensíveis à indução de senescência por cisplatina; já a linhagem C13K demonstrou-se resistente à cisplatina e tem níveis elevados de expressão de GRP78. A indução de apoptose celular por cisplatina geralmente é proeminente nas doses mais altas de drogas utilizadas na clínica, porém as doses mais baixas parecem ter um efeito citostático, fazendo com que as células adquiram fenótipos senescentes. Além disso, a cisplatina parece

influenciar nas vias de sinalização de resposta a estresse, aumentando a expressão de p53 e p21 em hepatomas (Qu et al. 2013).

1.2.2) Ácido retinoico

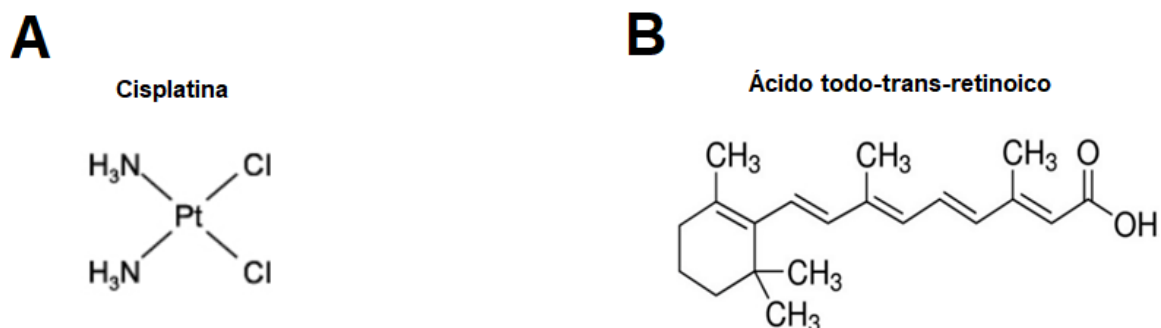
O ácido todo-trans-retinoico (AR) é o principal metabólito bioativo do retinol (vitamina A) e tem diversos efeitos pleiotrópicos no crescimento e diferenciação celular que são relevantes para o desenvolvimento embrionário e fisiologia adulta (Fig. 2B) (Noy 2010). Os efeitos do AR estão associados à reprogramação genética, mediada por receptores nucleares chamados de receptores retinoides. Os receptores de ácido retinóico (RAR α , β e γ) e os receptores X de retinoides (RXR α , β e γ) formam heterodímeros que são ativados por AR e regulam diretamente a transcrição gênica interagindo com os elementos responsivos ao ácido retinoico (do inglês *retinoic acid responsive elements* - RAREs) no DNA (Samarut e Rochette-Egly 2012). O AR é vastamente relatado na literatura como um indutor de morte celular programada tendo como alvo os ligantes e seus receptores que ativam a apoptose. Por exemplo, a ativação de RAR induz a expressão do fator regulatório de interferon 1 (IRF-1) que regula o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) permitindo o avanço do processo de apoptose até de forma parácrina, em tecido adjacente, já que TRAIL é secretado no ambiente extracelular (Clarcke 2004). Em câncer de pulmão e em células leucêmicas, o ácido retinoico demonstrou induzir a expressão de receptores para o ligante de morte TNF α , facilitando a morte celular induzida por TNF α . Além disso, outros trabalhos relacionam o RA como mediador da fosforilação de quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) promovendo a apoptose em diversas linhagens tumorais (Persaud et al. 2016).

Apesar do sucesso em alguns ensaios clínicos para prevenir câncer de pele, mama, cervical e de fígado, o ácido retinoico tem seu uso limitado por conta de seus efeitos colaterais tóxicos. A síndrome do ácido retinoico, por exemplo, é uma complicação grave causada pela resposta ao tratamento com ácido retinoico e ocorre em cerca de 30% dos pacientes de leucemia mieloide aguda (LMA), suas características consistem em febre, insuficiência respiratória e infiltrado pulmonar (McCulloch, Brown e Iland 2017). Além disso, em algumas linhagens normais e outras

tumorais, o AR promove a sobrevivência ao invés de promover a morte celular. Foi relatado que o AR suprime a apoptose induzida por radiação UV-B em queratinócitos e células endoteliais capilares, dispõe de atividade anti-apoptótica em células progenitoras da retina, e protege células epiteliais de câncer de pulmão (revisado por Noy 2010). Apesar de seu vasto uso na clínica, a eficácia do ácido retinoico diminui conforme a resistência ao ácido retinoico aumenta. Esta resistência é atribuída à ação de RAR e dificulta cada vez mais o potencial terapêutico dos compostos retinoides (Tang e Gudas 2011).

Em nosso grupo de laboratório, trabalhos realizados em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano demonstraram que o tratamento de AR eleva níveis de expressão gênica das vias do fator nuclear kappa B (NF-κB), e das vias glicolíticas e antioxidantes durante a diferenciação neuronal (de Bittencourt Pasquali et al. 2016). Além disso a neurodiferenciação causada pelo RA mostrou ser regulada pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e por estresse oxidativo (Kunzler et al. 2016). Mais recentemente, de Miranda Ramos et al., em 2019, demonstrou que o pré-tratamento com ácido retinoico diminuiu a expressão de genes da via do NRF2 e aumentou a apoptose induzida por cisplatina. Portanto, na tentativa de circunvir problemas relacionados a resistência e recorrência tumoral, a combinação de cisplatina e ácido retinoico têm sido alvo de constantes ensaios clínicos e cada vez mais se faz necessário o aprofundamento dos mecanismos relacionados e novos conceitos buscando melhores rumos para o tratamento de pacientes com câncer.

Figura 2: Estruturas das drogas cisplatina e ácido retinoico, respectivamente A e B.



1.3 Modelo de estudo

A linhagem de adenocarcinoma pulmonar humano A549 é uma linhagem tipo-epitélio iniciada por Giard em 1972 através de biópsia derivada de um tecido de paciente caucasiano de 58 anos. São células aderentes de alta proliferação (uma divisão a cada 22 horas) e fácil manipulação. As células ocasionalmente apresentam corpos de inclusão citoplasmáticos multilamelares, apesar de não carregarem nenhum tipo de patógeno humano. Acredita-se que esses corpúsculos de inclusão tenham relação com a síntese de surfactantes pulmonares e são do mesmo tipo dos encontrados em pneumócitos tipo 2 (Giard et al. 1973) (Lieber et al. 1976).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que a quimioterapia citotóxica ainda é um dos principais recursos para o tratamento de pacientes com câncer, e que novos conceitos entorno das terapias combinadas de cisplatina e ácido retinoico têm surgido, torna-se necessário o entendimento dos efeitos dessas combinações e a relação destas com os processos celulares de adaptação ao estresse, tendo em vista principalmente a senescência celular, cuja relação complexa com o câncer determina diretamente a eficiência da resposta dos agentes quimioterápicos em tratamentos de câncer.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos do co-tratamento de cisplatina e ácido retinoico em uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar chamada A549, investigando a relação entre processos celulares chave como apoptose, autofagia e senescência celular.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do co-tratamento sobre uma possível senescência induzida por cisplatina em diferentes doses;
- Investigar se existe relação entre o processo de senescência celular e os processos celulares de apoptose e autofagia;
- Investigar a integridade e potencial mitocondrial de células tratadas utilizando ensaios químicos fluorescentes como indicadores de viabilidade metabólica celular;
- Ajudar na avaliação de novas abordagens para tratamentos de câncer.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

O conteúdo do trabalho será apresentado na forma de artigo científico. Normas foram retiradas do site da revista *Cell Research* (<https://www.nature.com/cr/authors-and-referees/authors/>)

Cisplatin-induced senescence avoidance driven by retinoic acid treatment in A549 human lung adenocarcinoma cell line

Diego Augusto Domingues^{1,2}, Amanda de Fraga Dias², Giovanni Andrade², Fabrício Figueiró², Daniel Pens Gelain^{1,2}, José Cláudio Fonseca Moreira^{1,2}.

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Conflict of interest statement: none

Corresponding author: José Cláudio de Fonseca Moreira, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Mail adress: Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, Brazil. Phone: + 55 51 3308 5577

ABSTRACT

Many traditional cancer therapies relying on cytotoxic treatments are limited due to side effects including development of resistance to treatment and cancer recurrence. Drug combination therapy involving cisplatin and retinoic acid (RA) has been intensively studied in lung oncology, however, results concerning its beneficial effect are contrasting. In addition, cisplatin has been reported to induce cellular senescence in many tumoral cell lines, while retinoic acid promotes cellular differentiation and activates pathways to stress resistance. In this work, we aimed to evaluate the cisplatin and retinoic acid combination in a A549 adenocarcinoma cell line focusing on the role of senescence and its related cellular processes, like apoptosis and autophagy. To this purpose, we investigated cisplatin-induced senescence, presence of autophagic process, induction of apoptosis and mitochondrial membrane potential. Retinoic acid demonstrated to perform a senescence evasion mechanism, while cisplatin induced senescence in a dose and time-dependent manner. RA also increased cellular overall viability and enhanced mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). Taken together, these results suggest that RA presence in cisplatin treatment promotes cell survivability and tumorigenesis, and cisplatin alone treatment in clinic should be reevaluated as senescent tumoral cells can remain metabolically active and also contribute to cancer recurrence and malignancy. Thereby, we propose that senolytics, a group of molecules that selectively kills senescent cells, would be a good alternative to adopt as a second-line treatment to circumvent subpopulation recovery and consequently minimize disease recurrence.

INTRODUCTION

Tumour microenvironment is at focus in current cancer therapy research. Traditional cytotoxic approaches aim for complete cellular destruction to optimize patient outcome, however, it has many limitations including tumour resistance and recurrence, and side effects, such as non-tumour toxicity [1,2]. In pursuit to optimize response to treatment, new drug combinations arose, such as combination of cisplatin and all-trans-retinoic acid in lung cancer. Cisplatin, a widely used chemotherapeutic drug, binds to DNA forming intra and interstrand cross-links between purine bases and induces DNA damage, which consequently trigger signalling leading to apoptosis [3]. All-trans retinoic acid, an active metabolite of vitamin A, reportedly promotes cell growth, cell differentiation, and has pro-apoptotic and anti-oxidant effects, thus it is being used as anti-tumour approaches for various tumoral diseases [4]. Molecular mechanisms from this combination are far from fully understood. While retinoic acid seems to potentialize cisplatin apoptotic effects in liver [5], pancreatic [6], and skin cancer cells [7] it has contrasting effects in retinal cells [8] and breast cancer cells [9] showing itself as an anti-apoptotic agent.

Furthermore, cisplatin seems to induce cellular senescence in liver [10], nasopharyngeal [11], ovarian [12] and lung cancer cells [13]. Senescence is a cellular program that induces a stable growth arrest, which is maintained by activation of p16^{INK4a}/Rb and p53/p21^{CIP1} tumour suppressor pathways; followed by phenotypic alterations, including chromatin remodelling, metabolic reprogramming, and the implementation of a complex pro-inflammatory secretome [14,15]. Acutely senescent cells coming from

chemotherapy show tumour suppressing properties in one way, including cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype (SASP) production, which promotes immunosurveillance [16,17]. However, prolonged presence of senescent cells seems to modulate the development of secondary tumours by those same paracrine signals, promoting cancer relapse, and increasing tumour aggressiveness and metastases [18,19].

Previous reports from our laboratory group showed that cisplatin and retinoic acid combined treatment potentializes cell death through apoptosis in certain conditions [20]. However, new findings about senescence program in tumour biology are needed with respect to new suggestions for cancer therapy establishing genetic and pharmacological methods to prevent senescence or to selectively kill senescent cells in tumours. In this study, we aimed to evaluate the effects of cisplatin and retinoic acid combination treatment in A549 human lung carcinoma cell line, investigating the role of senescence among apoptosis and autophagy, and studying the relation of mitochondrial overall health to these cellular processes.

MATERIAL AND METHODS

Material and agents

All-trans retinoic acid (RA), cisplatin, propidium iodide, acridine orange, and RPMI-1640 medium were purchased from Sigma-Aldrich®. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining kit was purchased from Cell Signaling™. MitoStatus TMRE was bought from BD Pharmingen™. MitoTracker™, annexin V-FITC stain kit, and antibiotic-antimycotic 100X were purchased from Thermo Fisher Scientific. Fetal bovine serum was bought from Cripion Biotechnology ltd.

Cell culture conditions and treatments

Human adenocarcinoma cell line A549 was cultured and grown in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1x antibiotic/antimycotic (Gibco™). Cells were cultivated at 37 °C in a humidified chamber containing a 5% CO₂ environment. When a 80-85% confluence was reached, cells were trypsinized and seeded at cultures plates for further experiments. All medium in treatments had FBS concentration down to 1%. Treatment started 24h after seeding. All chemicals were previously diluted in culture medium at higher concentrations before being added to each well reaching final concentrations. Groups that contained retinoic acid had a pre-treatment, consisting of 24h incubation with retinoic acid alone, followed by co-treatment with retinoic acid (20 μ M) and cisplatin with different concentrations (0, 1, and 5 μ g/ml) at different time lengths for 24, 48 and 72 hours.

Cell viability

To explore functional impact of cisplatin and retinoic acid on cell survival, we performed a cell viability assay using propidium iodide (PI) in flow cytometry. A549 were seeded in 12-well plates (1×10^5 cells/well) and groups that contained cisplatin received different concentrations of cisplatin (0, 1, 5, 20, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 24h treatment, cells were harvested and centrifuged for 6 minutes/1200 RPM. After centrifugation, cells were washed 2x with PBS + 2% fetal bovine serum and PI was added in a PBS solution containing 2% fetal bovine serum and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide. Cells were incubated for 15 minutes in the dark and analysed using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer where 50000 events/sample were collected.

Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) assay

A549 cells were seeded in 24-well plates (2×10^4 cells/well) and incubated with the test substances for different time lengths. After treatment, medium was removed, and cells were washed in 1x phosphate buffered saline (PBS), and then fixed with a fixative solution for 10 minutes. Then cells were washed twice with 1x PBS and incubated overnight at 37 °C with fresh SA- β -Gal staining solution (pH 6) containing 1 mg/mL X-gal. After incubation, plates were checked under an optical microscope (Nikon) where images were taken and processed in ImageJ software. Instructions were followed accordingly to Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signalling™).

Cell cycle

Cell cycle flow cytometric analysis was performed with propidium iodide DNA staining. Cells were seeded in 6-well plates (2×10^5 cells/well) and right after treatment times, all supernatant and trypsinized cells were collected and centrifuged for 6 minutes/1200 RPM. After that, cells were washed with 1x PBS and recentrifuged. Cell pellets were resuspended with Cell Cycle buffer containing 3.5 mM trisodium citrate, 0.5 mM Tris, 0.1 % Nonidet, RNase 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and PI 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ achieving a final volume of 260 μL . Finally, after 15-minute incubation, cells were analysed using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer where 50000 events/sample were collected. Cells were assigned and discriminated using FLOWJO software®.

Annexin V-FITC/PI Apoptosis Assay

The Annexin V-FITC/PI Detection Kit (BD Pharmingen™) was used to quantify the percentage number of apoptotic/necrotic cells. Cells were seeded in 6-well plates (2×10^5 cells/well) and after treatments, culture medium and trypsinized cells were collected and centrifuged for 6 minutes/1200 RPM. Cells were washed with 1x PBS and resuspended with 54 μL Annexin V Binding Buffer containing

3 μL of Annexin V-FITC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 3 μL of Propidium Iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finally, after 15-minute incubation, 200 μL of Annexin V Binding Buffer was added to the final volume of 260 μL . Cells were analysed using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer, where 20000 events were collected.

Flow cytometric analysis of autophagy positive cells

Acridine orange staining was used to check for positive autophagic cells. Inside cells, acridine orange changes its fluorescence emission from green to red at low pH, assessing presence of autophagosomes acidification. Cells were seeded in 6-well plates (2 x 10⁵ cells/well) and after treatments, all supernatant and trypsinized cells were collected and centrifuged for 6 minutes/1200 RPM. Cells were washed with 1X PBS and recentrifuged. Cell pellets were resuspended with Acridine Orange Staining Buffer containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ acridine orange in PBS. Lastly, after 15-minute incubation, cells were analysed using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer where 50000 events/sample were collected.

TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) assay by flow cytometry

MitoStatus TMRE (BD Pharmigen™) was used to assess for mitochondrial depolarization and overall mitochondria health. Non-apoptotic or cells with polarized mitochondria will fluoresce red while apoptotic or cells with depolarized mitochondria will have diminished levels of red fluorescence. Cells were seeded in 6-well plates (2 x 10⁵ cells/well). Briefly, all supernatant was discarded after treatment and adherent cells were incubated with 50 nM MitoStatus TMRE solution in fresh grown medium. After 30-minute incubation, trypsinized cells were collected and centrifuged for 6 minutes/1200 RPM. Cells were washed with 1x PBS and resuspended in 200 μL PBS buffer. FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone), a mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler was used as a positive control. Cells were analysed using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer where 40000 events/sample were collected.

Mitochondrial membrane status

To assess mitochondrial membrane status, a mitochondrial probe was used. MitoTracker™ Deep Red (Invitrogen™) is a red fluorescent dye that stains mitochondria in live cells and are retained in fixed mitochondria, which accumulation is membrane potential dependant. After treatments, culture medium was removed and a prewarmed staining solution containing 100 nM MitoTracker probe was added. After 30-minute staining, cells were washed with 1x PBS. Cells were fixated with 4% paraformaldehyde for 10 minutes, and afterwards permeabilized with 0,25% Triton X in PBS for 10 minutes. After twice PBS washing, a 300nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was added. Light-protected incubation occurred for 5 minutes. Staining DAPI solution was removed and finally cells were observed. Images were taken using Microscopy EVOS® FL Auto system.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation and analysed using GraphPad Prism software version 7. One-way or Two-way ANOVA analysis followed by Tukey test were used to check for significance difference between groups, where a $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. All experiments were performed at least three individual times.

RESULTS

Cell viability

We aimed to evaluate A549 cell response to drug combination therapy. For that purpose, we used propidium iodide (PI), a membrane impermeant dye, that is generally excluded from viable cells. Our result demonstrate that cisplatin reduces cell viability in a dose-dependent manner as expected (Fig.1). After 24h treatment, the cisplatin-only group with the highest cisplatin concentration used (100 $\mu\text{g/mL}$) had a $49,3\% \pm 2,5$ cell viability in contrast to RA (20 μM) + cisplatin (100 $\mu\text{g/mL}$) group where the cell viability rendered to $76\% \pm 6,8$. As seen in literature, lower doses of cisplatin are linked to induction of senescent-like phenotypes, while higher doses are linked to cell death through apoptosis. With this result we could go forward on choosing the lowest values for cisplatin concentrations (0, 1 and 5 $\mu\text{g/mL}$).

Cisplatin induced senescent phenotype in A549 cells

SA- β -Gal staining, mostly used biomarker for senescent and aging cells, was used to detect positive senescent phenotype after treatment with retinoic acid (20 μM) and cisplatin at different concentrations (0, 1, and 5 $\mu\text{g/ml}$) at different time lengths for 24, 48 and 72 hours. The staining was observed in the cytoplasm of these cells in a time and dose-dependent manner, where the staining was the highest in 5 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin alone group at 72h time period (Fig.2). We also noticed that non-treated control group had some level of SA- β -Gal-positive cells after 48h, however, it was reduced after 72h, most probably due to the increased number of proliferating cells. In addition, we observed that groups which had retinoic acid had very low percentage of stained cells probably as a result of an evading mechanism.

Cell cycle shifts

To validate a possible cisplatin-induced senescent growth arrest, a flow cytometric analysis was performed after treatment exposures of 24, 48 and 72 hours. In cells treated with higher dose of cisplatin (5 $\mu\text{g/ml}$) a consistent shift to both S and G2/M cell cycle state was seen at 48 and 72 hours (Fig.3).

Treatment effect on apoptosis

To investigate the treatment effect on apoptosis, A549 cells were double-stained with Annexin V-FITC and PI, prior to detection using flow cytometry. We have observed that after 72h exposure time groups that contained retinoic acid had lower values of apoptotic rates when compared to cisplatin only groups (Fig.4). In addition, we noticed that retinoic acid alone had a higher value of cell viability even when compared to non-treated control, which corroborates with earlier cell viability results.

Treatment effect on autophagy

We desired to study whether autophagy process would be active performing a stress adaptation on retinoic acid groups which had their viability raised. For that purpose, we used acridine orange (AO), a lysotropic dye that accumulates in acidic organelles in a pH-dependent manner to identify acidic vesicular organelles. Firstly, we had six replicates from this experiment, however, we had some issues concerning this methodology, some replicates had to be put aside. Even with four replicates, our results showed high deviation values. Nevertheless, we observed some features like the retinoic acid alone group having a really low percentage of AO-positive cells at 72 hours after treatment (Fig. 5). This is remarkable since this group had the highest percentage of viable cells on the annexin V-FITC/PI experiment, meaning that retinoic acid might be triggering a stress adaptation not related to autophagy.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

To gain insight into how combination treatment affects the ability of mitochondrial function and to cross-link our previous results, we detected mitochondrial depolarization by using TMRE, a known marker of apoptosis, autophagy, and senescence using flow cytometry. Comparing basal levels of mitochondrial membrane potential given in medium fluorescence intensity (MFI) of TMRE no significant difference was observed between groups in the first 24 hours (Fig. 6). However, we have noticed $\Delta\psi_m$ changes starting at 48h after treatment where groups that contained retinoic acid had their membrane potential increased when compared to other groups. The highest medium fluorescence intensity (MFI) observed was from RA (20 μ M) + Cisplatin (5 μ g/mL) group at 72h where $\Delta\psi_m$ changes were even more clear. We also used a mitochondrial probe to track mitochondrial abnormalities with live imaging which also corroborated with these results (Fig.7).

DISCUSSION

Over the last decades, drug combination therapy has been widely studied in cancer research and other complex disease areas. In some cases, drug combination of cisplatin and retinoic acid seem to improve treatment response, minimizing the development of resistance and diminishing adverse

events. However, the same treatment generates contrasting effects in other cases [21]. It is known that senescence, apoptosis and autophagy play roles in the capacity of damaged cells to adapt to a stress condition either maintaining viability activating repairing machineries or engaging in programmed-cell-death pathways [22]. In this context, the combination of all-trans retinoic acid is being used as an intensifier of cisplatin effects in lung cancer, although, because of bioavailability issues, low doses of these drugs could cause adverse effects in clinic allowing the existence of specific cellular subpopulations within primary tumours with increased tumorigenic potential and chemotherapy resistance [23].

In this study, we tested the combination therapy of cisplatin and retinoic acid in low doses compared to clinic, in a gradual concentration of 0, 1 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cisplatin and a fixed concentration of 20 μM of all-trans retinoic acid. We found significant differences in cell viability when comparing groups that had both drugs and groups that contained cisplatin alone. We also observed that retinoic acid alone group had its viability increased even when compared to non-treated control. In addition, there are two patterns that we could notice. We found that at higher doses of cisplatin, the cellular damage may be too great for the cells to respond in an active way, resulting in decreased cell viability with longer exposure times; and at lower doses, other stress related processes might be occurring, that contributes to cellular preservation. Cells that were treated with retinoic acid can enhance cell viability until a certain limit, which is surpassed by cisplatin damage in higher concentrations of the drug as seen in our annexin V-FITC/PI experiment. We could also observe morphological phenotypes related to differentiation (data not shown) in groups that contained retinoic acid. Differentiation driven by retinoic acid has been previously reported to increase resistance to cytotoxic stress in SK-N-BE and SH-SY-5Y neuroblastoma cell lines [24].

The SA- β -Gal assay unveiled that cisplatin induces cellular senescence in a time and dose-dependent manner, while groups that had retinoic acid were able to evade from this process. As seen in immortal human uroepithelial cells and bladder cancer cell lines, it has been suggested that evasion from senescence pathways play a role in tumorigenesis [25]. Thus, senescence overcome plays role in cancer pathogenesis and requires chances that might include either p16 or pRb-loss and additional genetic alterations associated to immortalization, including +20q and -3p chromosomal imbalances [26]. Our cell cycle result showed that as accordingly to literature, cisplatin-induced changes in cell cycle distribution indicate a difference between senescent-like growth arrest and aging-related senescence. Senescence in aging arrests cell cycle in either G1 or G2/M and no mitogenic stimulation is able to sustain cell cycle progression [27], however, cisplatin-induced senescence growth arrest showed both S and G2/M accumulation. We could observe, in some replicates, the presence of cells which had super G2 accumulation and also many doublets, that can be related to multinucleated cells as seen in our experiment using DAPI and MitoTracker probes. Cellular multinucleation is characterized as a strong senescent phenotype. Leikam et al., in 2015, showed for the first-time *in vitro* evidence for senescent melanocytes multinucleated cells as source for tumour-initiating cells where the long-term oncogene NRAS^{G1k} activation overcomes oncogenic-induced senescence by triggering the emergence of tumour-initiating mononucleated stem-like cells from senescent cells [28]. These findings change the

perspective that senescence process causes an irreversible cell cycle arrest. Indeed, Saleh et al., in 2019, showed that tumour cells from various lines were able to recover proliferative capacity after senescence induction by doxorubicin and etoposide. His work also suggested that tumour senescent cells can remain viable and dormant after long periods of time and eventually contribute to cancer recurrence.

We thought that autophagy was the process that could be occurring to groups that had retinoic acid affecting senescence evasion. The relationship between autophagy and senescence is complex. As demonstrated by Dou et al., in 2015, autophagy inhibition seems to delay HRAS^{G12V}-induced senescence. Autophagy protein LC3/Atg8, which is related to autophagy membrane trafficking and substrate delivery, is present in the nucleus and interacts with nuclear lamina protein lamin B1, and binds to lamin-associated domains on chromatin. The lamin B1 degradation is achieved by nucleus-to-cytoplasm transport that delivers lamin B1 to the lysosome. When the interaction between LC3 and lamin B1 or autophagy is inhibited, lamin B1 loss is diminished and oncogene-induced senescence is attenuated. In this way autophagy acts as a guarding mechanism protecting cells from tumorigenesis [29,30]. On the other, paradoxically, autophagy inhibition promotes cellular senescence in normal proliferating cells and in HRAS^{G12V}-induced senescence cells as well [31,32]. We have evaluated the induction of autophagy in A549 cells and our results do not show a clear pattern. At 72h, RA alone had a very low acridine orange positive cells when compared to other treatments. However, we could not see a significant difference of autophagy-positive cells when comparing non-treated control and cisplatin-treated groups at this stage. We suggest that other method should be used to evaluate autophagic cells in this experiment design, such as LC3-accumulation and p62 expression.

Our evaluation over mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) revealed that retinoic acid is enhancing mitochondrial membrane potential in A549 cells. Tetramethyl rhodamine ethyl ester (TMRE) is a fluorescent dye that is sequestered by active, healthy mitochondria. Our results show that groups that contained retinoic acid had their mitochondria potential membrane more polarized, fluorescing redder than cisplatin alone groups and control group. The intensity of TMRE fluorescence was elevated by retinoic acid and cisplatin in a dose-dependent manner. Therefore, we suggest that retinoic acid plays a role in mitochondrial fitness increasing overall membrane potential status and health, and probably increasing mitochondrial number. Mitochondria are the site of aerobic respiration and a major source of reactive oxygen species (ROS) and play key role in the stress response. Mitochondrial dysfunction causes the necessity of cancer cells to rely on glycolysis as the only alternative for ATP production —this metabolic reprogramming is a recognized hallmark of cancer [33,34]. The influence of ROS within malignant cells aren't still clear. Like a double-edged sword, mitochondrial ROS perturbations in cancer therapy may be beneficial or detrimental [35]. Increased ROS generation alters mitochondrial membrane potential and induces damages in the respiratory chain triggering to apoptosis. This was confirmed in a study performed by Marullo et al., in 2013, where intracellular and mitochondrial ROS levels were measured in A549 cells exposed to cisplatin. This mitochondrial ROS increase was not related only to apoptosis, as they were able to detect ROS also in non-apoptotic group of cells. Therefore, mitochondria are the source of cisplatin-induced ROS response [36]. It is also known that

retinoic acid impacts mitochondrial performance by raising oxidative phosphorylation and mitochondrial content in some cell lines [37]. Moreover, Xun et al., in 2012, showed that retinoic acid induces a dramatic increase in oxygen consumption rate in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. In addition, retinoic acid did not cause increase the number of mitochondria, but it raised mitochondrial spare respiratory capacity [38].

In our study, we suggest that the presence of retinoic acid is affecting the cisplatin damage response, which plays a role in cell survivability by increasing mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), consequently increasing mitochondrial overall fitness and overall cellular health. Besides, in the past, our group demonstrated that retinoic acid affects the nuclear factor erythroid2(NF-E2)-related factor2(NRF-2) signalling pathway causing changes in cellular redox balance [20,39]. Also, upregulation of Multidrug Resistance-associated Protein1(MRP1) and 2 (MRP2) might interfere in cisplatin uptake. Cisplatin enter the cells by passive diffusion, however, more recently interest has been given to the active uptake of the drug via facilitated diffusion by the copper transporter proteins (CTR1 and CTR2). [40]. Retinoic acid might regulate cisplatin uptake. In this study, we used relatively lower doses compared to clinic, however, if bioavailability issues in clinic occur, the same drug combination can cause a different effect than the one expected. However, more studies are needed to validate these statements and to clarify the complex relation of cisplatin and retinoic acid combination. A promising strategy to circumvent senescence related issues is called senolytic therapy, where the selectively death of senescent cells are achieved. Senolytic therapy would be used as a secondary therapy to the first line DNA-damaging therapies, having potential advantages as the first-line therapies can be used unmodified and would just need to be followed by a senolytic intervention, which would not be expected to suffer from adaptation nor drug resistance. However, results from clinical studies in which senolytics have been administered following senescence-inducing radio- or chemotherapy are still awaited for.

CONCLUSION

For the time being, we suggest that cisplatin and all-trans retinoic acid should be reevaluated for clinical purposes as its use can cause contrasting desirable effects. In one way, cisplatin alone can induce cellular senescence in lower doses, where cells remain metabolically active and secrete the SASP phenotype which contributes to formation of secondary cancers. On the other, retinoic acid presence in cisplatin treatment cause an increase in cell resilience by alternate mechanisms and consequently also lead to tumour resistance and recurrence. As cisplatin continue to be the most used drug as a first-line treatment in lung cancer, we also propose that it would be wise to adopt the use of senolytic agents as a second-line treatment to minimize a possible subpopulation recovery and avoid disease recurrence.

LIMITATIONS OF STUDY

We have performed a study with relatively short periods of time when comparing other studies that relates to cellular senescence. For that purpose, if longer periods of time were analysed, a better understanding of the evading process by retinoic acid could be noticed. Maybe this evasion is temporary and induction of senescence would occur thereafter. Also, it is true that single-cell studies are always desirable since acute characterization of samples with high cellular heterogeneity is not straightforward. Another point is that in MitoStatus TMRE membrane potential assay, as cited by the fabricant, in cells whose mitochondrial number may vary widely, healthy cells with few mitochondria might bind little TMRE dye, and thus may appear falsely depolarized leading to wrong conclusions.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare no conflict of interest

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Brazilian funds CAPES, FAPERGS/CNPq and PPGBCM/UFRGS

REFERENCES

- [1]. Masui, Kenta, et al. "A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments." *Carcinogenesis* 34.4 (2013): 725-738.
- [2]. Sieben, Cynthia J., et al. "Two-step senescence-focused cancer therapies." *Trends in cell biology* 28.9 (2018): 723-737
- [3]. de Almeida, V. L., et al. "Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction." *Química nova* 28.1 (2005): 118-129
- [4]. Siddikuzzaman, C. Guruvayoorappan, and V. M. Berlin Grace. "All trans retinoic acid and cancer." *Immunopharmacology and immunotoxicology* 33.2 (2011): 241-249.
- [5]. Zhang, Yang, et al. "All-trans retinoic acid potentiates the chemotherapeutic effect of cisplatin by inducing differentiation of tumor initiating cells in liver cancer." *Journal of hepatology* 59.6 (2013): 1255-1263.
- [6]. Pettersson, Filippa, Kay W. Colston, and Angus G. Dalgleish. "Retinoic acid enhances the cytotoxic effects of gemcitabine and cisplatin in pancreatic adenocarcinoma cells." *Pancreas* 23.3 (2001): 273-279.
- [7]. Shin, Dong M., et al. "Phase II and biologic study of interferon alfa, retinoic acid, and cisplatin in advanced squamous skin cancer." *Journal of clinical oncology* 20.2 (2002): 364-370.
- [8]. Kholodenko, Roman, et al. "Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism." *Cell research* 17.2 (2007): 151-162
- [9]. Schug, Thaddeus T., et al. "Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors." *Cell* 129.4 (2007): 723-733

- [10]. Qu, Kai, et al. "Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33.9 (2013): 1253-1259.
- [11]. Wang, Xianghong, et al. "Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells." *Cancer Research* 58.22 (1998): 5019-5022.
- [12]. Li, Wei, et al. "Cisplatin-induced senescence in ovarian cancer cells is mediated by GRP78." *Oncology reports* 31.6 (2014): 2525-2534.
- [13]. Fang, Kang, et al. "Cisplatin-Induced Senescence and Growth Inhibition in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells with Ectopic Transfer of p16I NK4a." *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 16.10 (2007): 479-488.
- [14]. Salama, Rafik, et al. "Cellular senescence and its effector programs." *Genes & development* 28.2 (2014): 99-114.
- [15]. McHugh, Domhnall, and Jesús Gil. "Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues." *Journal of Cell Biology* 217.1 (2018): 65-77.
- [16]. Iannello, Alexandre, et al. "p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells." *Journal of Experimental Medicine* 210.10 (2013): 2057-2069.
- [17]. Eggert, Tobias, et al. "Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression." *Cancer cell* 30.4 (2016): 533-547.
- [18]. Jackson, James G., et al. "p53-mediated senescence impairs the apoptotic response to chemotherapy and clinical outcome in breast cancer." *Cancer cell* 21.6 (2012): 793-806.
- [19]. Acosta, Juan Carlos, et al. "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence." *Nature cell biology* 15.8 (2013): 978-990.
- [20]. de Miranda Ramos, Vitor, et al. "Retinoic acid downregulates thiol antioxidant defences and homologous recombination while promotes A549 cells sensitization to cisplatin." *Cellular signalling* 62 (2019): 109356.
- [21]. Wu, Menghua, et al. "Characteristics of drug combination therapy in oncology by analyzing clinical trial data on ClinicalTrials.gov." *Pacific Symposium on Biocomputing Co-Chairs*. 2014.
- [22]. Vicencio, José Miguel, et al. "Senescence, apoptosis or autophagy?." *Gerontology* 54.2 (2008): 92-99.
- [23]. Moro, Massimo, et al. "Combination treatment with all-trans retinoic acid prevents cisplatin-induced enrichment of CD133+ tumor-initiating cells and reveals heterogeneity of cancer stem cell compartment in lung cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 10.7 (2015): 1027-1036.
- [24]. Baj, Gabriele, and Enrico Tongiorgi. "BDNF splice variants from the second promoter cluster support cell survival of differentiated neuroblastoma upon cytotoxic stress." *Journal of cell science* 122.1 (2009): 36-43.
- [25]. Krtolica, Ana, et al. "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.21 (2001): 12072-12077.
- [26]. Reznikoff, C., et al. "Overcoming senescence in human cancer pathogenesis." *FASEB JOURNAL*. Vol. 12. No. 5. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 1998.
- [27]. Campisi, Judith, and Fabrizio D'Adda Di Fagagna. "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nature reviews Molecular cell biology* 8.9 (2007): 729-740.
- [28]. Leikam, C., et al. "In vitro evidence for senescent multinucleated melanocytes as a source for tumor-initiating cells." *Cell death & disease* 6.4 (2015): e1711-e1711.

- [29]. Dou, Zhixun, et al. "Autophagy mediates degradation of nuclear lamina." *Nature* 527.7576 (2015): 105-109.
- [30]. Galluzzi, Lorenzo, José Manuel Bravo-San Pedro, and Guido Kroemer. "Autophagy mediates tumor suppression via cellular senescence." *Trends in cell biology* 26.1 (2016): 1-3.
- [31]. Baisantry, Arpita, et al. "The impact of autophagy on the development of senescence in primary tubular epithelial cells." *Cell Cycle* 15.21 (2016): 2973-2979.
- [32]. Kang, Chanhee, and Stephen J. Elledge. "How autophagy both activates and inhibits cellular senescence." *Autophagy* 12.5 (2016): 898-899.
- [33]. Warburg, Otto. "On the origin of cancer cells." *Science* 123.3191 (1956): 309-314.
- [34]. Pavlova, Natalya N., and Craig B. Thompson. "The emerging hallmarks of cancer metabolism." *Cell metabolism* 23.1 (2016): 27-47.
- [35]. Okon, Imoh S., and Ming-Hui Zou. "Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy." *Pharmacological research* 100 (2015): 170-174.
- [36]. Marullo, Rossella, et al. "Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions." *PloS one* 8.11 (2013).
- [37]. Tourniaire, Franck, et al. "All-trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitochondria biogenesis in adipocytes." *Journal of lipid research* 56.6 (2015): 1100-1109.
- [38]. Xun, Zhiyin, et al. "Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells." *Mechanisms of ageing and development* 133.4 (2012): 176-185.
- [39]. de Miranda Ramos, Vitor, et al. "NRF2 mediates neuroblastoma proliferation and resistance to retinoic acid cytotoxicity in a model of in vitro neuronal differentiation." *Molecular neurobiology* 53.9 (2016): 6124-6135.
- [40]. Ishida, Seiko, et al. "Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.22 (2002): 14298-14302.

FIGURES

Figure 1: Flow cytometric analysis of cell viability using propidium iodide (PI). Figure show the effect of cisplatin alone, retinoic acid alone, and combined drug therapy in A549 cell viability. Data is shown in percentage of viable cells 24h after treatments. Cisplatin doses varied between 0, 1, 5, 20, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$. Groups that contained retinoic acid had a pre-treatment with retinoic acid for 24h (20 μM). Graph is shown by means \pm SEM. Cis: cisplatin, RA: retinoic acid. $n=3$. * $P<0.05$

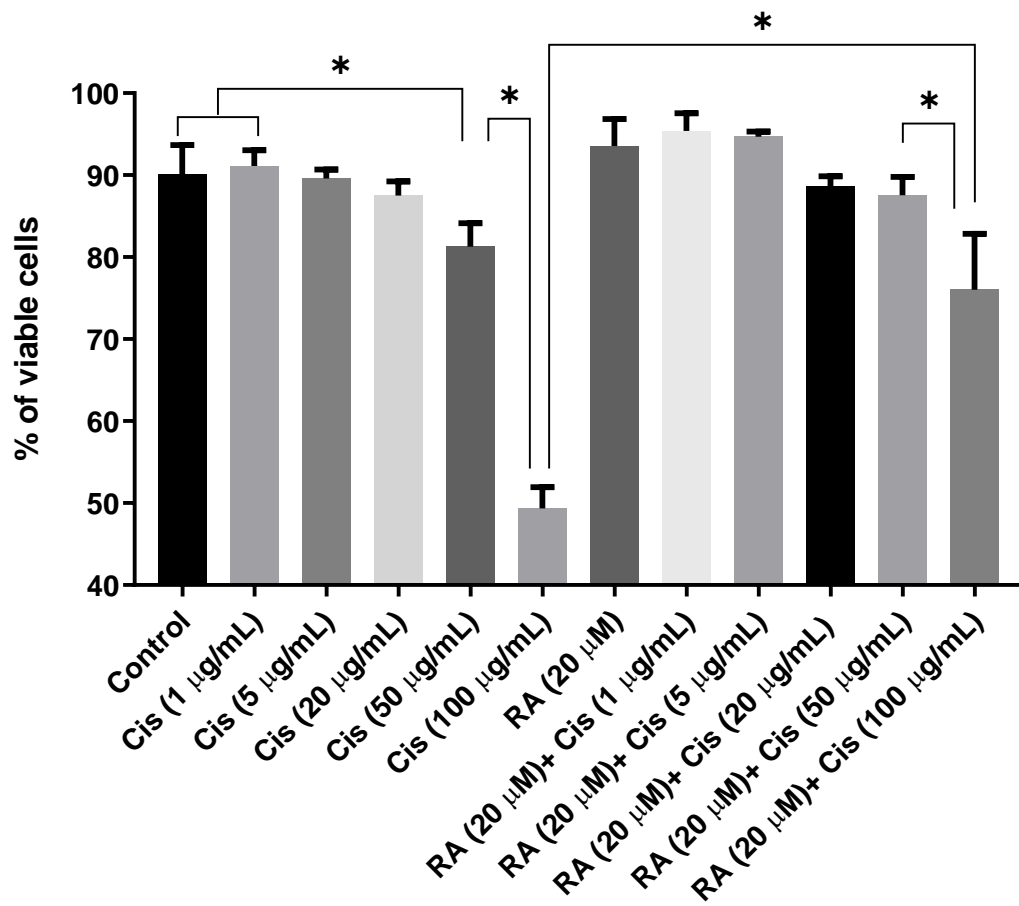
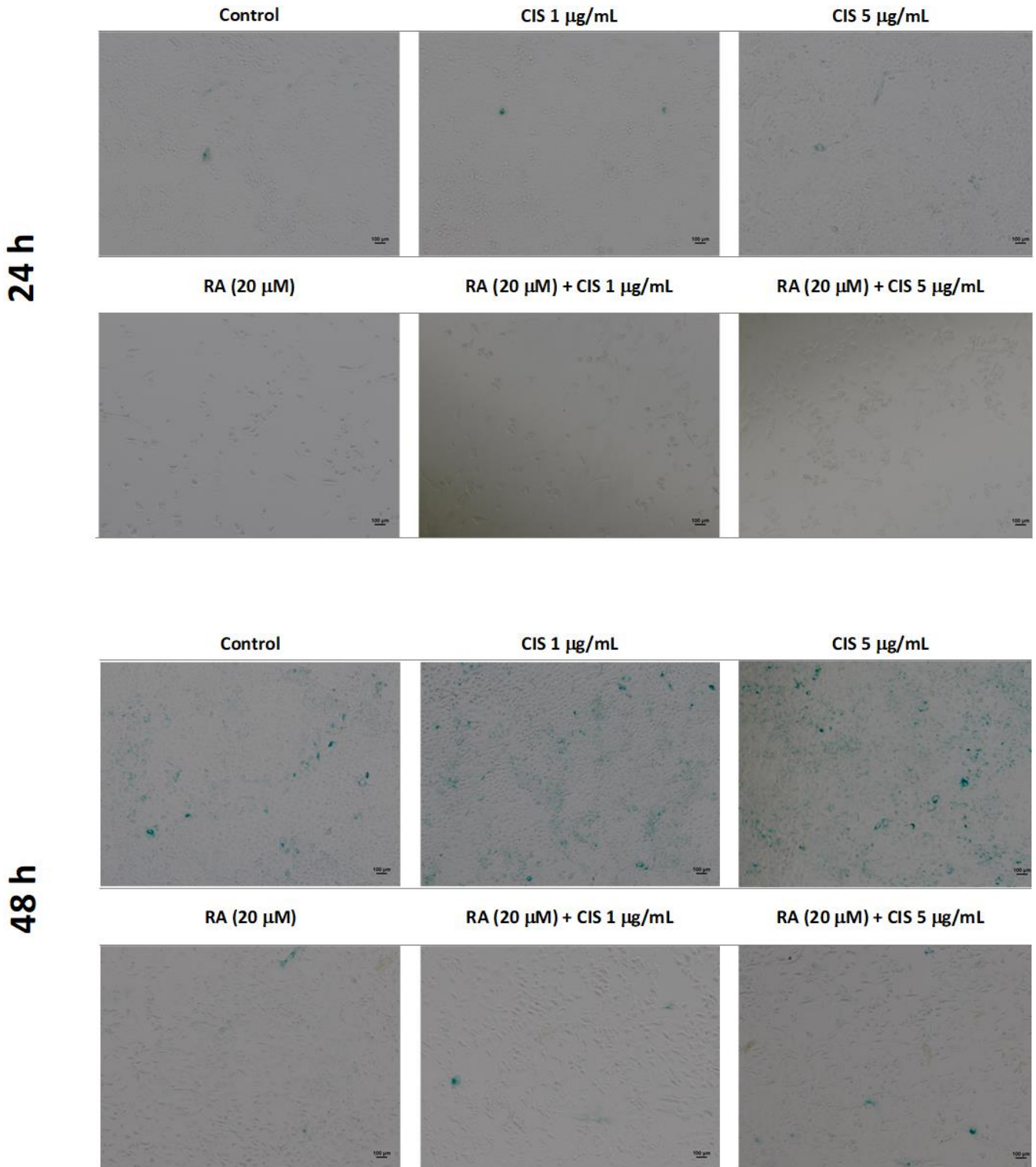
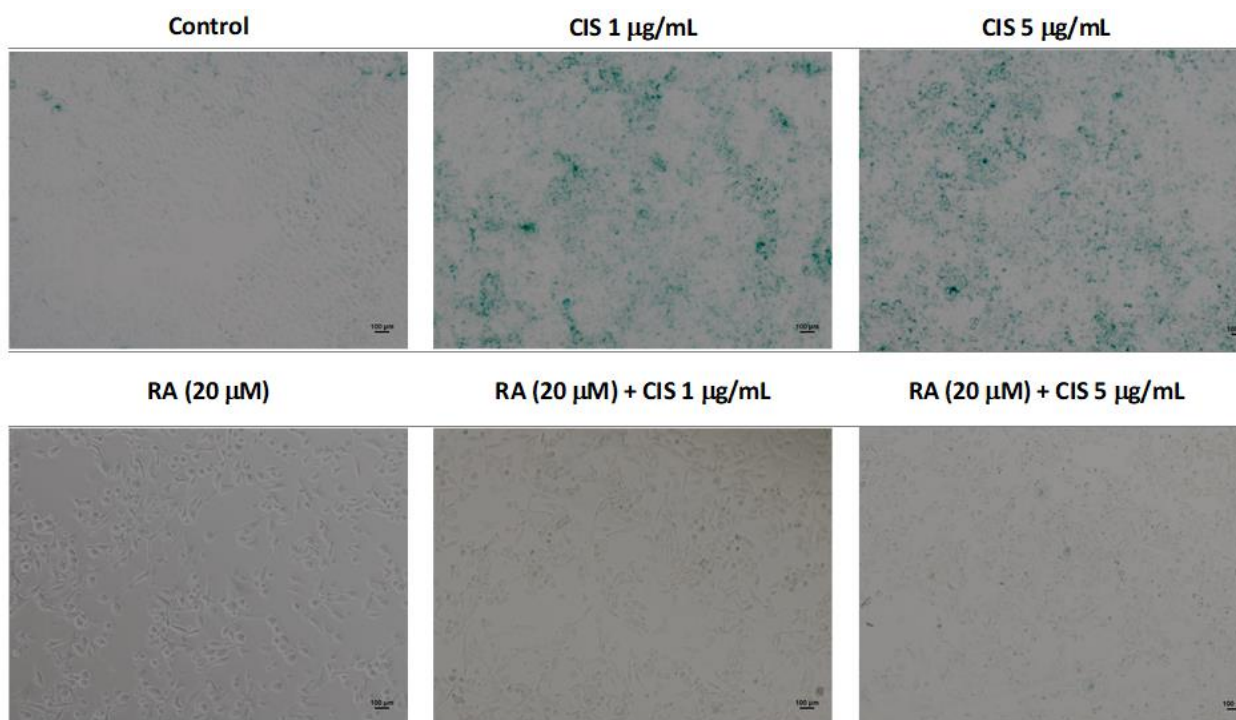


Figure 2: SA- β -Gal staining of group treated cells. **A:** SA- β -Gal staining positive cells at different periods of time (24, 48 and 72h), which exhibit an extended shape. Scale: 100 μ M. **B:** SA- β -Gal staining graph referring to images on A. Cells were counted using the ImageJ software. ***P<0.0005, ****P<0.0001.

A



72 h



B

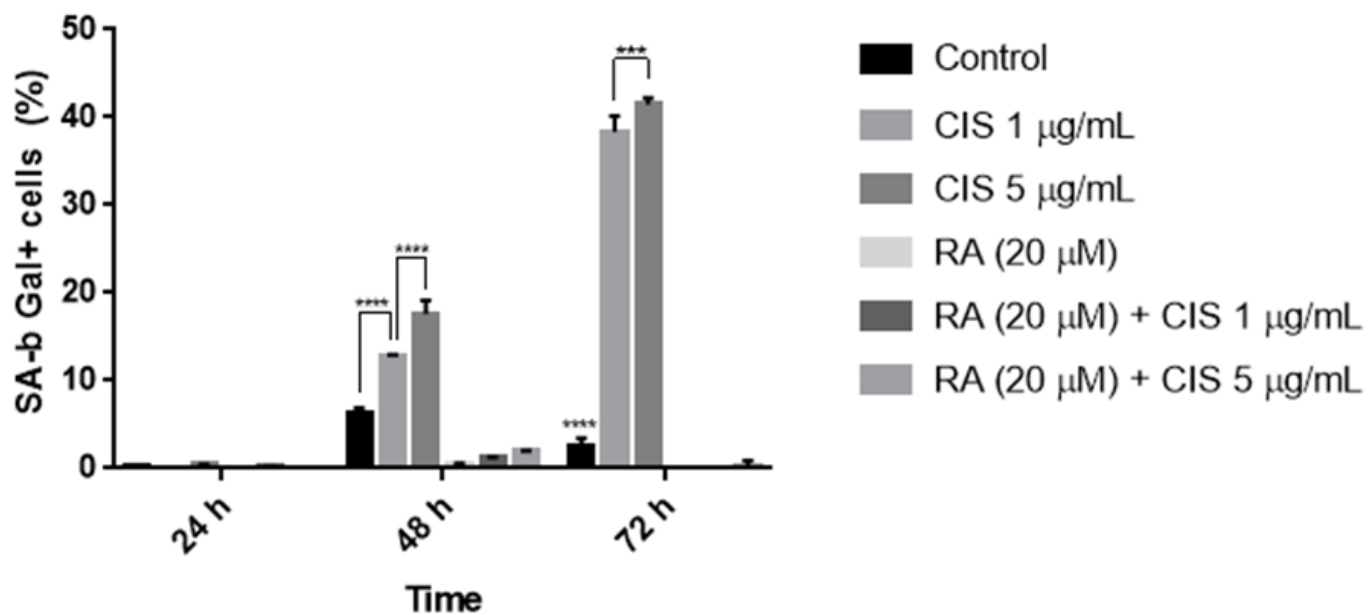
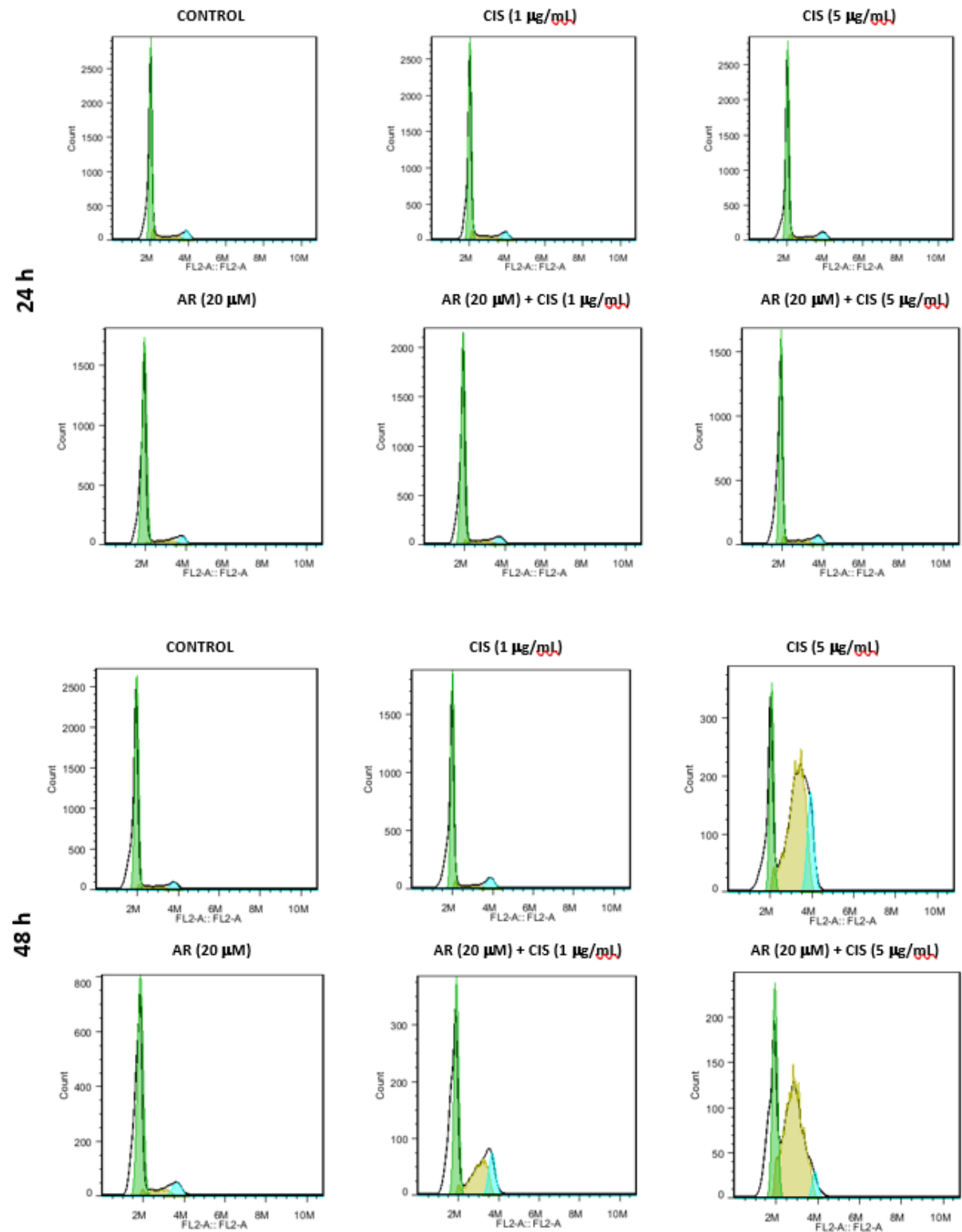
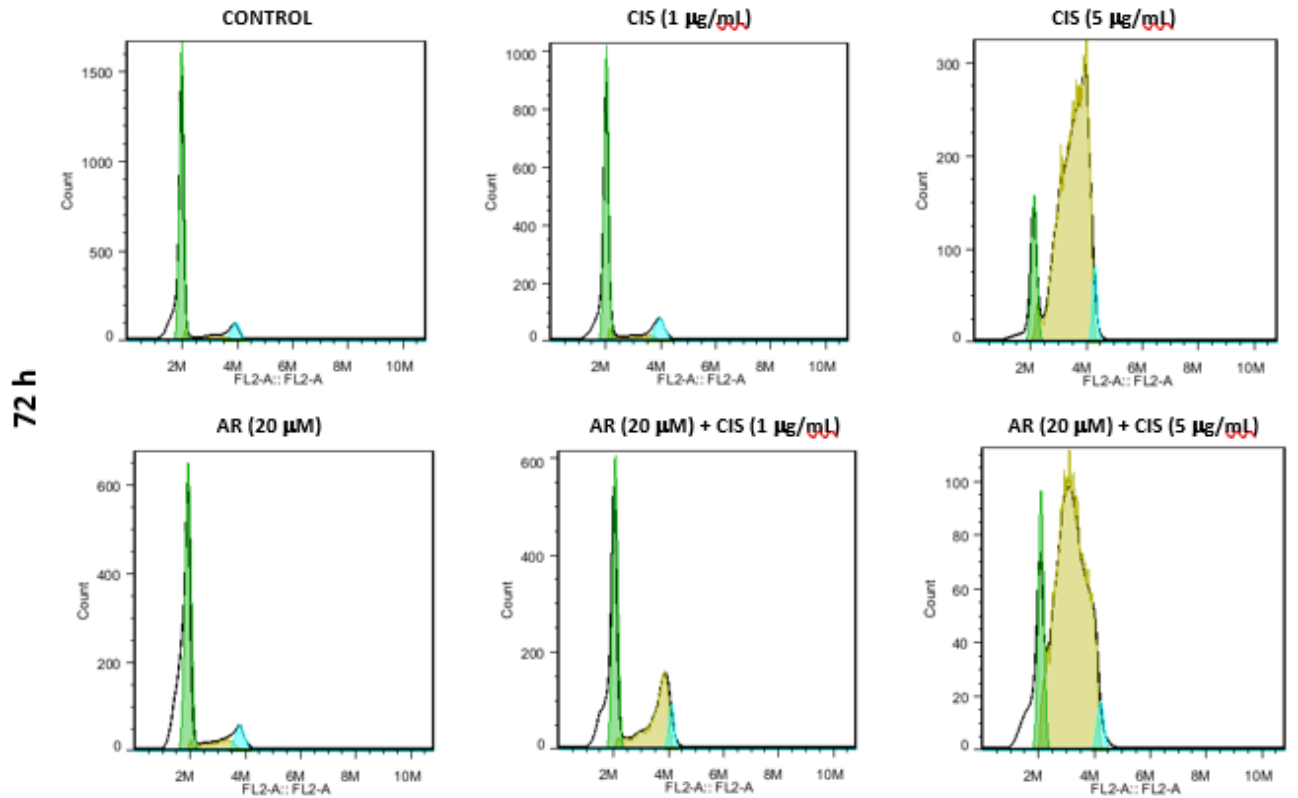


Figure 3: Flow cytometric analysis of cell cycle with propidium iodide DNA staining. **A:** Cell cycle analysis 24, 48 and 72h after treatments. Analysis was performed using FlowJo software. **B:** Quantification of cells accordingly to DNA content. Cis: cisplatin. RA: retinoic acid. n=3.

A





B

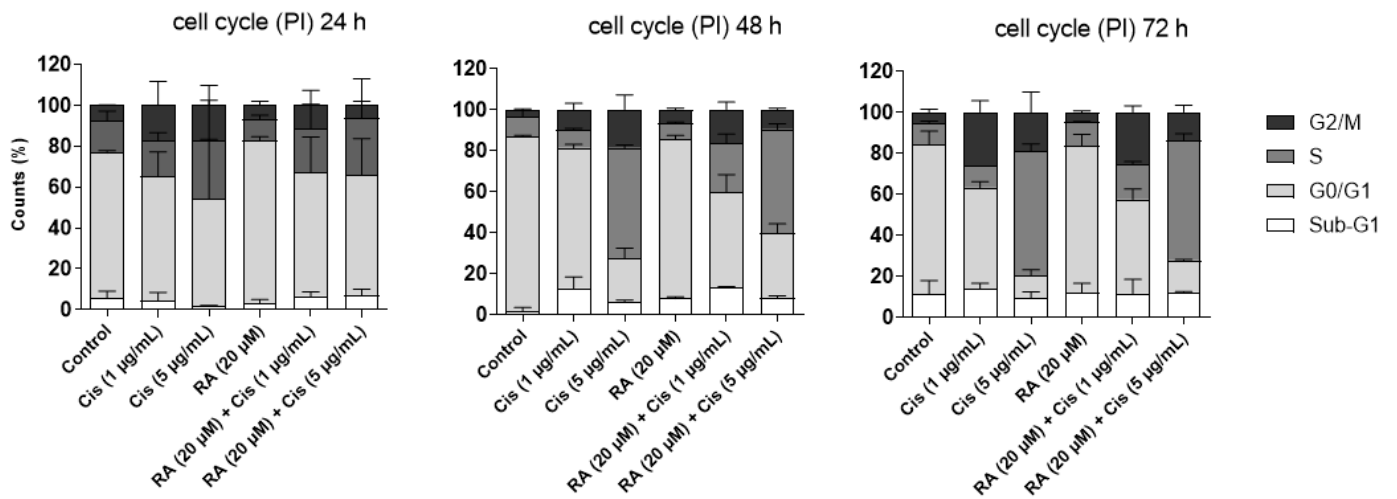
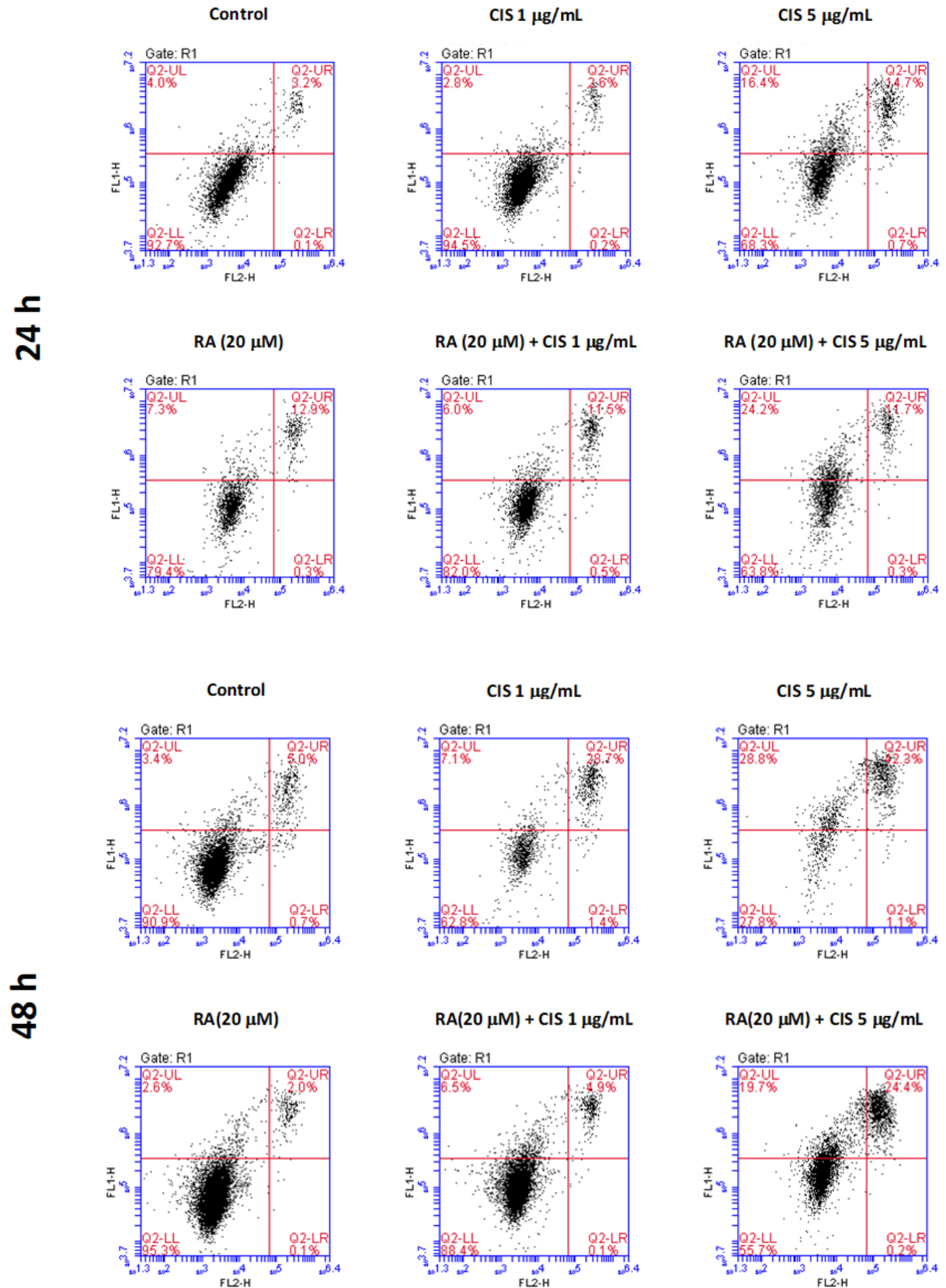
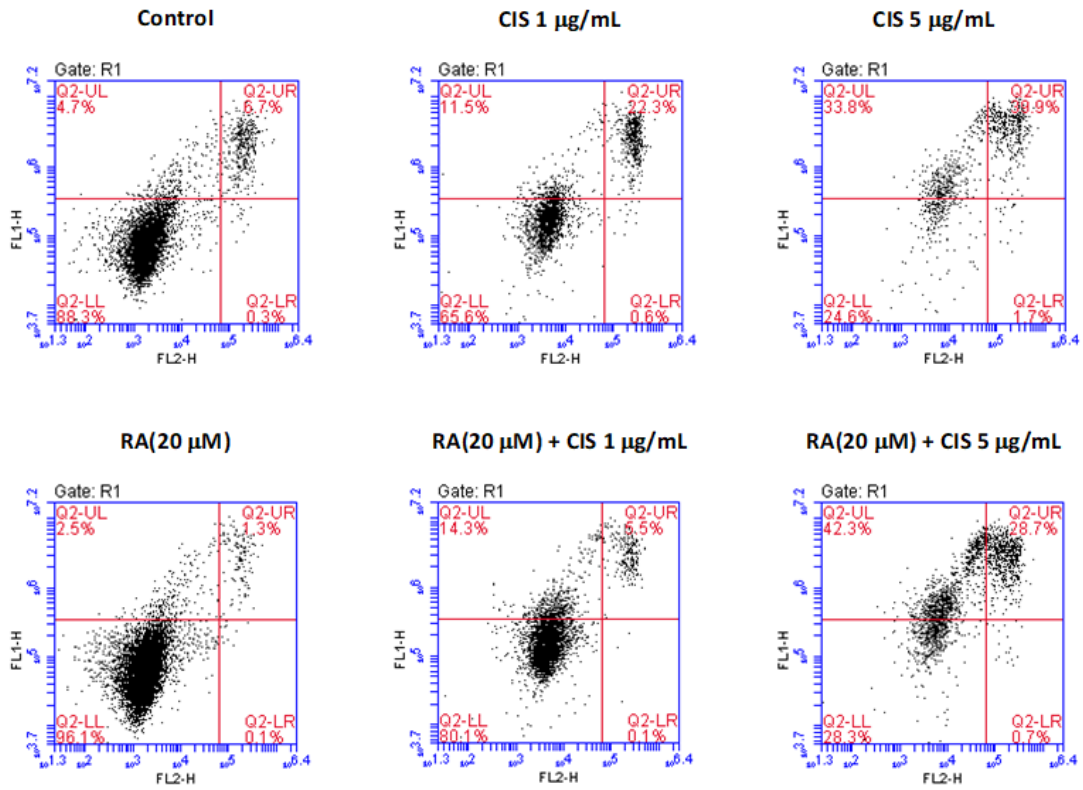


Figure 4: Cisplatin and retinoic acid effects on apoptosis. **A:** Annexin V-FITC/PI apoptosis assay by flow cytometry **B:** Apoptosis rate quantification. LL: lower left, representing viable cells. UL: upper left, representing early apoptotic cells. UR: upper right, representing late apoptotic/necrotic cells. LR: lower right, representing necrotic cells. FL1: green channel. FL2: orange-red channel. Cis: cisplatin. RA: retinoic acid.

A



72 h



B

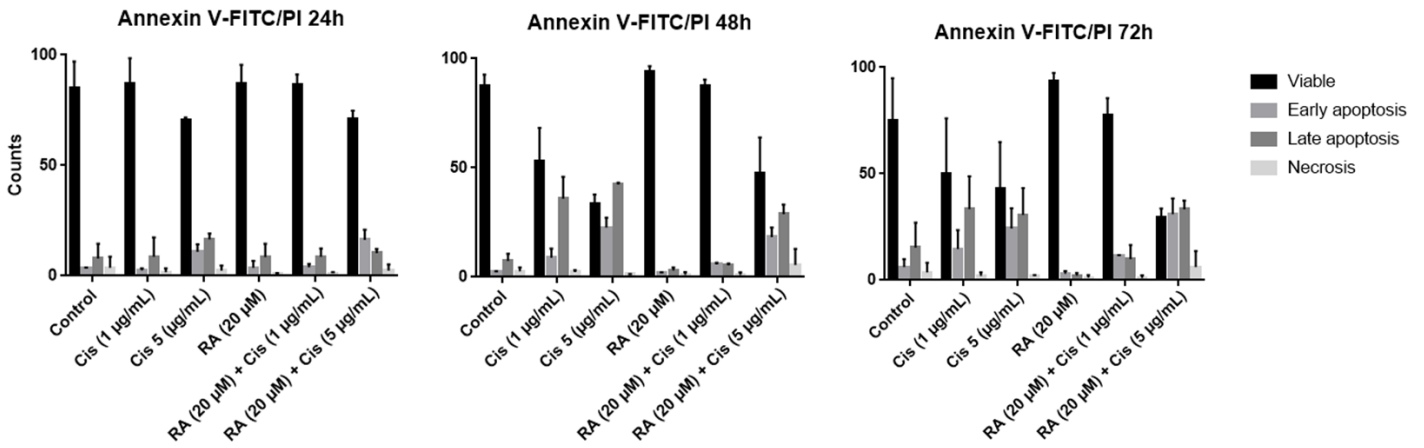
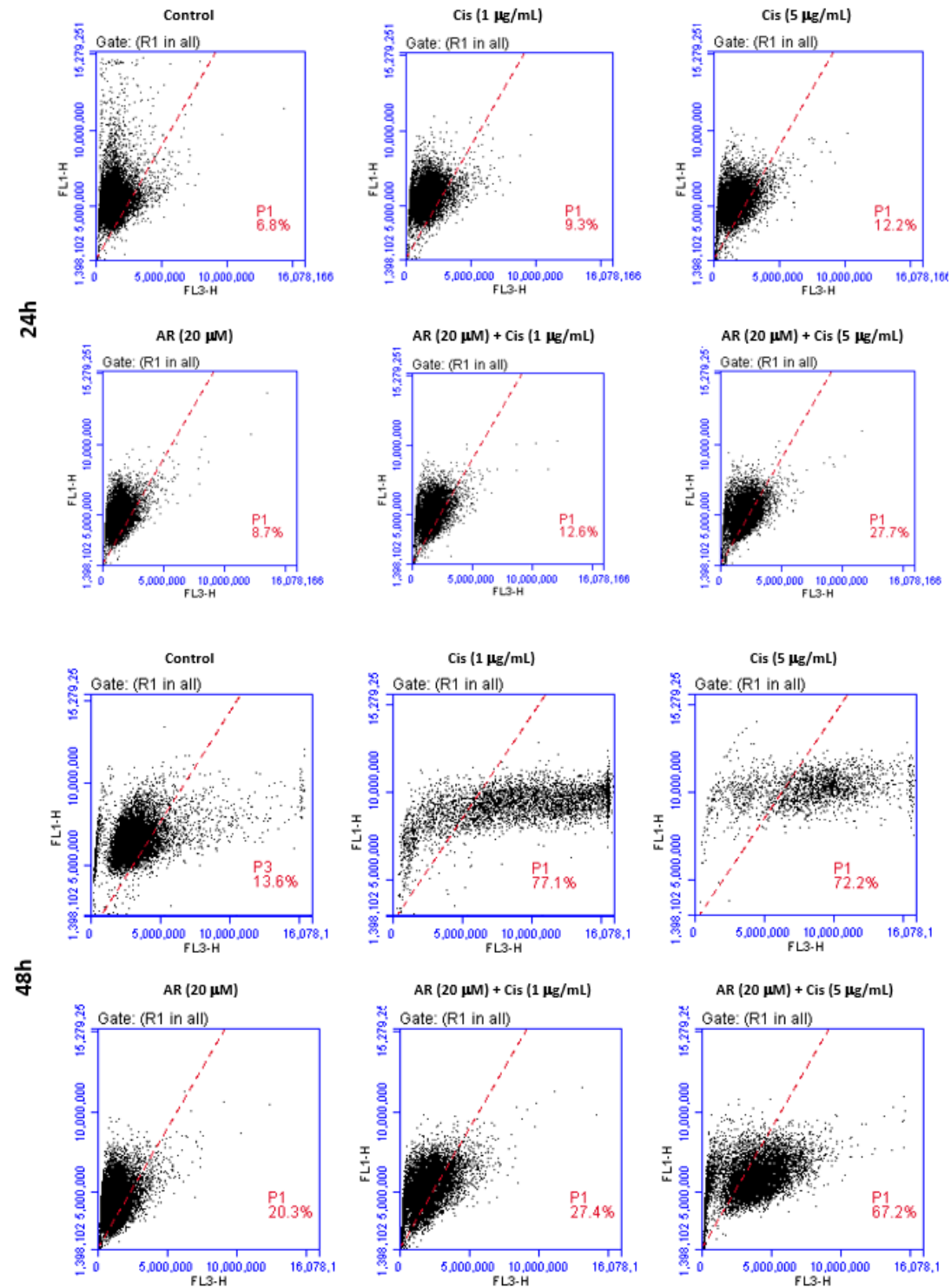
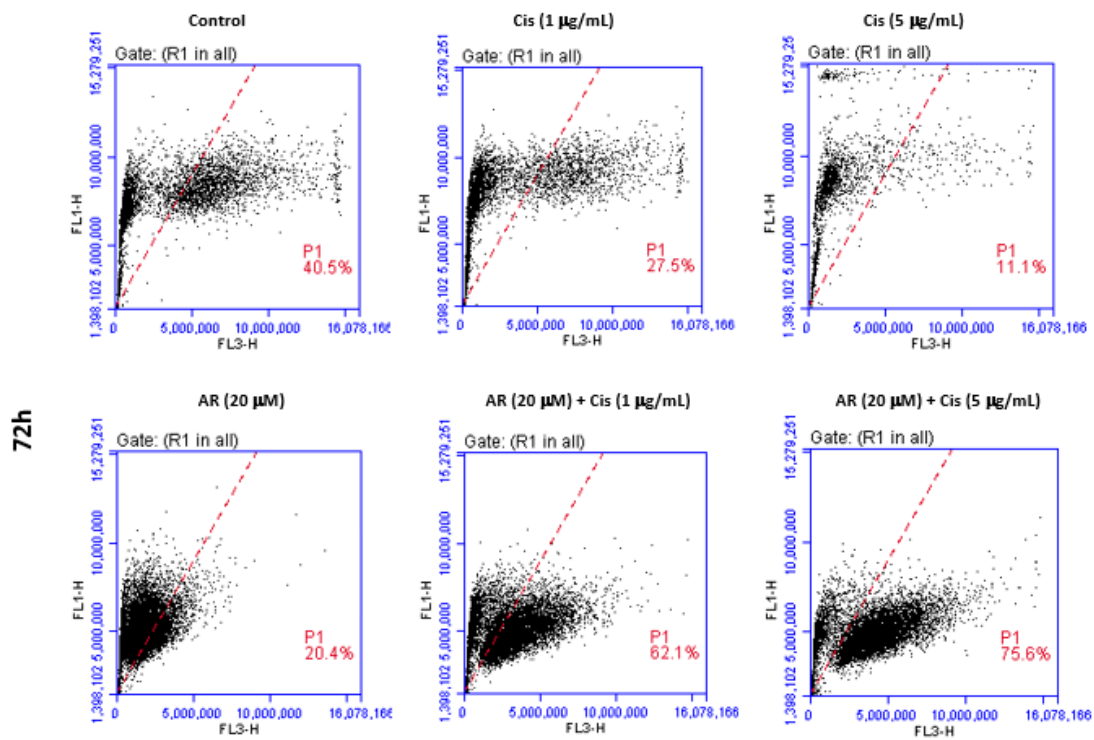


Figure 5: Cisplatin and retinoic acid effects on autophagy. **A:** Acridine orange (AO) staining by flow cytometry. **B:** Positive autophagic cells quantification. FL1: green channel. FL3: red channel. Cis: cisplatin. RA: retinoic acid. n = 4. *P<0.05. **P<0.01. ***P<0.0005. ****P<0.0001.

A





B

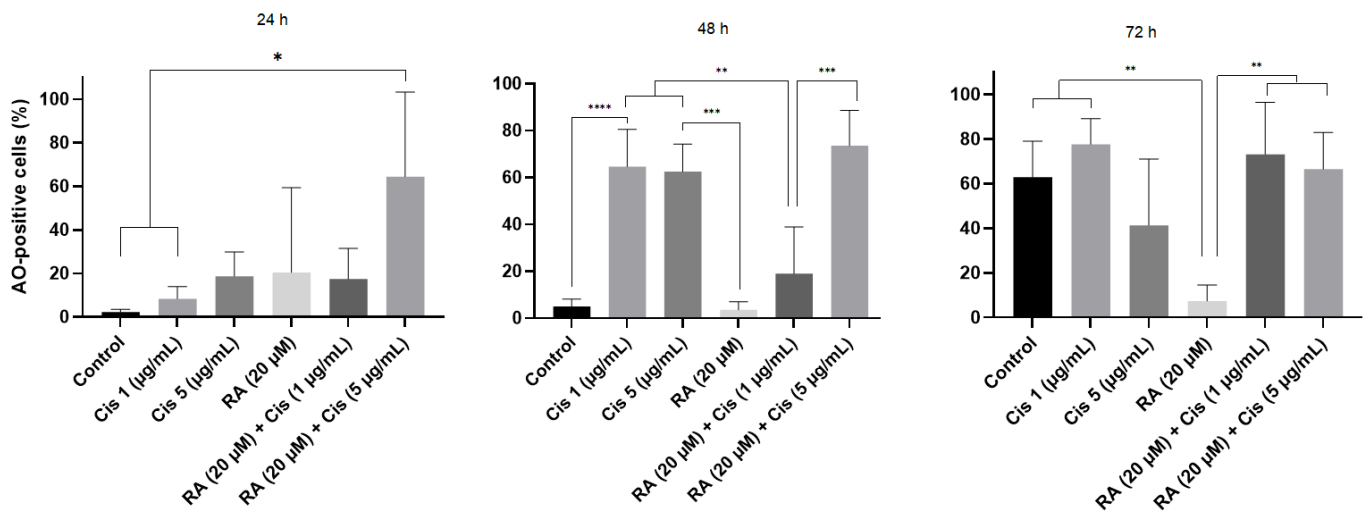
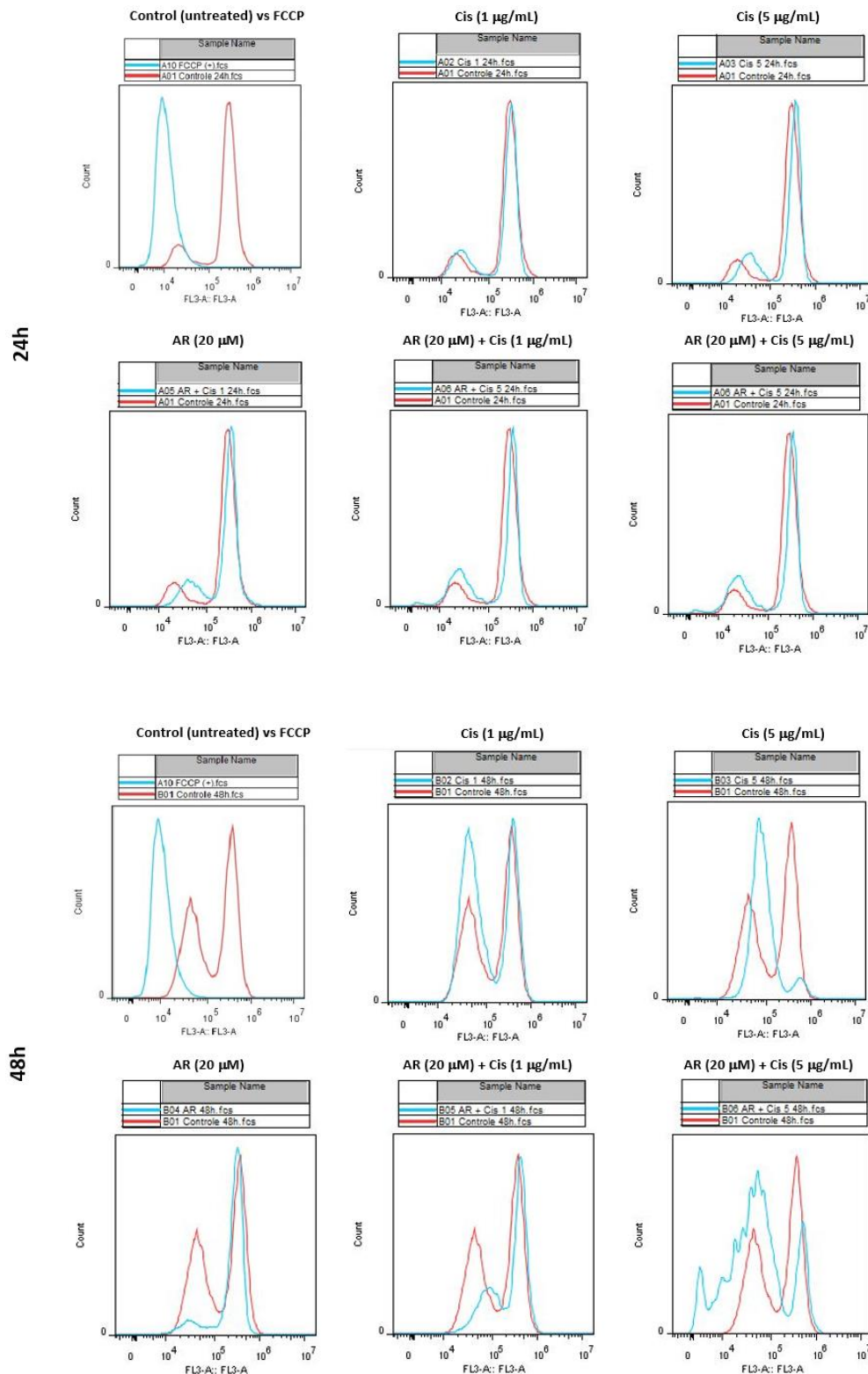
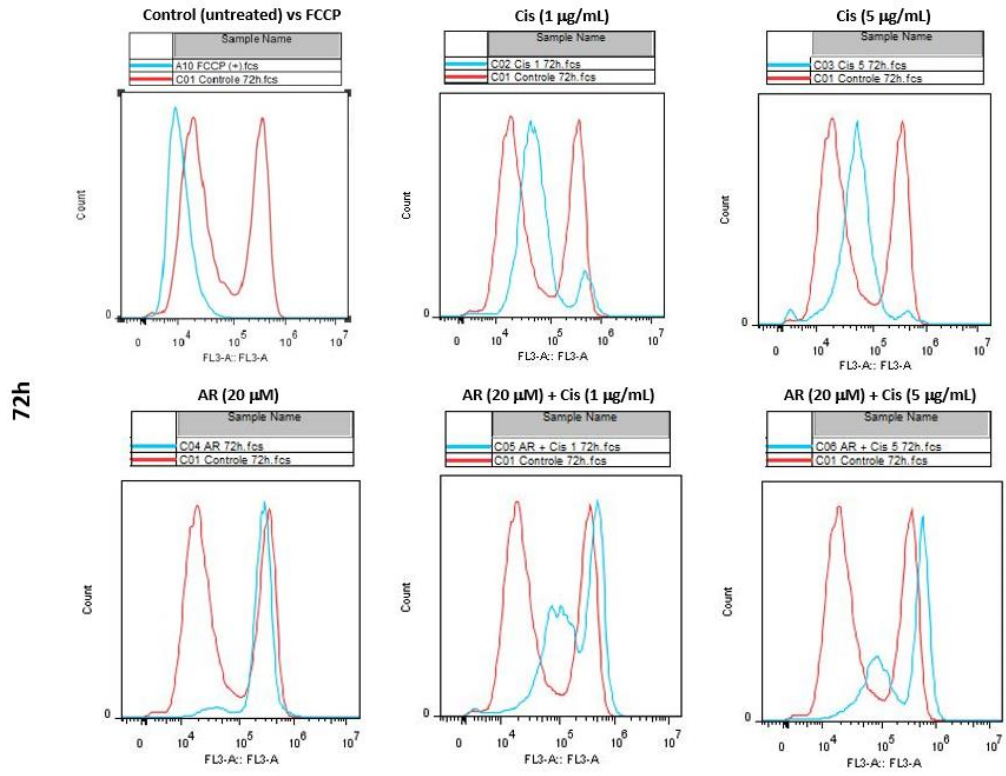


Figure 6: Cisplatin and retinoic acid effects on membrane potential ($\Delta\psi_m$) **A:** Mitostatus TMRE assay by flow cytometry. **B:** Quantification of medium fluorescence intensity of TMRE. FL1: green channel. FL3: red channel. FCCP: carbonilcyanide p-triflouromethoxyphenylhydrazone, a mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler. Cis: cisplatin. RA: retinoic acid. n=3. *P<0.05. **P<0.01. ****P<0.0001

A





B

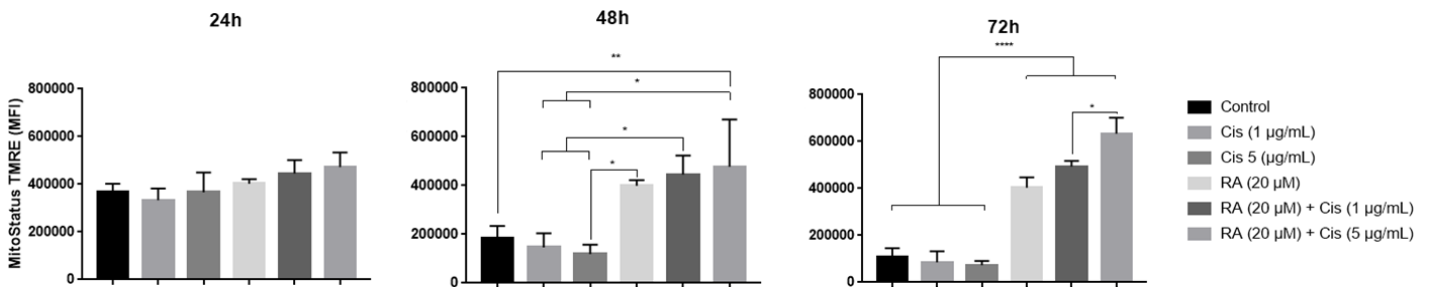
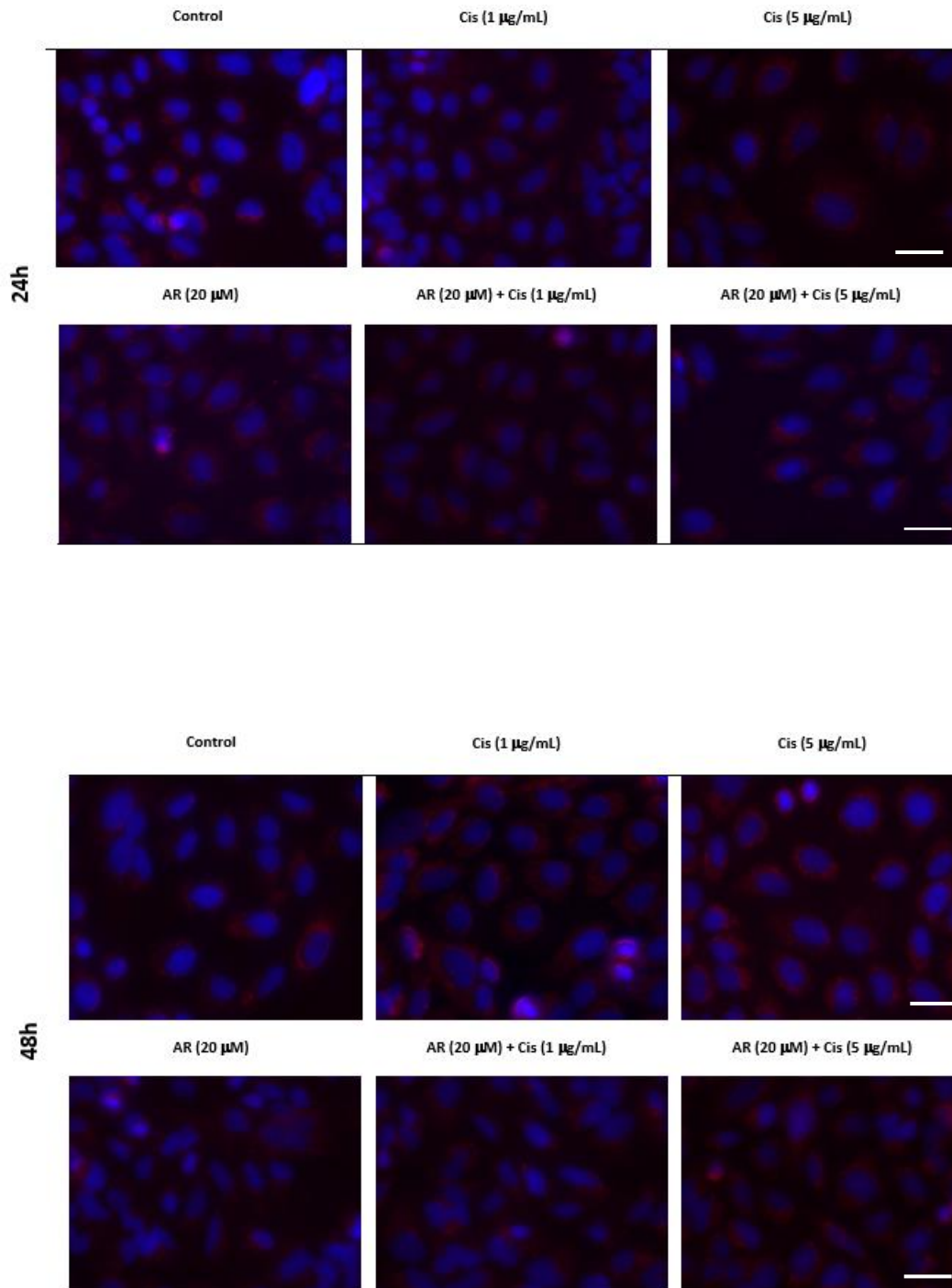
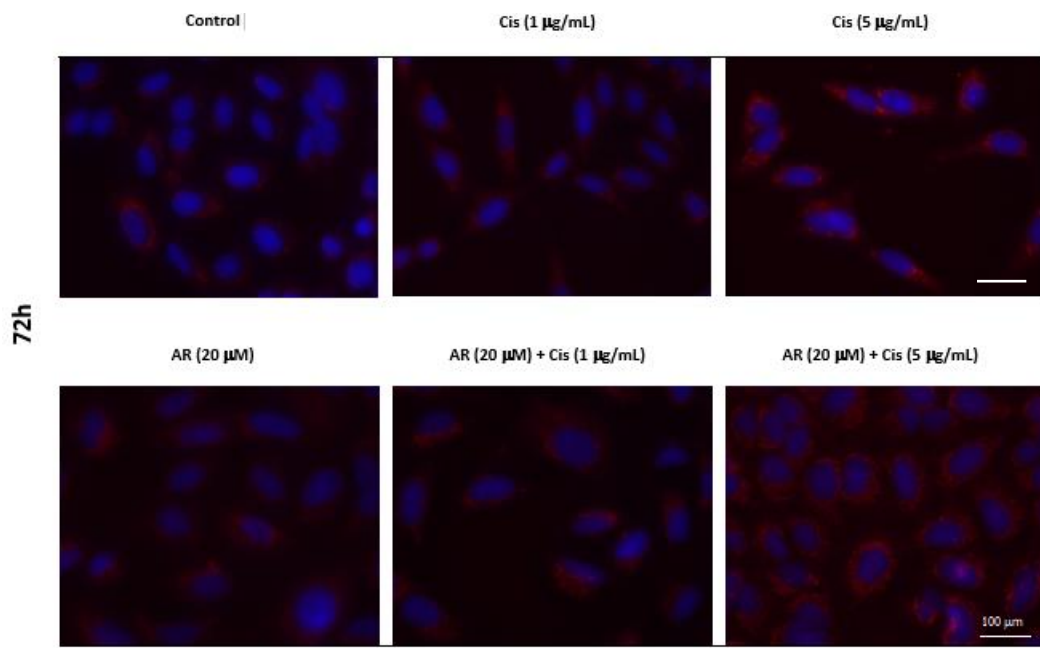


Figure 7: Imaging of A549 stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) marking the nucleus and MitoTracker red probe marking mitochondrial membrane. Images were processed in ImageJ software. Scale bar: 100 μm .





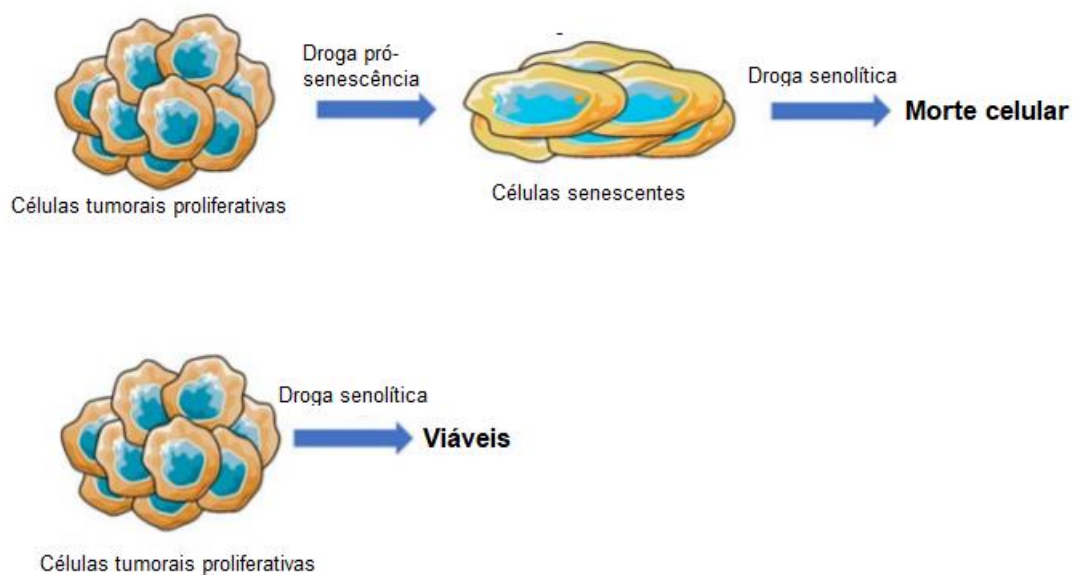
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O câncer de pulmão é o maior causador de morte por câncer entre homens no mundo e o segundo maior causador entre mulheres. O subtipo de câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) responde por mais de 80% dos casos (Torre, Siegel e Jemal 2016). Essa particularidade se deve parcialmente pela falta de estratégias de terapia eficientes. A quimioterapia em estágios avançados de NSCLC possui cerca de 20% a 35% de resposta global e 35% de taxa de sobrevivência (Scagliotti et al. 2002). Neste contexto, algumas abordagens terapêuticas para prevenção e combate desse tipo de câncer têm focado em minimizar a toxicidade sistêmica ao paciente, e diminuir a indução de resistência em células tumorais, fazendo com que o risco de recorrência tumoral diminua, aumentando a eficiência do tratamento. O microambiente tumoral é rico em fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que atraem e ativam outros tipos celulares, incluindo os fibroblastos associados ao câncer (CAF) que remodelam a matriz extracelular e promovem neoplasia (Mishra, Banerjee e Bem-Baruch 2011).

A problemática se dá a partir da indução de senescência celular após exposição a uma droga quimioterápica ou radiação. Foi demonstrado que células senescentes tumorais podem retomar sua capacidade proliferativa, diferente da ideia que se imaginava que as células senescentes teriam uma parada irreversível do ciclo celular. A senescência celular, em células de tumores residuais que sofreram algum tipo de dano massivo em terapias, podem representar um tipo dormência tumoral — e raramente podem escapar deste processo, fazendo com que haja uma retomada da população tumoral (Saleh, Tyutyunyk-Massey e Gewirtz 2019). Por exemplo, Roberson e colaboradores, em 2005, demonstraram que células da linhagem de câncer de pulmão H1299 (p16^{INK4a}-deficientes) podem evadir da senescência celular induzida por campotensina e renovar sua capacidade proliferativa. A frequência das células que retomaram o ciclo proliferativo foi de 1 para cada 1×10^6 células, ou seja, o fenótipo senescente ainda é o predominante e a evasão da senescência é um evento bastante raro —porém possível (Roberson 2005). Outro estudo mais recente demonstrou que uma pequena população de células de câncer de mama MCF-7 evadiu a senescência celular, fazendo com que estas adquiram potencial capacidade

de desenvolver resistência às terapias de indução de senescência (Saleh et al. 2019). As células senescentes adquirem um fenótipo bastante peculiar, que inclui alterações na estrutura da cromatina, e possuem diferenças na expressão gênica e metabolismo (Childs et al. 2015) (Muñoz-Espín e Serrano 2014) (Van Deursen 2014). Isso sugere que estas células podem ser sensíveis às drogas que tem como alvo apenas este estado amorfo, sem afetar células normais proliferativas (Fig. 3) (Wand e Bernards 2018).

Figura 3: Modelo de terapia para câncer utilizando drogas senolíticas. Drogas pró-senescência podem ser utilizadas para induzir a parada na proliferação associada ao fenótipo senescente. Uma terapia subsequente com agentes que matam seletivamente as células senescentes pode então ser aplicado para erradicar as células senescentes tumorais. As células tumorais proliferativas não são sensíveis aos senolíticos, fazendo com que uma terapia sequencial (duas ou mais etapas) ou concomitante seja necessária. (Adaptado de Wand e Bernards, 2018 – doi: 10.1007/s11684-018-0647-7)



Em relação à contribuição deste trabalho, demonstramos que a cisplatina induz senescência celular de maneira tempo e dose-dependente na linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549. Além disso, observamos que o ácido retinoico faz com que essas células evadam a indução de senescência por cisplatina por algum mecanismo a ser elucidado, que pode estar relacionado à diferenciação celular causada por AR. O AR também mostrou ter relação com a viabilidade mitocondrial, elevando o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Esta relação também se estende sobre a resposta celular à cisplatina, já que a mitocôndria é a fonte da

resposta das espécies reativas de oxigênio induzida por cisplatina. Nós observamos que na maior dose de cisplatina utilizada, o dano celular pode ser intenso de maneira que as células não consigam se adaptar e responder ao estresse, resultando numa viabilidade celular diminuída. Nós evidenciamos que em todos os casos: (i) somente cisplatina, (ii) somente ácido retinoico, e (iii) cisplatina em combinação com ácido retinoico podem ser prejudiciais para um tratamento eficiente. Em uma perspectiva clínica, existe a possibilidade de ocorrer problemas relacionados à biodisponibilidade, fazendo com que a mesma combinação de droga possa causar um efeito diferente do esperado. Com base nas ideias apresentadas, nós propomos, seguindo a direção da literatura recente, que o uso da cisplatina deve ser acompanhado por um tratamento de segunda etapa, chamado tratamento senolítico, para assim minimizar a chance de reincidência tumoral e diminuir a concentração de agentes que causam toxicidades sistêmicas, contribuindo para o bem estar de pacientes.

6. PERSPECTIVAS

- Investigar se os efeitos encontrados no trabalho são linhagem-dependentes, testando a combinação de ácido retinoico em outras linhagens tumorais imortalizadas de câncer de pulmão;
- Aprofundar a investigação sobre a evasão da indução de senescência causado por ácido retinoico;
- Aprofundar a investigação sobre a relação entre a atividade mitocondrial e os processos de adaptação ao estresse;
- Realizar novos estudos com tempos de tratamento mais longos, com modelo focado em mimetizar uma terapia clínica;
- Avaliar os efeitos dos tratamentos em caráter experimental tipo *single-cell*;
- Realizar estudos com modelo *in vivo* para validar os efeitos e mecanismos encontrados.

REFERÊNCIAS

Aebi, Stefan, et al. "all-trans retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells." *Clinical cancer research* 3.11 (1997): 2033-2038.

Arrieta, Oscar, et al. "Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 28.21 (2010): 3463-3471.

Arrieta, Oscar., et al. "Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer." *Neurology* 77.10 (2011): 987-995.

Childs, Bennett G., et al. "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy." *Nature medicine* 21.12 (2015): 1424.

Clarke, Nicole, et al. "Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL." *The EMBO journal* 23.15 (2004): 3051-3060.

Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* (2008); 6: 2853 – 68.

Darmon, Michael, et al. "Acute tumor lysis syndrome: a comprehensive review." *Rev Bras Ter Intensiva* 20.3 (2008): 278-285.

de Almeida, V. L., et al. "Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction." *Química nova* 28.1 (2005): 118-129

de Bittencourt Pasquali, Matheus Augusto, et al. "Gene expression profile of NF-κB, Nrf2, glycolytic, and p53 pathways during the SH-SY5Y neuronal differentiation mediated by retinoic acid." *Molecular neurobiology* 53.1 (2016): 423-435.

de Miranda Ramos, Vitor, et al. "Retinoic acid downregulates thiol antioxidant defences and homologous recombination while promotes A549 cells sensitization to cisplatin." *Cellular signalling* 62 (2019): 109356.

Demaria, Marco, et al. "Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse." *Cancer discovery* 7.2 (2017): 165-176.

Dimri, Gberdhan P., et al. "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.20 (1995): 9363-9367.

Dy GK, Adjei AA. "Systemic cancer therapy: evolution over the last 60 years". *Cancer* (2008); 113:1857 – 87.

Giard, Donald J., et al. "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *Journal of the National Cancer Institute* 51.5 (1973): 1417-1423.

Hall, Matthew D., et al. "The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008): 495-535.

Hayflick, Leonard, and Paul S. Moorhead. "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Experimental cell research* 25.3 (1961): 585-621.

Hayflick, Leonard. "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains." *Experimental cell research* 37.3 (1965): 614-636.

He, Ling, et al. "Cellular senescence regulated by SWI/SNF complex subunits through p53/p21 and p16/pRB pathway." *The international journal of biochemistry & cell biology* 90 (2017): 29-37.

He, Shenghui, and Norman E. Sharpless. "Senescence in health and disease." *Cell* 169.6 (2017): 1000-1011.

Hudson MM, Ness KK, Gurney JG, Mulrooney DA, Chemaitilly W, Krull KR, et al. "Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer". *JAMA* (2013); 309: 2371 – 81.

Kholodenko, Roman, et al. "Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism." *Cell research* 17.2 (2007): 151-162.

Kim, Ha-Neui, et al. "DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing *Osx1* may cause their decrease with age." *Aging Cell* 16.4 (2017): 693-703.

Kunzler, Alice, et al. "Changes in cell cycle and up-regulation of neuronal markers during SH-SY5Y neurodifferentiation by retinoic acid are mediated by reactive species production and oxidative stress." *Molecular neurobiology* 54.9 (2017): 6903-6916.

Lauber, Kirsten, et al. "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." *Cell* 113.6 (2003): 717-730.

Lieber, Michael, et al. "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells." *International journal of cancer* 17.1 (1976): 62-70.

McCulloch, Derek, Christina Brown, and Harry Iland. "Retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: current perspectives." *OncoTargets and therapy* 10 (2017): 1585.

Miller, Kimberly D., et al. "Cancer treatment and survivorship statistics, 2019." *CA: a cancer journal for clinicians* 69.5 (2019): 363-385.

Mishra, Pravin, Debabrata Banerjee, and Adit Ben-Baruch. "Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy." *Journal of leukocyte biology* 89.1 (2011): 31-39.

Muñoz-Espín, Daniel, and Manuel Serrano. "Cellular senescence: from physiology to pathology." *Nature reviews Molecular cell biology* 15.7 (2014): 482-496.

Noy, Noa. "Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis." *Annual review of nutrition* 30 (2010): 201-217.

Oliver, Trudy G., et al. "Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer." *Genes & development* 24.8 (2010): 837-852.

Organização Pan-Americana da Saúde – Disponível em <www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em 27/01/2020.

Perego, Paola, et al. "Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems." *Cancer research* 56.3 (1996): 556-562.

Persaud, Shawna D., et al. "All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-11.

Qu, Kai, et al. "Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33.9 (2013): 1253-1259.

Roberson, Rachel S., et al. "Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers." *Cancer research* 65.7 (2005): 2795-2803.

Saleh, Tareq, et al. "Tumor cell escape from therapy-induced senescence." *Biochemical pharmacology* 162 (2019): 202-212.

Saleh, Tareq, Liliya Tyutyunyk-Massey, and David A. Gewirtz. "Tumor cell escape from therapy-induced senescence as a model of disease recurrence after dormancy." *Cancer research* 79.6 (2019): 1044-1046.

Samarut, Eric, and Cécile Rochette-Egly. "Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development." *Molecular and cellular endocrinology* 348.2 (2012): 348-360.

Scagliotti, Giorgio Vittorio, et al. "Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer." *Journal of Clinical Oncology* 20.21 (2002): 4285-4291.

Schug, Thaddeus T., et al. "Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors." *Cell* 129.4 (2007): 723-733.

Schunemann M, Anker SD, Rauchhaus M. "Cancer fatigue syndrome reflects clinically non-overt heart failure: an approach towards oncocardiology". *Nat Clin Pract Oncol* (2008); 5: 632 – 3.

- Short, S., et al. "Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine* 41: 683–692." (2019).
- Sieben, Cynthia J., et al. "Two-step senescence-focused cancer therapies." *Trends in cell biology* 28.9 (2018): 723-737.
- Tang, X. H. & Gudas, L. J. "Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer". *Annual review of pathology* 6, (2011): 345–364.
- Thirumaran, Rajesh, George C. Prendergast, and Paul B. Gilman. "Cytotoxic chemotherapy in clinical treatment of cancer." *Cancer immunotherapy*. Academic Press (2007). 101-116.
- Torre, Lindsey A., Rebecca L. Siegel, and Ahmedin Jemal. "Lung cancer statistics." *Lung cancer and personalized medicine*. Springer, Cham, 2016. 1-19.
- Van Deursen, Jan M. "The role of senescent cells in ageing." *Nature* 509.7501 (2014): 439-446.
- Wang, Liqin, and Rene Bernards. "Taking advantage of drug resistance, a new approach in the war on cancer." *Frontiers of medicine* 12.4 (2018): 490-495.
- Wang, Xianghong, et al. "Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells." *Cancer Research* 58.22 (1998): 5019-5022.
- Wood, William A., et al. "Chemotherapy and stem cell transplantation increase p16INK4a expression, a biomarker of T-cell aging." *EBioMedicine* 11 (2016): 227-238.
- Yamauchi, Motohiro, et al. "Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by Ku80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-14.
- Zeng, Sulin, Wen H. Shen, and Li Liu. "Senescence and cancer." *Cancer translational medicine* 4.3 (2018): 70.
- Zhu, Yi, et al. "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs." *Aging cell* 14.4 (2015): 644-658.