

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise proteômica de proteínas sintetizadas em resposta a cisplatina em células
de adenocarcinoma de pulmão humano resistentes e sensíveis a droga**

Dissertação de Mestrado

Cristine de Souza Dutra

Porto Alegre, março de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Análise proteômica de proteínas sintetizadas em resposta a cisplatina em células de adenocarcinoma de pulmão humano resistentes e sensíveis a droga

Cristine de Souza Dutra

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, março de 2018

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos e no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Karina Mariante Monteiro, pelo incentivo, dedicação e ensinamentos durante a orientação deste trabalho.

Ao professor Dr. Arnaldo Zaha pela participação em minha comissão de acompanhamento, pelo apoio, auxílio e oportunidade de convívio e aprendizado durante toda a minha formação profissional.

Ao professor Dr. Guido Lenz pela participação em minha comissão de acompanhamento e pelas sugestões ao longo deste trabalho.

Ao professor Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira pelo exemplo, apoio e sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

À banca examinadora pela leitura cuidadosa deste trabalho.

Aos colegas e ex-colegas dos laboratórios 210, 206 e 204 pelas discussões científicas, apoio, incentivo e colaboração, bem como pelas conversas e risadas em momentos de descontração.

À minha colega e companheira de mestrado Carolina Lumertz Martello, por todas as discussões, ajudas e conselhos sobre a melhor maneira de conduzir um experimento, e também pelos convites irrecusáveis de comprar doce, tomar café ou fazer um lanche da tarde.

Ao aluno de iniciação científica, Nathan Araujo Cadore, pelo esforço, dedicação e auxílio nas realizações experimentais.

Às minhas amigas Amanda, Luiza, Mayara e Thiane que o curso de Biotecnologia me deu, agradeço pela amizade, carinho, companheirismo, apoio, conversas, incentivo e risada.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia da UFRGS, especialmente a Silvia Centeno e ao Luciano Saucedo, pelo auxílio e disposição nos esclarecimentos de diversas dúvidas.

À Uniprote-MS (CBiot) pelo suporte nas análises de LC-MS/MS

À minha família e namorado pela confiança e apoio dedicados a mim em todos os momentos.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Câncer.....	9
1.2. Câncer de pulmão.....	11
1.3. Fatores de risco.....	13
1.4. Cisplatina no tratamento do câncer de pulmão.....	15
1.5. Mecanismos celulares de resistência à cisplatina.....	17
1.6. Modelos celulares e estudos proteômicos do câncer.....	20
1.7. Proteínas recém-sintetizadas.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos específicos	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
4.1 Abstract.....	29
4.2. Introduction	30
4.3. Results.....	32
4.4. Discussion.....	43
4.5. Methods.....	48
4.6. References.....	51
5. DISCUSSÃO.....	55
6. PERSPECTIVAS.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. CURRÍCULO VITAE RESUMIDO.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	Azidohomoalanina
BONCAT	do inglês, <i>BioOrthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging</i>
CDDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatina, cisplatina
EMT	do inglês, <i>Epithelial–Mesenchymal Transition</i>
GI₅₀	do inglês, 50% of <i>growth inhibition</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
NaCl	cloreto de sódio
NER	do inglês, <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NSCLC	do inglês, <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
PDI	proteínas dissulfeto isomerasas
ROS	do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCLC	do inglês, <i>Small Cell Lung Cancer</i>
RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RESUMO

O câncer de pulmão está entre os mais frequentes na população mundial e é o responsável pelo maior número de mortes relacionadas ao câncer. Como o câncer de pulmão é identificado em estágios avançados de desenvolvimento, o principal tratamento é baseado em quimioterapia utilizando moléculas derivadas de platina, principalmente a cisplatina (CDDP). A CDDP é capaz de formar ligações cruzadas no DNA resultando em morte celular, porém muitos pacientes apresentam tumores que são resistentes ao tratamento com CDDP. Esta resistência é uma das principais barreiras para o sucesso do tratamento do câncer de pulmão através de quimioterapia. Para entendermos melhor os mecanismos envolvidos na resistência a CDDP em células de câncer de pulmão, foram utilizadas células sensíveis (A549) e resistentes a CDDP (A549/CDDP) para a identificação de proteínas recém-sintetizadas em resposta ao tratamento com a droga através da técnica BONCAT. Através desta técnica foi possível a identificação de 173 e 136 proteínas reguladas por CDDP nas células A549 e A549/CDDP, respectivamente. As proteínas identificadas estão relacionadas a diversos mecanismos moleculares distintos que potencialmente estão envolvidos na resposta a CDDP, como por exemplo *splicing* alternativo, resposta a estresse oxidativo, manutenção do telômero, regulação da apoptose e reorganização do citoesqueleto. Os resultados mostram que as células A549/CDDP são menos suscetíveis ao dano no DNA causado por CDDP do que as células sensíveis, A549. Além disso, as células A549/CDDP são capazes de aumentar a expressão de proteínas capazes de combater as espécies reativas de oxigênio geradas devido a presença de CDDP. Além disto, CDDP é capaz de induzir diferentes vias apoptóticas em células com diferentes sensibilidades à droga. Nas células A549, CDDP induz a ativação da via extrínseca enquanto que nas A549/CDDP ela é capaz de induzir a ativação da via intrínseca de apoptose. Portanto, nosso estudo foi capaz de fornecer evidências de proteínas e vias que são diferencialmente expressas e ativadas após o tratamento com CDDP.

ABSTRACT

Lung cancer is among the most frequent cancer in the world population and it is the leading cause of cancer-related deaths. Since lung cancer is identified in advanced stages of development, the main treatment is based in chemotherapy using platinum containing compounds, mainly cisplatin (CDDP). CDDP is able to crosslink with DNA leading to cell death, however many patients show tumor that are resistance to CDDP. This resistance is one of the main barriers for the success of lung cancer treatment by chemotherapy. To understand the mechanisms involved in CDDP resistance in lung cancer, we used CDDP-sensitive (A549) and –resistant (A549/CDDP) cells to identify the newly synthesized proteins in response to drug exposure by BONCAT technique. It was possible the identification of 173 and 136 proteins regulated by CDDP in A549 and A549/CDDP cells, respectively. The identified proteins were related to several distinct molecular mechanisms potentially involved in CDDP response, including alternative splicing, response to oxidative stress, telomere maintenance, apoptosis regulation and cytoskeleton reorganization. Our results showed that A549/CDDP cells are less susceptible to DNA damage caused by CDDP than A549 cells. A549/CDDP also are able to increase the expression of proteins that combat the reactive oxygen species generated due to CDDP presence. In addition, CDDP induces different apoptotic pathways in drug-sensitive and resistant cell. In the A549 cells, CDDP induces the activation of the extrinsic pathway, while in A549/CDDP cells CDDP induces the intrinsic apoptotic pathway. So, our study was able to provide evidence of proteins and pathways that are differentially express and activated after CDDP treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é o nome utilizado para um grupo de doenças que é caracterizado pela divisão celular descontrolada e desordenada de células anormais. Esta divisão desordenada de células resulta na formação de tumores, que podem ser classificados como tumores benignos ou malignos (Figura 1). Somente tumores malignos se encaixam na denominação de câncer, pois suas células cancerosas são capazes de invadir outros tecidos ou órgãos, processo também conhecido como metástase. Já os tumores classificados como benignos são tumores que não possuem capacidade de invasão, geralmente estes tumores possuem crescimento lento e bordas bem definidas, por isso podem ser facilmente removidos por cirurgia.

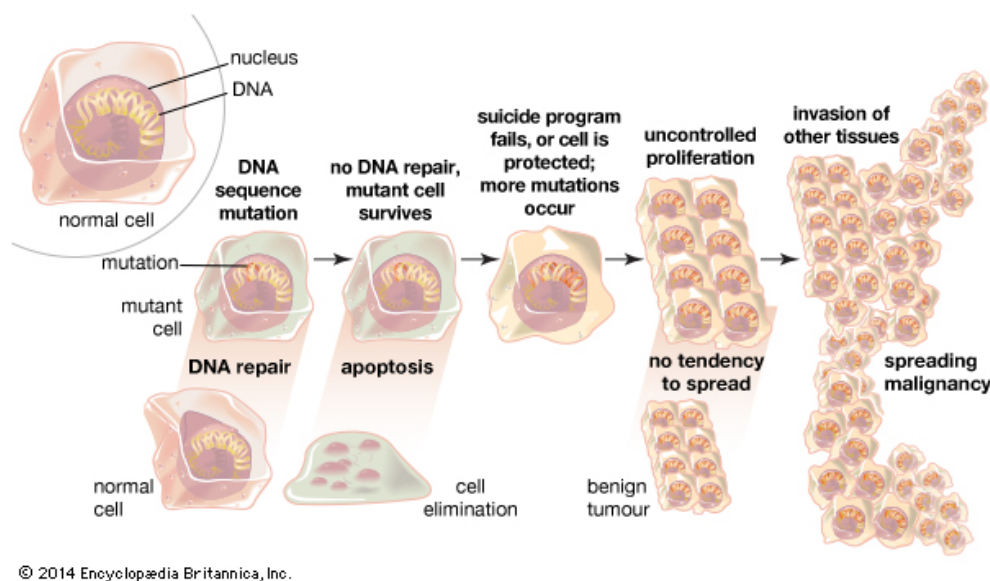


Figura 1. Desenvolvimento de tumores. Mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de tumores malignos e benignos. Falha nos mecanismos de reparo do DNA e na via de apoptose pode resultar na formação de tumores. Fonte: Encyclopedia Britannica, 2014.

Uma célula tumoral é resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. O somatório destas alterações permite que esta célula tenha vantagens seletivas (tanto negativas quanto positivas) sobre as células normais,

podendo resultar na rápida colonização do órgão afetado. Dentre as alterações encontradas em células cancerosas alguns processos celulares podem ser citados como: resistência a sinais de morte celular, bloqueio de sinais supressores de crescimento e habilidade de escape da destruição celular mediada pelo sistema imune, bem como outros mecanismos (Figura 2) (Hanahan e Weinberg, 2011). A divisão das células tumorais leva a produção de células filhas também tumorais, onde diversas outras mutações podem ocorrer aleatoriamente. Como este tipo de célula está com seus mecanismos de manutenção de homeostase afetados (Hanahan e Weinberg, 2011), cada célula pode ser modificada de maneira singular, resultando na alta heterogeneidade celular encontrada em uma mesma massa tumoral.

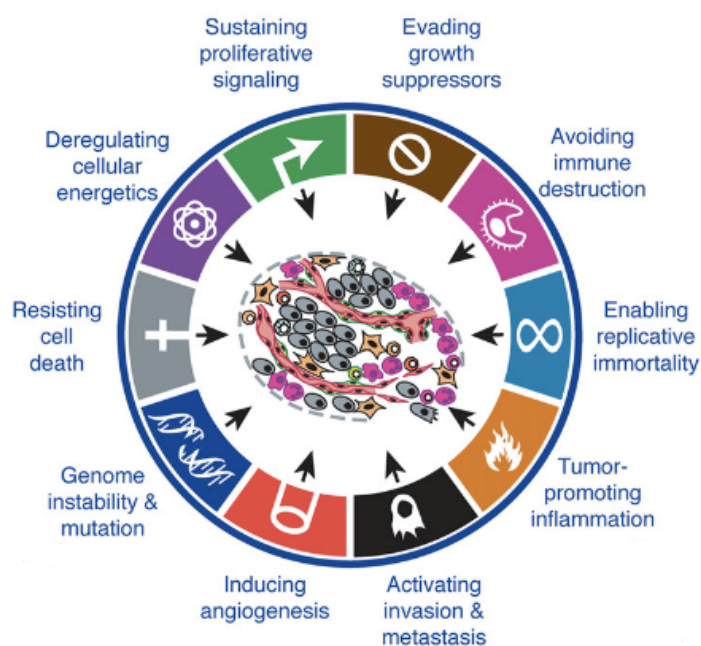


Figura 2. Processos celulares alterados envolvidos no desenvolvimento de células tumorais. Imagem modificada de Hanahan e Weinberg, 2011.

O câncer é o segundo líder de causa de morte e morbidade no mundo, em 2012 houve aproximadamente 14 milhões de novos casos e em 2015 8.8 milhões de pessoas morreram devido a câncer (WHO 2017). As causas de mortes mais comuns relacionadas a câncer são provenientes de câncer de pulmão (1.69 milhões de mortes), fígado (788.000 mortes) e câncer colorretal (774.000 mortes)

(WHO 2017). É esperado que o número de novos casos de câncer aumentem em aproximadamente 70% nas próximas duas décadas. Pesquisas recentes dos Estados Unidos estimam a ocorrência de mais de 1,6 milhões de novos casos e acima de 600 mil mortes relacionadas a câncer (Siegel *et al.*, 2017). A estimativa para o Brasil, para os anos de 2016 e 2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer (Figura 3) (INCA, 2016).

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 3. Estimativa de novos casos de cânceres na população brasileira para os anos de 2016 e 2017. Fonte: INCA, 2016.

1.2. Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é o tumor mais comum dentre os tumores malignos e o tipo de câncer que mais causa mortes no mundo (WHO, 2017). O tumor pulmonar pode se formar desde a traqueia até os brônquios, bem como nas regiões mais periféricas do órgão. No Brasil, em 2014, houve a ocorrência de 34.280 casos deste tumor e ele foi responsável por mais de 27.000 mortes (WHO, 2014). Estima-se 116.990 novos casos de câncer de pulmão em homens e 105.510 em mulheres para o ano de 2017 nos Estados Unidos (aproximadamente 25% de todos os diagnósticos de câncer). Além disso, é estimado que o tumor pulmonar seja o responsável por mais de 155 mil mortes em 2017, correspondendo a 1 a cada 4 mortes relacionadas a câncer (ACS, 2017a). No Brasil para o ano de 2016 foram estimados 17.330 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.890 em mulheres, sendo o segundo câncer mais frequente em homens e o quarto em mulheres (dados estatísticos feitos sem levar em consideração o câncer de pele não melanoma) (Figura 3) (INCA, 2016).

O câncer de pulmão é normalmente diagnosticado em estágio avançado, pois os sintomas geralmente aparecem após longo tempo de desenvolvimento do tumor. Como os pulmões possuem uma grande área de ventilação, uma pequena massa tumoral não é capaz de interferir no funcionamento do órgão, desta maneira os sintomas começam a surgir quando o tumor já está bem desenvolvido. Os sintomas mais comuns do câncer de pulmão incluem: perda de peso e apetite, tosse incomum (que se mantém por um longo período ou se torna pior), sangramento pelas vias respiratórias, dor no peito, rouquidão, fadiga e dispneia (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015). O diagnóstico do câncer de pulmão é realizado por exames adequados para a detecção do tumor, geralmente é realizado um exame de raio X na região do tórax para que seja possível a visualização de uma possível massa tumoral. Caso haja alguma alteração no resultado de raio X, uma tomografia computadorizada pode ser solicitada, bem como broncoscopia, toracoscopia e biópsia (Eggert *et al.*, 2017). Após a confirmação do diagnóstico de câncer de pulmão, o tumor é então classificado de acordo com seu tipo histológico e pode ser dividido em dois grandes grupos: câncer de pulmão de células pequenas (SCLC, *Small Cell Lung Cancer*) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*). Este segundo grupo pode ser subdividido em carcinoma de células escamosas, câncer de pulmão de células grandes e adenocarcinoma, este último sendo o mais frequentemente diagnosticado (aproximadamente 40% dos casos de câncer de pulmão) (Herbst *et al.*, 2008). Finalmente é realizado o estadiamento (sistema TNM de classificação dos tumores malignos), que é a avaliação do estágio de evolução no qual o tumor se encontra (ACS, 2017b). O estadiamento do tumor é importante pois reflete sua taxa de crescimento e extensão da doença, bem como seu tipo e sua relação com o hospedeiro, além disso o estadiamento também é importante para a escolha do tratamento apropriado para o tipo de tumor diagnosticado.

1.3. Fatores de risco

O câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de mortes evitáveis no final do século XX, já que a principal causa para o surgimento de câncer de pulmão é o tabagismo, hábito que pode ser evitado. Indivíduos com hábitos de tabagismo possuem maiores chances de desenvolver câncer de pulmão quando comparados a indivíduos não fumantes, aproximadamente 90% dos casos de câncer de pulmão possuem associação ao uso do tabaco (Bilello *et al.*, 2002). Apesar desta elevada associação do uso do tabaco com o desenvolvimento do tumor, menos de 20% dos indivíduos fumantes desenvolvem câncer de pulmão, desta forma diversos outros fatores ambientais podem estar associados ao surgimento do tumor (Figura 4) (Bilello *et al.*, 2002).

Como já mencionado o uso do cigarro é o principal fator de risco para o câncer de pulmão, em pacientes fumantes a taxa de mortalidade devido ao câncer é maior do que em indivíduos não fumantes. Além do tabagismo estar associado ao desenvolvimento do tumor, a quantidade de cigarros utilizados por dia também influencia no risco de morte, quanto mais cigarros utilizados, menor a chance de sobrevivência (relação dose-resposta) (Bilello *et al.*, 2002). Entretanto, o risco relativo para câncer de pulmão diminui em ex-fumantes depois de 5 anos sem o uso do cigarro, porém o risco ainda é maior do que indivíduos não fumantes. Não só o cigarro pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão, mas também o uso de charutos, apesar de o uso de charutos ser bem menos estudado, alguns estudos mostraram que ele pode contribuir para o aumento no risco de câncer de pulmão mesmo que com menor potencial quando comparado ao cigarro (Iribarren *et al.*, 1999; Shapiro *et al.*, 2000; Bilello *et al.*, 2002).



Figura 4. Fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão. Imagem modificada de *National Jewish Health*, 2012.

Além da fumaça inalada diretamente do cigarro, a fumaça resultante da queima do cigarro também pode aumentar o risco para câncer de pulmão. Estudos mostraram que indivíduos não fumantes que vivem na mesma casa que pessoas fumantes apresentam uma maior chance de desenvolver tumor pulmonar (aproximadamente 30%) (Cardenas *et al.*, 1997; Bilello *et al.*, 2002). Desta forma, a exposição ambiental a fumaça de cigarro também pode aumentar o risco para o aparecimento do tumor.

Outro fator que pode aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão é a exposição a radônio. O radônio é um gás inerte, inodoro e incolor que é liberado do solo em regiões ricas em minérios como o urânio. Em seu processo natural de decaimento o radônio pode liberar partículas alfa que são capazes de danificar o epitélio respiratório (Bilello *et al.*, 2002). O radônio além de ser liberado para a atmosfera, ainda é capaz de se difundir pelo solo e se concentrar próximo a edifícios e casas (Choi *et al.*, 2016; Sheen *et al.*, 2016). O risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de pulmão devido a exposição a radônio foi evidenciado através de estudos com mineiros de mina de urânio (Lubin *et al.*, 1995; Gilliland *et al.*, 2000; Leng *et al.*, 2016; Navaranjan *et al.*, 2016), e muitos estudos mostraram que indivíduos com exposição a radônio

apresentam um risco elevado para desenvolvimento de câncer de pulmão (Bilello *et al.*, 2002).

A exposição a diversos agentes potencialmente carcinogênicos no ambiente de trabalho também pode aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão. Existem muitos agentes que são capazes de causar câncer, dentre os carcinogênicos ocupacionais conhecidos pode se destacar asbestos, radônio, compostos aromáticos policíclicos e produtos provenientes da combustão de carvão, entre outros (Bilello *et al.*, 2002; Pelissier *et al.*, 2017). O agente ocupacional mais comum e mais bem estudado é o asbesto (amianto), ele é altamente usado devido a suas propriedades de isolamento e força. Estudos demonstraram que indivíduos expostos ao amianto possuem maior risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (Bilello *et al.*, 2002). Este risco varia de acordo com o nível de exposição e também de acordo com o tipo de fibra produzida.

Muitos outros fatores podem influenciar no desenvolvimento de câncer de pulmão, como fatores genéticos, doenças pulmonares pré-existentes, tratamento por radioterapia na região do tórax e também por uma dieta não balanceada (Bilello *et al.*, 2002; Hodgson *et al.*, 2007; Kaufman *et al.*, 2008). Como muitos fatores podem influenciar no aparecimento do tumor pulmonar, a combinação entre eles possui uma ação sinérgica. Por exemplo, Hammond *et al.* (1979) verificaram que a exposição a asbestos confere um risco aumentado em 6 vezes para o desenvolvimento de câncer de pulmão, e que o fumo apresenta um risco 11 vezes maior, porém a combinação de ambos fatores aumenta este risco em 59 vezes.

1.4. Cisplatina no tratamento do câncer de pulmão

Os agentes utilizados na quimioterapia para o tratamento do câncer possuem a capacidade de afetar tanto as células normais quanto as células neoplásicas de maneira inespecífica em diferentes etapas do ciclo celular. Apesar de o dano ocorrer também em células de tecidos normais, ele é maior em células malignas devido a diferenças quantitativas entre os processos metabólicos

apresentados por estas células. No câncer de pulmão os sintomas geralmente se manifestam quando a doença já está em estágio avançado, sendo assim o diagnóstico é realizado quando não há possibilidade de remoção cirúrgica do tumor. Desta forma o principal tratamento para este tipo de câncer é baseado em quimioterapia com agentes alquilantes derivados de platina, como a cisplatina (CDDP). A cisplatina é uma das drogas mais utilizadas para o tratamento de câncer de pulmão, podendo ser administrada no paciente juntamente com outra droga quimioterápica. Porém, muitos pacientes apresentam resistência ao tratamento com CDDP, sendo este o principal problema relacionado ao tratamento do tumor. A resistência apresentada pelos pacientes pode ser tanto resistência intrínseca, quando o paciente não responde ao tratamento logo no início da quimioterapia, como resistência adquirida, quando o paciente adquire resistência a droga ao longo do tratamento (Florea e Büsselberg, 2011).

A CDDP é uma molécula inerte, porém quando um ou ambos grupamentos cloro são substituídos por moléculas de água ela passa a ser uma molécula altamente eletrofílica propensa a formar ligações covalentes (Galluzzi *et al.*, 2014). CDDP é capaz de formar adutos em bases purinas do DNA mitocondrial e nuclear de modo a impedir a separação das duas fitas de DNA (Figura 5) (Galluzzi *et al.*, 2014). A presença de CDDP na molécula de DNA nuclear acaba impedindo processos biológicos importantes, como replicação e transcrição, levando a morte celular (Figura 6) (Esteban-Fernández *et al.*, 2010). Além disso, a interação entre CDDP e nucleófilos presentes no citoplasma celular pode levar ao estabelecimento de estresse oxidativo resultando em efeitos citotóxicos.

A molécula de CDDP, quando no interior da célula, pode levar a célula a um estado de estresse oxidativo, já que sua presença é capaz de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxygen Species”). As células, em condições fisiológicas normais, são capazes de manter um correto balanço entre a geração de ROS e sua eliminação. Porém em condições de estresse oxidativo, uma quantidade maior de ROS no interior celular pode causar danos nas proteínas, lipídeos e DNA das células resultando em lesões fatais que podem levar a morte celular (Dasari e Tchounwou, 2014).

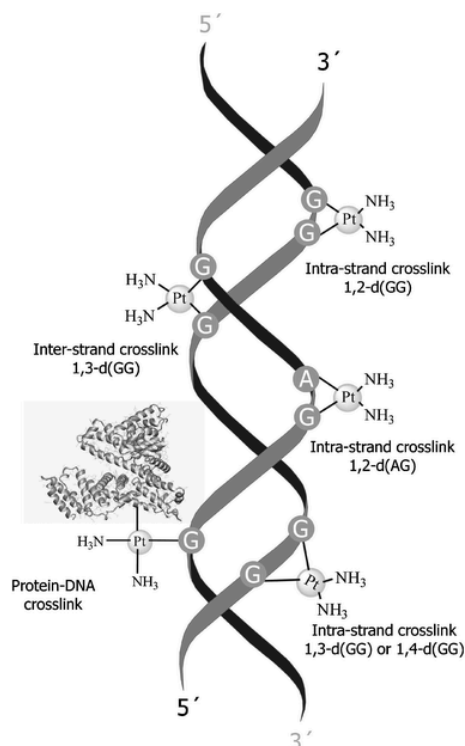


Figura 5. Interações da molécula de CDDP com as bases do DNA. A molécula de CDDP forma ligações covalentes com a molécula de DNA resultando em crosslinks, principalmente, entre as bases purinas covalentes. A maioria dos adutos formados entre a molécula de CDDP e DNA é entre guaninas adjacentes na mesma fita, seguido por adutos formados entre adenina e guanina vizinhas intracadeia. Estes dois tipos de adutos são responsáveis por aproximadamente 90% das interações produzidas pela molécula de CDDP com DNA. As outras formas de interações incluindo, adutos entre guaninas não adjacentes intracadeia, bem como crosslinks intercadeias e crosslinks entre DNA e proteínas compõem os 10% restantes de espécies produzidas. Fonte: Esteban-Fernández *et al.*, 2010.

1.5. Mecanismos celulares de resistência à cisplatina

Existem diversos mecanismos pelo qual uma célula pode apresentar resistência a CDDP, como o acúmulo intracelular da droga, alterações no processo de reparo ao DNA e alterações nas vias apoptóticas e de resposta ao dano no DNA (Figura 7) (Köberle *et al.*, 2010). Estudos mostraram que o acúmulo da droga no interior da célula resistente é menor quando comparado com células sensíveis a CDDP, sugerindo a existência de alterações no sistema de transporte da droga, como o aumento do efluxo de CDDP ou diminuição do influxo da mesma (Mellish *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 2007; Köberle *et al.*, 2010). Uma vez no citoplasma, a molécula de CDDP pode ser inativada por moléculas contendo grupamentos tiol, como, por exemplo, glutatona e metalotioneínas (Timerbaev *et*

al., 2006; Köberle *et al.*, 2010). Apesar de a molécula de CDDP ser inerte e necessitar de ativação, a interação entre sua forma contendo moléculas de água e nucleófilos intracelulares pode resultar em estresse oxidativo, devido a diminuição de equivalentes redutores no interior da célula, podendo promover maior dano ao DNA (efeito citotóxico da CDDP). Por outro lado, a interação da CDDP ativa com os nucleófilos endógenos pode resultar em inativação de uma fração da droga (efeito protetor) (Galluzzi *et al.*, 2014).

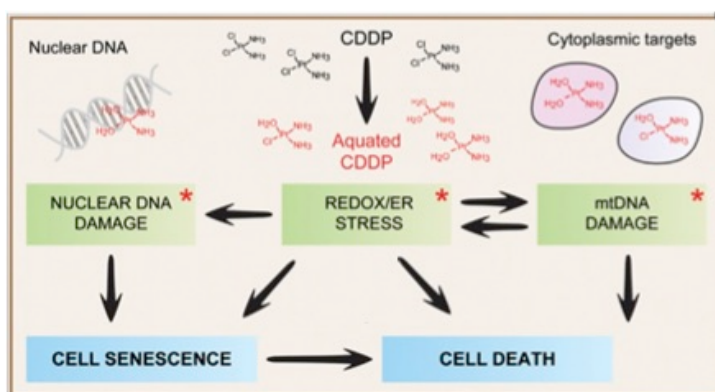


Figura 6. Efeitos citotóxicos da molécula de CDDP. A molécula de CDDP pode causar a morte celular por diferentes mecanismos, incluindo dano no DNA nuclear, estresse oxidativo e dano no DNA mitocondrial. Imagem modificada de Galluzzi *et al.*, 2014.

Outros mecanismos envolvidos na resistência a CDDP estão relacionados com a alta eficiência dos mecanismos de reparo de dano no DNA (Köberle *et al.*, 2010). Diversas linhagens celulares tumorais apresentam um aumento na capacidade de reparo das lesões no DNA causadas por CDDP. Os adutos formados entre bases purinas presentes em uma mesma fita de DNA podem ser removidos pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *Nucleotide Excision Repair*), que é o principal mecanismo envolvido no reparo de lesões no DNA causadas por drogas quimioterápicas (Shuck *et al.*, 2008). Algumas células resistentes a CDDP apresentam maior capacidade de reparo via NER quando comparadas com células sensíveis (Johnson *et al.*, 1994; Köberle *et al.*, 2010). A CDDP também é capaz de formar adutos em bases purina de fitas distintas que podem ser reparados por outro mecanismo que não NER (reparo de “interstrand crosslink”). Assim como ocorre com NER, este mecanismo de reparo também pode estar alterado em células resistentes a CDPP (Wynne *et al.*, 2007).

Desta forma, um dos mecanismos envolvidos na resistência a CDDP pode ser a alta eficiência de reparo do dano no DNA.

Apesar de haver estes mecanismo de reparo nas células, algumas lesões podem não ser reparadas e permanecerem na molécula de DNA. Uma célula pode possuir a capacidade de tolerar uma lesão no DNA utilizando polimerases especializadas que são capazes de ignorar diferentes tipos de lesões, processo chamado de síntese de translesão (Köberle *et al.*, 2010). A eficiência alterada destas polimerases pode estar relacionada com resistência de células tumorais a CDDP. Mecanismos envolvidos no reparo de bases únicas desemparelhadas e de intermediários em loop resultantes da replicação do DNA ou resultantes de dano no DNA também podem estar alterados em células cancerosas provocando resistência a CDDP.

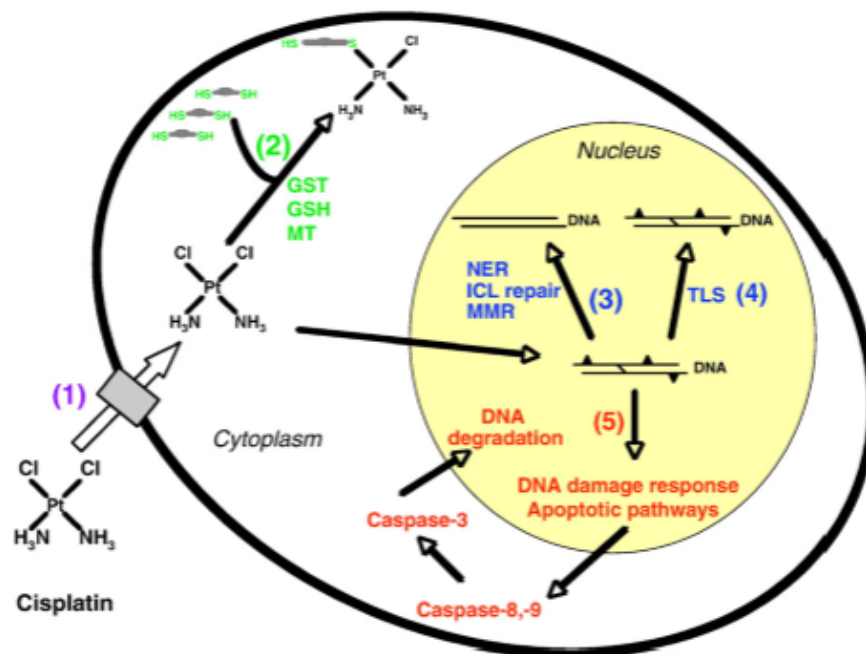


Figura 7. Mecanismos de resistência a CDDP. Diversos mecanismos moleculares podem estar envolvidos na resistência a CDDP, incluindo aumento no efluxo ou diminuição do influxo da droga (1), detoxificação da CDDP no citoplasma (2), alterações nos mecanismos de reparo do DNA (3, 4) e na eficiência do processo de apoptose (5). Fonte: Köberle *et al.*, 2010

Além da maior capacidade de acúmulo da droga no interior das células e de reparo a dano do DNA, mecanismos de resposta ao dano e relacionados às vias apoptóticas também podem estar alterados em células resistentes a CDDP

(Köberle *et al.*, 2010; Dasari e Tchounwou, 2014; Galluzzi *et al.*, 2014). A proteína p53, conhecida como a guardiã do genoma, é uma proteína supressora de tumor que pode estar envolvida em diversos mecanismos moleculares da célula, incluindo apoptose. A proteína p53 induz a apoptose quando são identificados danos no DNA. Desta forma a alteração da atividade desta proteína pode estar relacionada com a diferença de sensibilidade a CDDP em células cancerosas. Em caso de diminuição ou ausência da atividade de p53, as células tendem a ser resistentes a CDDP, caso contrário sensíveis. Alterações nas funções de proteínas efetoras envolvidas nas vias apoptóticas também podem ser responsáveis pela resistência a agentes quimioterápicos, como a CDDP (Köberle *et al.*, 2010). Assim como alterações na expressão ou na atividade de proteínas pró-apoptóticas, como p53, podem levar a resistência a CDDP, alterações em proteínas anti-apoptóticas também podem ser causa de resistência a CDDP (Köberle *et al.*, 2010). Sendo assim, a expressão aumentada de fatores inibidores de apoptose pode levar ao ganho de resistência a CDDP.

1.6. Modelos celulares e estudos proteômicos do câncer

Os mecanismos de resistência a CDDP e a outras drogas quimioterápicas têm sido amplamente estudados para o melhor entendimento dos processos biológicos e moleculares envolvidos na resistência ao tratamento de quimioterapia e também para o desenvolvimento de tratamentos alternativos que promovam melhores resultados e menores efeitos colaterais no tratamento contra o câncer. Muitos estudos utilizam modelos celulares (cultura de células *in vitro*) para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na resistência de tumores e, por isso, diversas linhagens celulares são amplamente utilizadas para o desenvolvimento de sublinhagens resistentes a droga de interesse (Zhang *et al.*, 2010; Mcdermott *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). Diversos protocolos para o desenvolvimento de células resistentes a partir de uma linhagem celular parental sensível a droga de interesse são propostos na literatura. O desenvolvimento de células resistentes pode resultar em modelos clinicamente relevantes ou em modelos com alto nível de resistência, o que dependerá do tratamento escolhido para a produção da linhagem resistente (Yan *et al.*, 2007; Mcdermott *et al.*, 2014;

Xavier *et al.*, 2016). Os protocolos para desenvolvimento de modelos com alto nível de resistência propõem um tratamento mais intenso no qual as células são mantidas sempre na presença da droga e com aumento gradativo de sua concentração, chegando a doses muito elevadas da droga. Neste modelo a resistência adquirida pela célula geralmente é mais estável do que a resistência apresentada pelas células desenvolvidas pelo modelo clinicamente relevante, sendo as diferenças moleculares maiores e mais fáceis de serem detectadas (Mcdermott *et al.*, 2014; Xavier *et al.*, 2016). Porém, alguns dos mecanismos de resistência ativados por este tipo de modelo de resistência podem não corresponder àqueles que ocorrem nos tumores de pacientes com câncer. Por outro lado, o modelo clinicamente relevante mimetiza o tratamento clínico, as concentrações da droga são menores e o tratamento possui um intervalo para recuperação das células em meio sem o agente quimioterápico. Desta forma, este modelo mimetiza os ciclos de quimioterapia que o paciente recebe na clínica. Entretanto, a resistência apresentada por este modelo é uma resistência instável, as diferenças moleculares podem ser menores e mais difíceis de serem detectadas/analizadas (Mcdermott *et al.*, 2014; Xavier *et al.*, 2016). Porém os mecanismos ativados por este modelo podem estar mais próximos aos encontrados em pacientes com câncer.

A partir do desenvolvimento de linhagens resistentes a CDDP, é possível utilizá-las para elucidar os mecanismos envolvidos na resistência a droga. Diversos experimentos moleculares e celulares podem ser utilizados para a comparação de processos biológicos que ocorrem em células sensíveis e resistentes a determinado quimioterápico. Entre estes métodos experimentais, podemos destacar os estudos transcritômicos, que são utilizados para a identificação de transcritos produzidos por uma célula ou organismo em determinada condição (Galluzzi *et al.*, 2014). Porém, nem todo transcrito detectado em análises transcricionais será traduzido em proteína (Seliger *et al.*, 2009). Sendo assim, os estudos proteômicos têm sido amplamente utilizados para obter informações de como uma célula ou organismo responde a determinadas condições fornecendo dados sobre a expressão gênica nesta condição (Galluzzi *et al.*, 2014). O estudo proteômico permite encontrar alvos proteicos que indiquem

o envolvimento de um mecanismo molecular específico frente a condição estabelecida. Diversos estudos têm utilizado a linhagem celular de adenocarcinoma humano A549 (Figura 8) para elucidação de mecanismos moleculares e celulares envolvidos na resistência a drogas quimioterápicas em câncer de pulmão (Kara *et al.*, 2015; Korrodi-Gregorio *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017). Estudos proteômicos já foram realizados com a linhagem A549 para detecção de proteínas expressas quando estas células são expostas a diferentes condições, como, por exemplo, infecções por vírus H9N2, exposição a dióxido de titânio e fuligem e bem como a exposição a CDDP (Vuong *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Petrovic *et al.*, 2017).

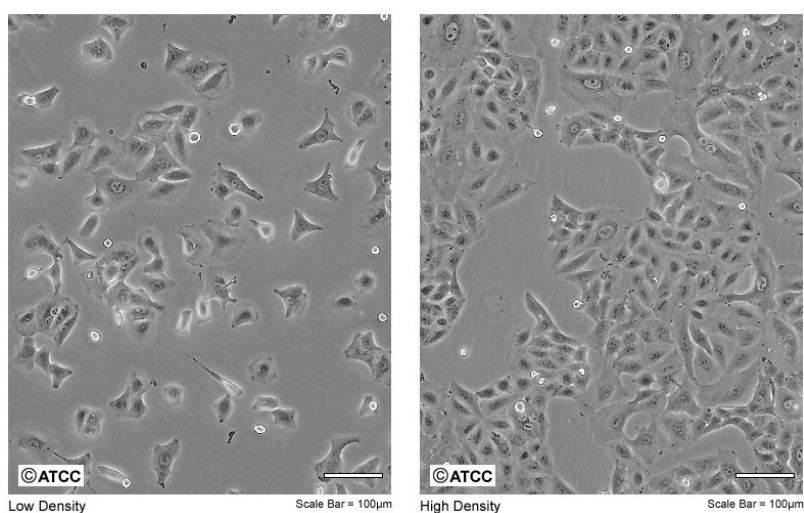


Figura 8. Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano A549. Imagem modificada de ATCC.

Apesar da molécula de CDDP ser utilizada no tratamento de quimioterapia para outros tipos de tumores, além de tumor pulmonar, poucos estudos foram realizados com o objetivo de encontrar diferenças na expressão gênica de células tumorais após o tratamento com CDDP. Li *et al.* (2007) utilizaram linhagens celulares de câncer de ovário resistentes e sensíveis a cisplatina para análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com CDDP. Neste trabalho eles foram capazes de identificar um número significativo de genes que são diferencialmente expressos entre as linhagens de câncer de ovário sensíveis e resistentes a CDDP após o tratamento com a droga, sugerindo possíveis

mecanismos envolvidos na resistência a CDDP. Bicaku *et al.* (2012) analisaram a resposta de células de câncer de ovário após o tratamento com CDDP, carboplatina ou paclitaxel, bem como carboplatina e paclitaxel juntas. Neste estudo os autores foram capazes de identificar vias comuns ativadas pelos diferentes tratamentos e que também podem estar relacionadas com a capacidade de sobrevivência do paciente. Zeng e colaboradores (2011) utilizaram células da linhagem A549 sensíveis e resistentes a CDDP para a identificação de potenciais biomarcadores associados a resistência a cisplatina. Neste trabalho os autores foram capazes de identificar nove proteínas relacionadas com a resistência a CDDP e escolheram como alvo para maiores estudos a proteína DJ-1. Kuang *et al.* (2012) estudaram possíveis biomarcadores que pudessem prever a resposta do paciente ao tratamento com cisplatina em NSCLC. Neste estudo, eles foram capazes de identificar oito proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens A549 resistente e sensível, destacando a proteína DDH2 (dihydrodiol dehydrogenase 2).

1.7. Proteínas recém-sintetizadas

Apesar de estudos proteômicos já terem sido utilizados para o estudo da resistência à cisplatina em células A549 (Zeng *et al.*, 2011; Kuang *et al.*, 2012), nenhum estudo demonstrou quais genes (mecanismos moleculares) são transcritos e traduzidos pela célula quando em contato imediato com CDDP. Diversas técnicas são empregadas com o objetivo de identificar diferenças nos perfis de expressão gênica de células em diferentes condições, como por exemplo eletroforese bidimensional (2-DE) e proteômica quantitativa utilizando meio de cultura com N¹⁴ ou N¹⁵, bem como outras técnicas para detecção de expressão diferencial de proteínas.

Como as células não são organismos estáticos e estão em constantes mudanças para que seja possível sua adaptação a diferentes condições enfrentadas, um método que fosse capaz de separar as proteínas recém sintetizadas do conjunto de proteínas já presente nas células facilitaria os estudos da dinâmica do proteoma de células em determinadas condições. A técnica

BONCAT (do inglês “*BioOrthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging*”) permite a identificação de proteínas recém-sintetizadas pelo uso de aminoácidos não-canônicos contendo um grupamento azida, o qual possibilita a posterior marcação ou captura da proteína através da ligação com grupamento alquino presente em uma “tag” ou resina (química *Click*, Figura 9) (Dieterich *et al.*, 2006). A molécula azidohomoalanina (AHA) é um aminoácido artificial análogo da metionina que possui um grupamento azida e que pode ser incorporada nas proteínas pela própria maquinaria de síntese da célula. A captura das proteínas recém sintetizadas contendo resíduos de AHA pode ser realizada utilizando, por exemplo, uma resina alquino-agarose (Figura 9).

A técnica BONCAT permite a separação das proteínas marcadas do proteoma preexistente nas células através de purificação por afinidade e posterior identificação por espectrometria de massas (MS) em tandem. A utilização da técnica BONCAT possibilita uma marcação específica de proteínas recém sintetizadas pelos organismos frente a alteração no ambiente, como por exemplo o tratamento com cisplatina. Além disso, esta técnica permite uma análise temporal e análise da dinâmica do proteoma do organismo de estudo. Esta resolução temporal é de extrema importância para a descrição das respostas imediatas das células frente a mudanças no ambiente e também importante para a identificação dos primeiros processos ativados após alguma alteração no ambiente. O uso da técnica BONCAT é uma maneira de identificar mais especificamente as alterações que ocorrem em células sensíveis e resistentes a drogas quimioterápicas, como CDDP, logo após o início do tratamento. Além disso esta técnica diminui a complexidade da amostra a ser analisada e possibilita a identificação de proteínas que anteriormente não poderiam ser identificadas por possuírem uma expressão inicial (pouca quantidade proteica) em resposta a mudança no ambiente, ou por possuírem expressão não tão significativa.

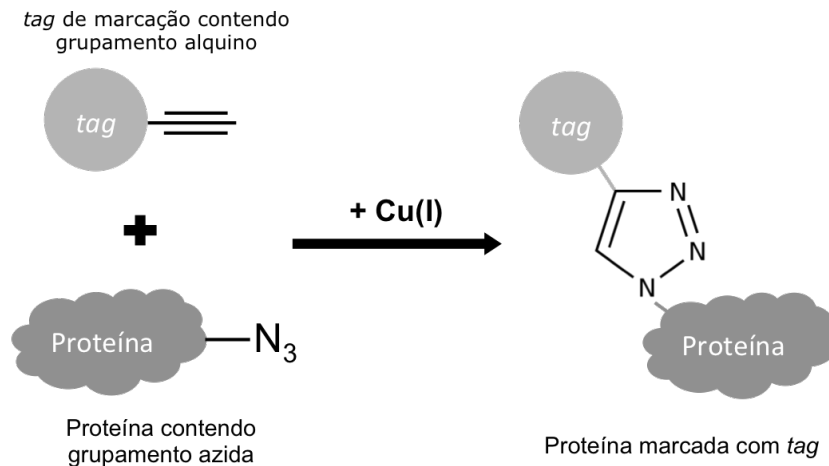


Figura 9. Processo da técnica BONCAT. Ilustração da ligação de grupamento alquino-azida na presença de cobre.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de pulmão possui uma grande incidência mundial e dentre as mortes causadas por câncer, ele é o segundo responsável no mundo. A quimioterapia é o principal tratamento deste tipo de tumor, sendo que cisplatina tem sido um dos quimioterápicos mais utilizados para o tratamento deste tipo tumoral. Contudo, diversos pacientes apresentam resistência a esta molécula o que leva ao insucesso do tratamento. Diversos mecanismos moleculares são conhecidos como mecanismos de resistência a cisplatina, porém nenhuma alternativa para o tratamento de câncer de pulmão foi desenvolvida. Muitos estudos utilizam modelos celulares para o esclarecimento do comportamento de células tumorais em resposta a drogas quimioterápicas. Além disso, linhagens resistentes a quimioterápicos também são bons materiais de estudo para melhor elucidação de mecanismos envolvidos na resistência a quimioterapia. Neste cenário, o desenvolvimento de linhagens celulares com níveis de resistência clinicamente relevantes se torna mais adequado para o entendimento dos mecanismos de resistência à quimioterápicos. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver uma linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano com nível de resistência a cisplatina clinicamente relevante e posterior

avaliação de proteínas sintetizadas em resposta ao tratamento com cisplatina. As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram caracterizadas em nível celular e proteômico. As proteínas diferencialmente expressas em resposta ao tratamento com cisplatina com potencial participação na resistência a droga e os mecanismos moleculares nos quais estas estão envolvidas foram avaliados e discutidos.

3. OBJETIVOS

Identificação de proteínas e mecanismos moleculares diferencialmente regulados em células humanas de adenocarcinoma de pulmão com diferentes sensibilidades à cisplatina em resposta ao tratamento com a droga

3.1. Objetivos específicos

Desenvolver um modelo celular com níveis clinicamente relevantes de resistência à cisplatina baseado na linhagem celular humana de adenocarcinoma de pulmão A549.

Avaliar a resposta das células sensíveis e resistentes ao tratamento com cisplatina através de análises de apoptose e dano ao DNA.

Identificar proteínas recém sintetizadas em células sensíveis e resistentes a cisplatina em resposta ao tratamento com a droga.

Identificar proteínas diferencialmente expressas entre os fenótipos celulares.

Identificar as funções moleculares, os processos biológicos e as vias de sinalização relacionadas às proteínas diferencialmente expressas entre os fenótipos celulares em resposta ao tratamento com a droga.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Nesse capítulo será apresentado o artigo científico resultante do trabalho desenvolvido durante o período de mestrado. Este artigo está no formato do periódico “Scientific Reports”. A discussão será realizada com base nas figuras aqui apresentadas. Para acesso aos materiais suplementares citados entrar em contato com a autora através do e-mail cristinedutra@hotmail.com

Proteome dynamics during cisplatin treatment in sensitive and resistant human lung cancer cells.

Cristine de Souza Dutra^{1,2}, Carolina Lumertz Martello^{1,2}, Nathan Araujo Cadore¹, Henrique Bunselmeyer Ferreira^{1,2,3}, Arnaldo Zaha^{2,3,4}, Karina Mariante Monteiro^{1,2,3*}

¹ Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Departamento de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Biociências, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

*karina@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths and its treatment is based in chemotherapy using platinum containing compounds, mainly cisplatin (CDDP). Many patients show resistance to CDDP leading to treatment failure. To understand the mechanisms involved in CDDP resistance in lung cancer, we used CDDP-sensitive (A549) and –resistant (A549/CDDP) cells and bioorthogonal noncanonical amino acid tagging to identify newly synthesized proteins in temporal response to CDDP exposure. We identified 173 and 136 proteins regulated by CDDP in A549 and A549/CDDP cells, respectively. It was possible to identify proteins relate to several distinct molecular mechanisms involved in CDDP response, including alternative splicing, response to oxidative stress, telomere maintenance, apoptosis regulation and cytoskeleton reorganization. Our results showed that A549/CDDP cells are less susceptible to DNA damage caused by CDDP, and also are able to express proteins that combat the reactive oxygen species generated in response to CDDP. In addition, CDDP induces different apoptotic pathways in drug-sensitive and resistant cell, with the activation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathway in A549 and A549/CDDP cells, respectively. So, our study provided evidence of proteins and pathways that could be targets for new therapies to overcome tumor resistance.

1. Introduction

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. In this scenario, lung cancer has a high incidence on the world population and it is the leading cause of cancer-related deaths. In 2015, lung cancer was responsible for approximately 1.7 million deaths worldwide. Since the disease is usually diagnosed in advanced inoperable stages, the main treatment of lung cancer is based on chemotherapy using platinum derived agents, such as cisplatin¹. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum, CDDP) is one of the main chemicals used to treat lung cancer as well as other types of tumors, such as head and neck, ovarian and breast cancers¹⁻³. The cisplatin is toxic to the cells because it is able to form inter- and intrastrands adducts on DNA purine bases, blocking the replication and transcription processes, which ultimately result in cell death⁴. CDDP can also induce the production of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress that can lead to cell death^{4,5}.

Cancer cells from many patients show resistance (intrinsic or acquired) to chemotherapy with cisplatin, which is the main cause of treatment failure¹. Cisplatin resistance is complex and involve the modulation of multiple molecular pathways⁶. Molecular mechanisms of cisplatin resistance include changes in cellular influx/efflux of the drug, detoxification by thiol-containing proteins, effective mechanisms of DNA repair and alterations in the expression levels of proteins involved in apoptotic pathways^{4,6}.

Cell lines are widely used to study drug resistance in cancer cells⁷⁻⁹. Cellular models allow comparative studies on gene expression between drug-sensitive and resistant cells and between cells before and after drug treatment¹⁰⁻¹². Although laboratory cell lines with high levels of drug resistance are the cellular models of choice for *in vitro* studies of drug resistance, as they have stable resistance over time and to freeze/thawing cycles, these cells have generated results of limited clinical relevance^{8,13}. Thus, clinically relevant resistant cell lines, which simulate resistance levels observed in tumor cells isolated from patients before and after chemotherapy, appear as important alternative study tools. These cellular models may generate results that are more applicable to a clinical scenario, although presenting disadvantages regarding their *in vitro* maintenance

and analysis, which include unstable resistance, low levels of drug resistance and subtle molecular changes⁸.

Proteomic approaches are powerful tools to assess protein expression changes in response to diverse stimuli, including drug treatment^{4,14,15}. Cellular proteomics have been successfully used to study resistance to chemotherapy in several types of cancer^{16–18}. However, the specific analysis of the proteins synthesized by the cells in response to drug treatment is essential to provide a temporal dynamic view of proteome changes induced by chemotherapy^{19,20}.

To better understand the molecular mechanisms controlling the immediate response of cancer cells to chemotherapy exposure, we generated a clinically relevant cisplatin-resistant cellular model from A549 human lung cancer cells and used bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT)¹⁹ in conjunction with LC-MS/MS to selectively label, purify and identify proteins synthesized by drug-sensitive and resistant cells during early response to cisplatin. We identified several proteins that could be involved in the adaptation of cancer cells to CDDP exposure. The proteins regulated in CDDP-resistant and –sensitive cell lines were involved in many different mechanism, including response to oxidative stress, regulation of telomere maintenance and alternative splicing. These identified mechanisms and proteins can be a potential target to overcome the resistance of chemotherapy and also can serve as biomarkers of chemotherapy response.

2. Results

2.1. Cisplatin-resistant lung cancer cells display clinically relevant levels of drug resistance and morphological alterations

We established a cisplatin-resistant cell subline (A549/CDDP) from parental A549 human lung cancer cells using a continuously stepwise exposure to increasing, low concentrations of CDDP (0.1 – 0.5 μM) during 15 days. After 5 rounds of treatment, A549/CDDP cells showed a GI_{50} (50% growth inhibition) of $\sim 15 \mu\text{M}$, resulting in a 3-fold increase in cisplatin resistance compared with their parental A549 cell line ($\text{GI}_{50} = \sim 4.5 \mu\text{M}$) (Fig. 1A). As expected for a clinically relevant cellular model, in addition to low levels of drug resistance, A549/CDDP cells showed unstable cisplatin resistance, returning to resistance levels of the parental cell line after approximately one month in drug-free medium (data not shown). Therefore, A549/CDDP cells were maintained in culture medium containing 0.5 μM of cisplatin to ensure maintenance of the resistant phenotype and removed 3 days before the experiments. The acquisition of cisplatin resistance was accompanied by morphological changes in A549/CDDP cells, including cell elongation and membrane protrusions, resulting in a fibroblast-like morphology, in contrast to the more rounded shape displayed by parental A549 cells (Fig. 1B).

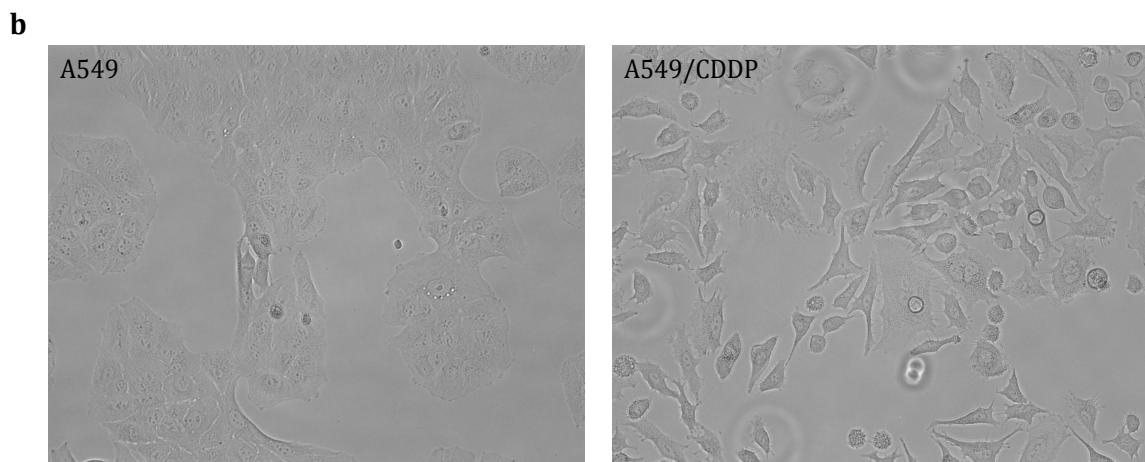
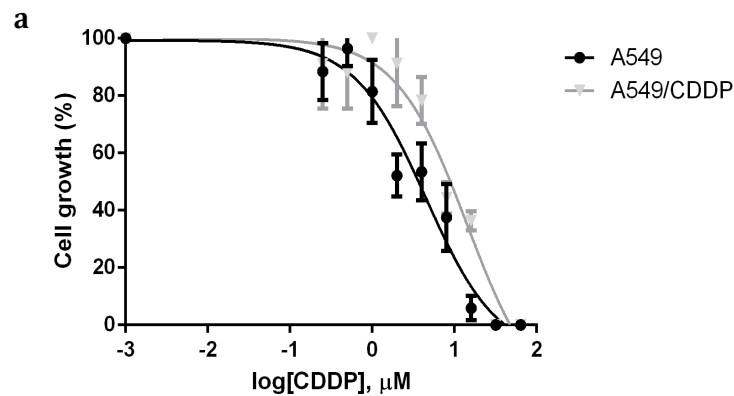


Figure 1. Clinically relevant cisplatin-resistant A549 cells display low levels of drug resistance and morphological changes. (a) Growth curves of A549 and A549/CDDP in presence of different concentration of cisplatin. Values represented the mean \pm SD from triplicate samples. (b) Representative images of cellular morphology of A549 and A549/CDDP cells. The image was obtained using EVOS FLoid with 460x magnification.

2.2. Short exposure to CDDP causes DNA damage in sensitive and resistant cells.

Since DNA is the primary target of the CDPP, we characterized the early effects of the drug in A549 and A549/CDDP cells evaluating the DNA damage induced by a short-term exposure to CDDP using H2Ax phosphorylation kinetics. The cells were treated with their respective GI_{50} of CDDP and the DNA damage was evaluated 2, 4 and 8 h after treatment. The percentage of A549 and A549/CDDP cells positive to γ -H2AX showed a statistically significant increase after CDDP treatment in all incubation times analyzed (Fig. 2A). Although, the percentage of DNA damage caused by equitoxic doses of cisplatin did not show statistical difference between sensitive and resistant cells, it was possible to

observe that the sensitive cells accumulated more DNA damage over time. In contrast to resistant cells, A549 cells showed a statistically significant increase in DNA damage 8 h after CDDP exposure (Fig. 2B). As CDDP-induced DNA damage may lead to apoptosis, we tested whether the drug treatment was able to induce apoptosis in A549 and A549/CDDP cells during the short exposure times used in our experimental conditions. As expected, both cell lines showed very low percentage of apoptotic cells (~4%) during the time course of the experiment, with no statistically significant differences between cell types, drug exposure or incubation times (data not shown).

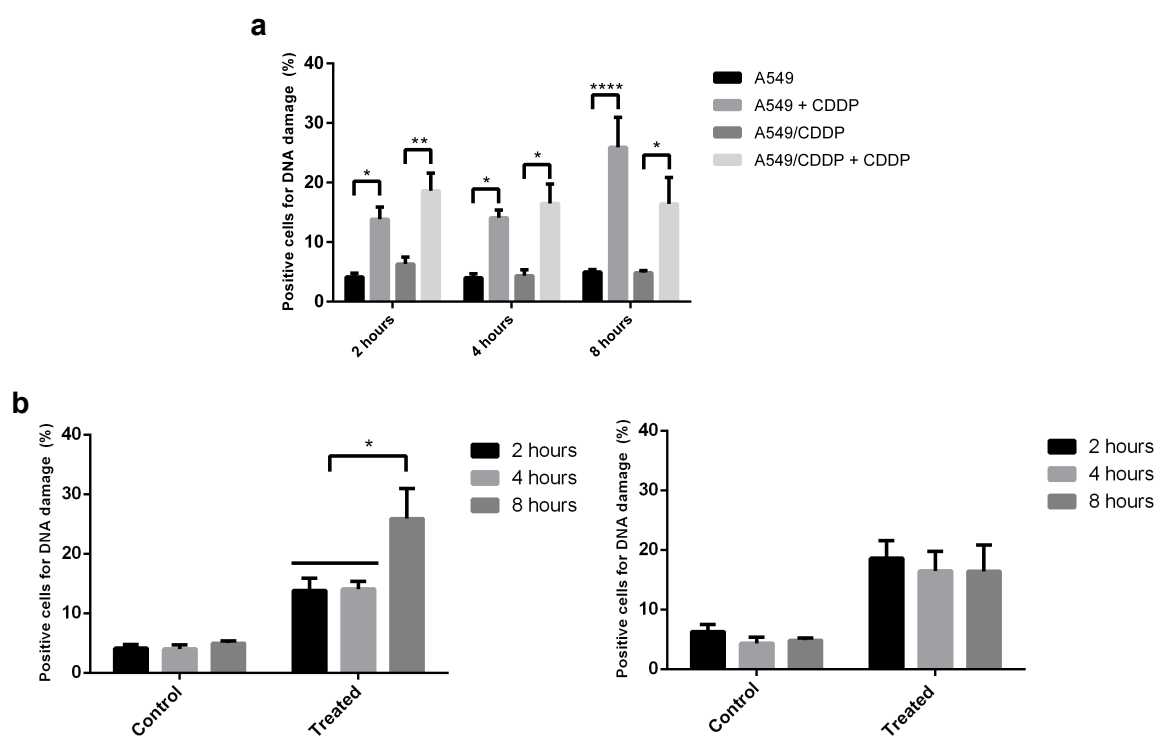


Figure 2. DNA damage caused in A549 and A549/CDDP cells by short-term exposure to CDDP. DNA damage was measured by flow cytometry using antibodies anti- γ -H2Ax and PI. (a) A549 and A549/CDDP cells were treated with their respective GI_{50} of CDDP for 2, 4 and 8 h. (b) Temporal DNA damage analysis in untreated (control) and CDDP-treated A549 (left) and A549/CDDP (right) cells. Each experiment was carried out in triplicate; the statistical analysis was done using Two way ANOVA; error bars represent SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$.

2.3. CDDP induce the expression of different sets of proteins in A549 and A549/CDDP cells.

We used bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT) and LC-MS/MS to measure temporal proteome changes induced by short exposure to CDDP in A549 and A549/CDDP cells. The methionine analogue azidohomoalanine (AHA) was used to selectively label proteins synthesized by the cells in response to CDDP treatment and an alkyne agarose resin was employed to capture azide-containing newly synthesized proteins by *click* chemistry^{21,22}. The cells were treated with their respective GI_{50} of CDDP or with NaCl 0.9% (untreated control cells) and the azide-containing proteins synthesized by the cells in 2, 4 and 8 h of incubation were specifically purified and analyzed by LC-MS/MS. Our proteomic approach allowed the total identification (treated and untreated cells) of 122, 217 and 111 proteins synthesized by A549 in 2, 4 and 8 h of exposition, respectively; and 118, 183 and 183 proteins synthesized by A549/CDDP in 2, 4 and 8 h of treatment, respectively, resulting in a total of 251 unique proteins (Supplementary Tables S1 and S2). The total number of proteins identified in each condition is shown in Figure 3. It is noteworthy that the protocol to A549/CDDP cell development was applied three times independently and the resultant cells were considered biological replicates. In proteomic experiments, only protein identifications based on at least two peptides and confirmed in at least two out of these three replicates were considered in order to improve confidence and reproducibility. These stringent criteria were adopted in order to identify proteins and molecular mechanisms consistently involved in CDDP resistance and cellular response.

T-test was used to identify proteins with differential abundance between CDDP-treated and control cells in each drug exposure time. In A549, 54, 69 and 50 proteins were found differentially abundant after 2, 4 and 8 h of CDDP treatment, respectively (Fig. 3 and Supplementary Table S3). Forty-one, 50 and 45 proteins were found with altered expression in A549/CDDP cells after 2, 4 and 8 h of CDDP exposure, respectively (Supplementary Table S4). In A549, alpha-actinin-4, annexin A1 and profilin-1 are upregulated and were previously related with cytoskeletal organization and cancer development. Proteins downregulated

by CDDP treatment include proteins involved in splicing, such as several heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and spliceosome RNA helicase DDX39B. Proteins related to cell stress response, including heat shock proteins, were also identified as downregulated in A549 cells. On the other hand, in A549/CDDP cells, proteins upregulated by CDDP exposure include proteins involved in unfolded protein response and protective role against oxidative stress, including endoplasmic reticulum proteins, such as protein disulfide-isomerases, calnexin and endoplasmic reticulum resident protein 29. Proteins related to translation were also upregulated by CDDP in A549/CDDP, as well as proteins involved in splicing. In contrast, proteins involved in protein transport and trafficking are downregulated, including programmed cell death 6-interacting protein and prosaposin.

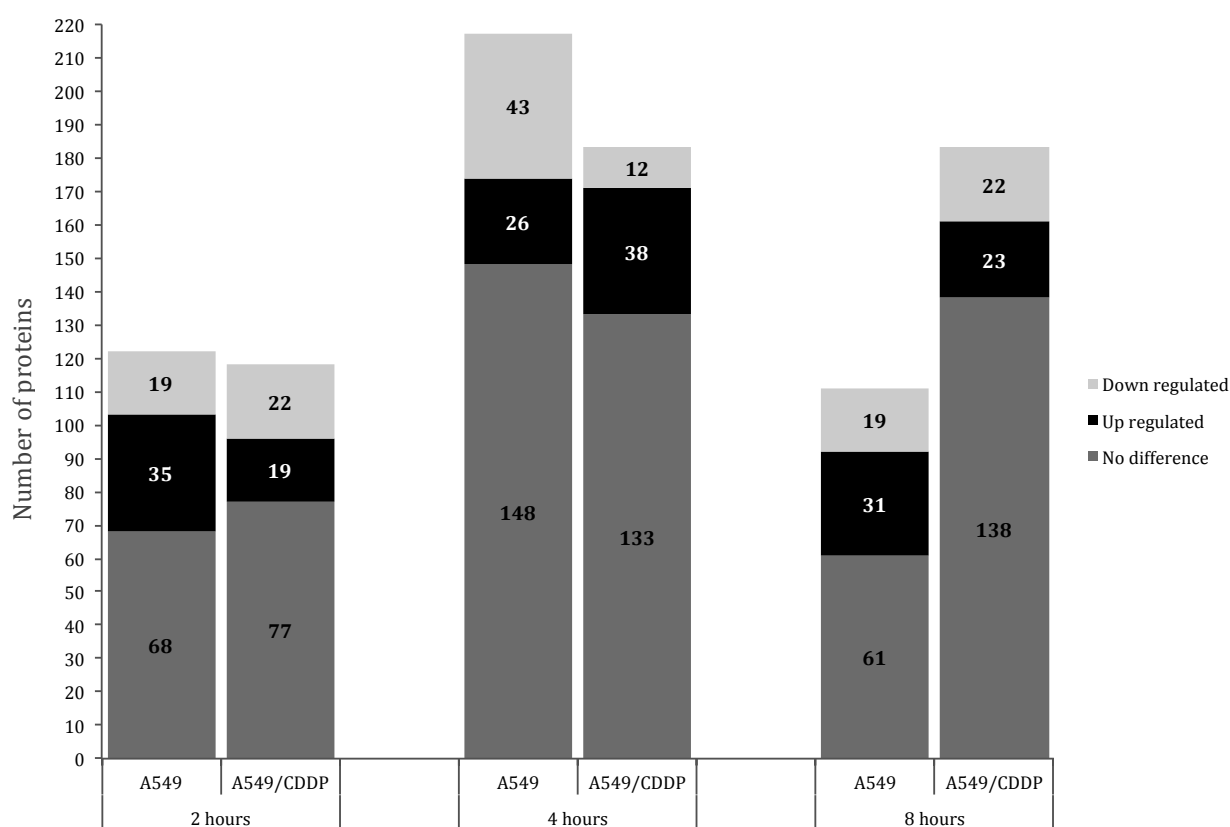


Figure 3. Total number of identified proteins in A549 and A549/CDDP cells in each time point of treatment. The proteins were identified by LC-MS/MS and the differentially abundant proteins were identified after T-test. Proteins that did not present statistical differences are represented by dark grey color, proteins upregulated after CDDP treatment are represented by black color and proteins downregulated by CDDP are represented by light grey.

Although the stringent criteria adopted in our experimental design generate more reliable and consistent results, it is possible that we have lost some proteins potentially involved in CDDP response. For example, proteins detected in only two replicates have lower mean quantitative values, which may have resulted in non-statistically significant differences when CDDP-treated and untreated cells were compared. Thus, we performed a hierarchical clustering using protein Log₂ fold-change (FC) values in order to identify proteins with relevant expression profiles, even with non-statistically significant results. From this approach, it was possible to identify a total of 16 and 17 clusters of protein expression profiles for A549 and A549/CDDP cells, respectively (Fig. 4A and Fig. 5A, Supplementary Tables S5).

In A549, clusters 4, 5, 6, 8 and 9 include proteins upregulated by CDDP treatment in different times. Clusters 4 and 6 represent proteins upregulated after 8 h of CDDP treatment, including glutathione S-transferase P (cluster 4) and vinculin (cluster 6). The cluster 5 represents proteins downregulated after 2 h and upregulated after 4 h of CDDP exposure. In this cluster, all proteins were identified with expression statistically different from control cells after 2 h of CDDP exposure, but only transaldolase had statistically significant difference after 4 h of CDDP treatment. Cluster 8 presents proteins upregulated in the final time of CDDP treatment; among these proteins we found stress-induced-phosphoprotein 1 and peroxiredoxin-6. Cluster 8 is composed by 10 proteins, all of them are upregulated by CDDP after 8 h of CDDP exposure, but 5 of them did not show expression statistically different after 4 h of treatment. Cluster 9 present proteins upregulated in the initial and final times of CDDP treatment, including DnaJ homolog subfamily A member 1 and reticulon-4. In addition, cluster 12, 14 and 16 are composed by proteins downregulated by CDDP treatment (Fig. 4B). Proteins additionally identified by our hierarchical clustering approach as downregulated by exposure to CDDP include ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (cluster 12) and T-complex protein 1 subunit alpha (cluster 15).

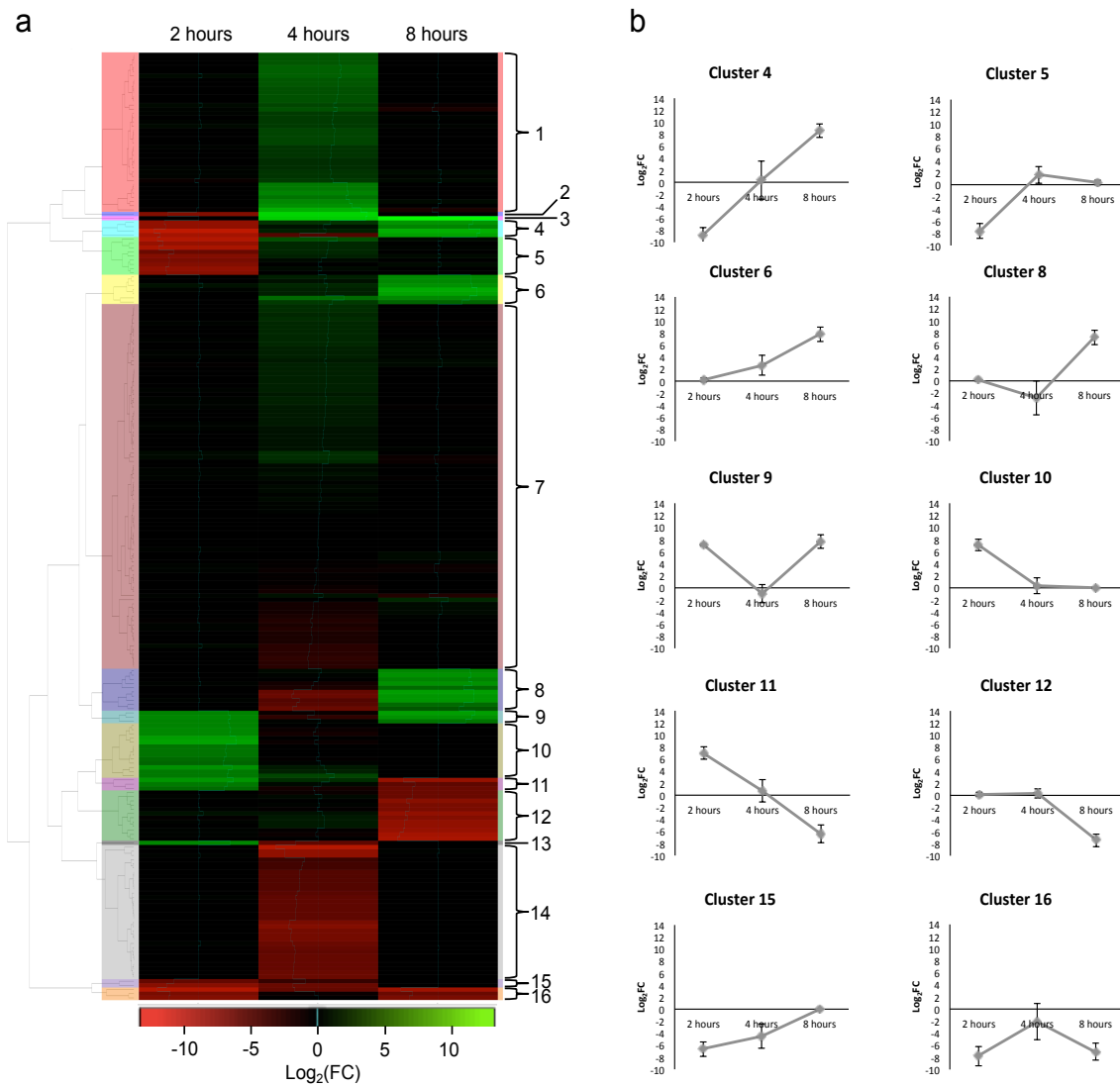


Figure 4. Expression clustering of identified proteins in A549. The clustering of proteins identified in A549/CDDP cells resulted in a total of 16 clusters (a). The expression profiles of some clusters are represented in (b). The expression clustering was made using the $\text{Log}_2(\text{FC})$ value and using RStudio software. FC = Fold Change.

In A549/CDDP cells, cluster 3 represents proteins with high expression during all CDDP treatment; cluster 6 represent proteins upregulated after 4 and 8 h of CDDP treatment; and cluster 4 represent proteins with expression induced only 8 h after treatment with the drug (Fig. 5B). Among these proteins, protein disulfide-isomerase (P4HB) in cluster 3 present high expression during all CDDP exposure time. T-complex protein 1 subunit gamma, Rab GDP dissociation inhibitor beta and calmodulin present high expression profiles only after 8 h of CDDP treatment, all present in cluster 4. It is interesting to highlight the protein peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (PPIB), which is present in cluster 6 with high expression after CDDP exposure but did not show statistical difference in t-test analysis. In addition, protein disulfide-isomerase A4, prostaglandin reductase 1 and voltage-dependent anion-selective channel protein were also grouped in this same cluster with high expression after 8 h of CDDP treatment, but they did not show statistical difference in expression-test analysis.

On the other hand, proteins with lower expression at all time points of CDDP exposure are represented in cluster 11. Clusters 13 and 14 represent proteins downregulated after 8 h of CDDP treatment and cluster 17 represent proteins with downregulation only after 4 h of CDDP incubation (Fig. 5B). Proteins additionally identified by our hierarchical clustering approach as downregulated by CDDP exposure in A549/CDDP cells include ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (cluster 11) and probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (cluster 14). Matrin-3 (cluster 13) and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (cluster 14) were downregulated after 8 h of CDDP treatment, while prosaposin (cluster 14) were downregulated after 4 and 8 h of CDDP exposure. The cluster 14 are composed by 20 proteins and 14 of them did not present statistical difference in t-test analysis, but their expression profiles showed downregulation after drug treatment. Among these proteins, we found alpha-actinin-4, histone H3.2 and 14-3-3 protein zeta/delta.

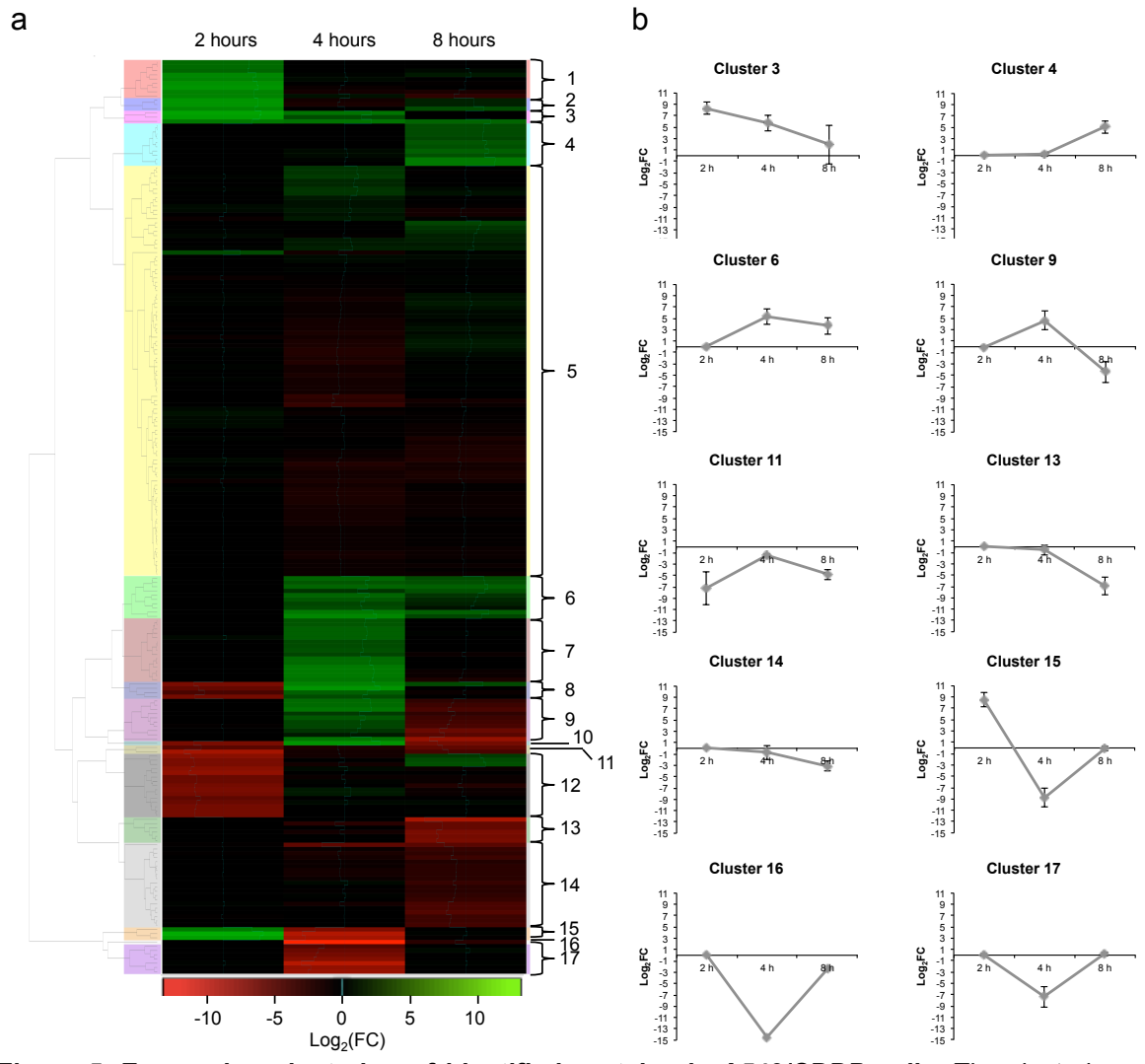


Figure 5. Expression clustering of identified proteins in A549/CDDP cells. The clustering of identified proteins in A549/CDDP cells resulted in a total of 17 clusters (a). The expression profiles of some clusters are represented in (b). The expression clustering was made using the $\text{Log}_2(\text{FC})$ value and using RStudio software. FC = Fold Change.

2.4. Proteins regulated by CDDP exposure in A549 and A549/CDDP cells are involved in distinct biological processes and molecular functions.

Functional enrichment analyses were performed for proteins regulated during CDDP exposure in A549 and A549/CDDP cells in order to better understand the molecular mechanisms underpinning CDDP response in drug-sensitive and resistant cells. Proteins with differential abundance between CDDP-treated and untreated cells (exclusive proteins and proteins with statistically significant difference in abundance $p \leq 0.05$), in each time point, were submitted to functional enrichment analysis according to GO terms. The GO grouping was constructed according terms and genes similarities. The results are summarized in Figures 6 and 7 and in Supplementary tables S6 and S7.

The protein profiles of both A549 and A549/CDDP were very dynamic during the early CDDP exposition and the GO terms identified reflect the diversity of molecular processes activated during the CDDP response of these cells. In A549, proteins related to endoplasmic reticulum (ER) chaperone complex and cytoskeleton are enriched after 2 h of CDDP treatment, while proteins related to splicing were downregulated after 4 h of CDDP treatment. Pseudopodium, podosome and double-strand RNA binding were ontologies found upregulated after 8 h of CDDP exposure. GO terms related to regulation of stress-activated protein kinase (SAPK) signaling cascade were found enriched after 8 h of CDDP treatment, while regulation of telomere maintenance was downregulated. Cell-cell adhesion was upregulated in 2 and 4 h after CDDP treatment and mechanisms related to apoptosis (extrinsic apoptotic signaling pathway and apoptotic cell clearance) were upregulated during all CDDP incubation.

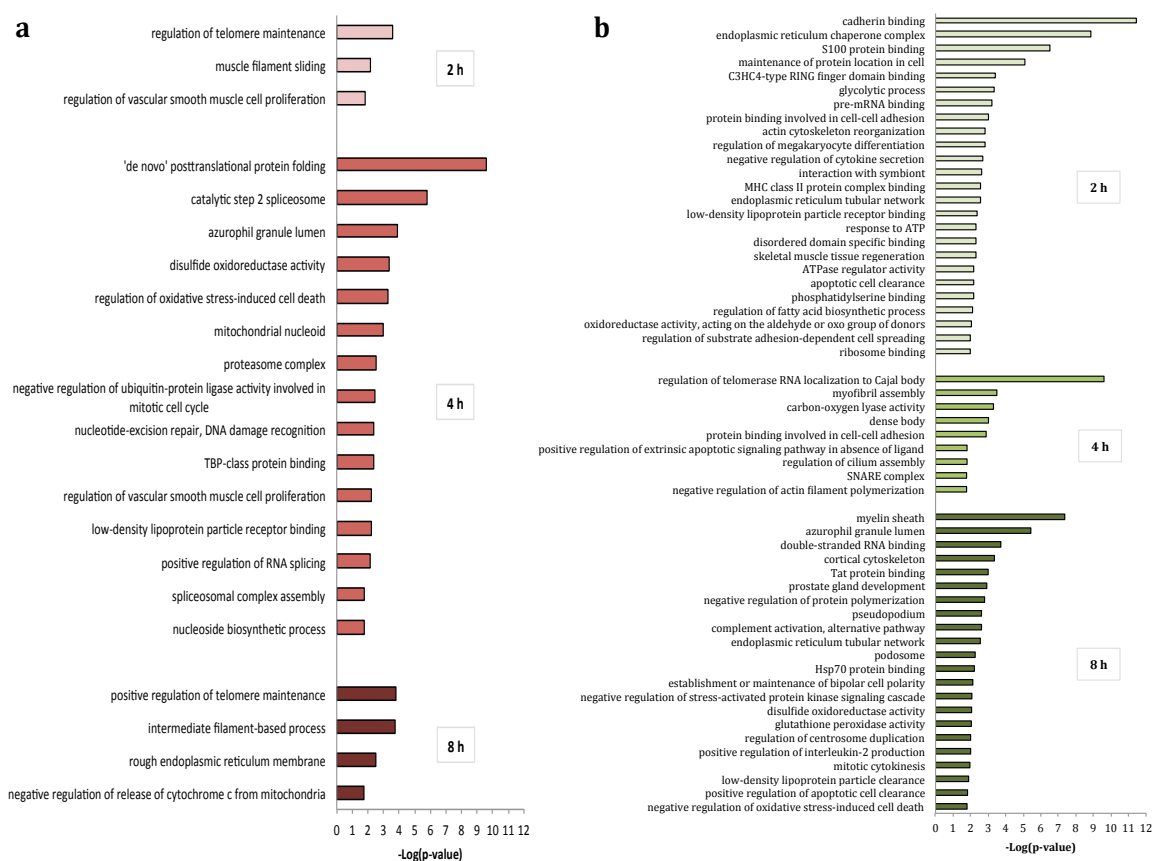


Figure 6. Gene ontology analysis related to CDDP regulated proteins in A549 cells. The bar charts represent the value of $-\text{Log}(p\text{-value})$ for each gene ontology group. Gene ontology terms related to downregulated proteins are shown in red (a) and the terms related to proteins upregulated by CDDP are represented in green (b). The bars are represented in 3 categories: 2 (light red/green), 4 (medium red/green) and 8 hours (dark red/green) of CDDP exposition. The gene ontology clustering was done using ClueGO.

In A549/CDDP cells, intramolecular oxidoreductase activity was found overrepresented during all CDDP response. GO terms related to protein import into nucleus were enriched after 2 h of CDDP treatment. The 4 h of CDDP treatment resulted only in upregulated categories for A549/CDDP cells, as downregulated proteins did not achieve the necessary criteria for gene ontology identification. GO terms found enriched in 4 h of CDDP treatment include the regulation of mitophagy, regulation of ER stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway, unfolded protein binding, regulation of ER stress, and regulation of oxidative stress-induced cell death, the latter also overrepresented after 8 h of CDDP incubation. Finally, regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway was overrepresented in A549/CDDP cells after 8 h of drug exposure,

while positive regulation of exosomal secretion was downregulated.

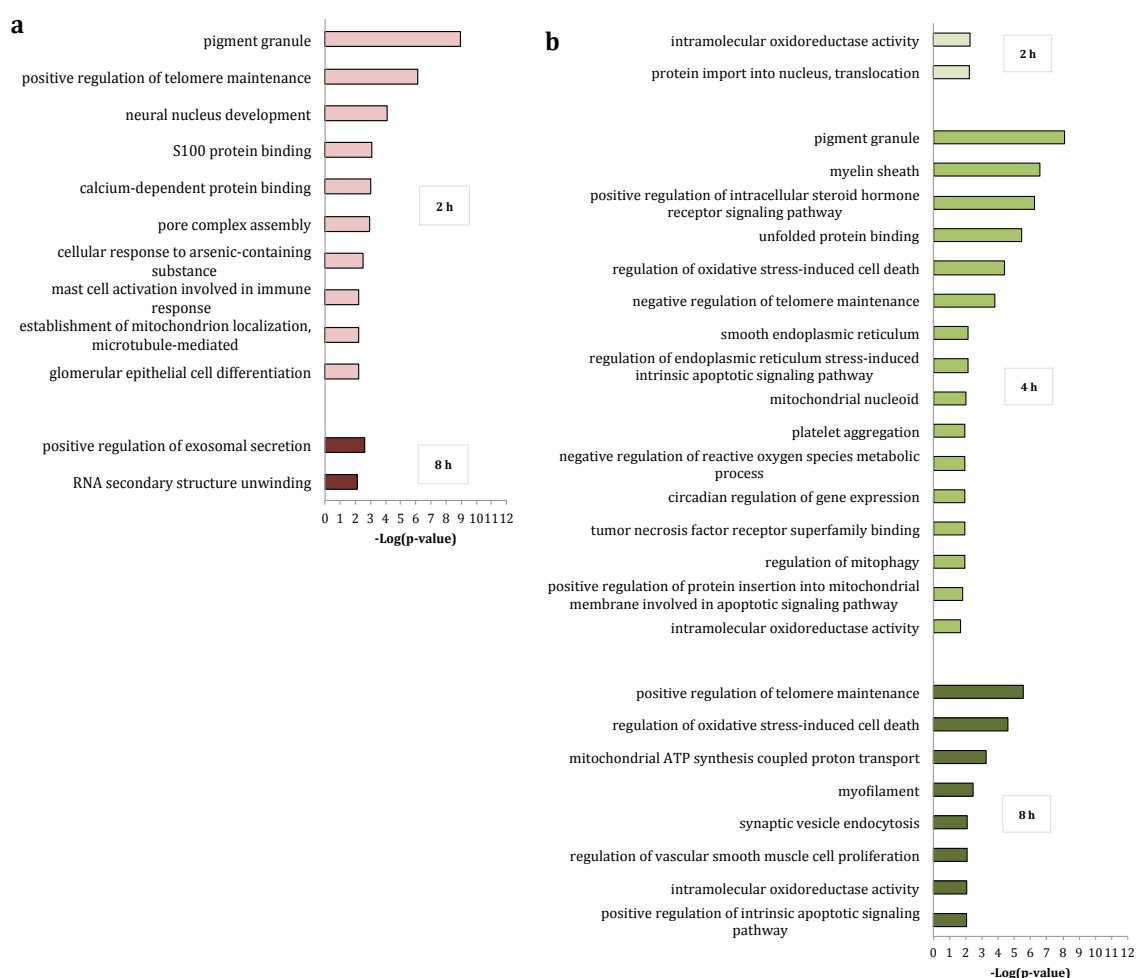


Figure 7. Gene ontology analysis related to CDDP regulated proteins in A549/CDDP cells. The bar charts represent the value of $-\text{Log}(p\text{-value})$ for each gene ontology group. Gene ontology terms related to downregulated proteins are shown in red (a) and the terms related to proteins upregulated by CDDP are represented in green (b). The bars are represented in 3 categories: 2 (light red/green), 4 (green) and 8 hours (dark red/green) of CDDP exposition. The gene ontology clustering was done using ClueGO.

3. Discussion

Nowadays, the resistance to cisplatin is one of the main problems related to lung cancer treatment, as well as other cancer types treatment. Therefore, it is important to understand which mechanisms are involved in cisplatin resistance. Then, the analysis of early protein dynamics after CDDP treatment is essential to elucidate molecular mechanisms that are selected to give rise to resistant cells. The study of proteomic response to cisplatin is also relevant to the identification of

potential protein targets to development of therapeutic strategies to block drug resistance pathways. Thus, in this study, we used a clinically relevant resistant cellular model from A549 human lung adenocarcinoma and BONCAT to measure temporal proteome changes in response to short exposure to CDDP. Our data allowed us to have a comprehensive view about cellular proteome dynamics after CDDP treatment in drug-sensitive and -resistant cells, providing insights about molecular mechanisms that mediate CDDP resistance in lung cancer cells.

It is known that cisplatin causes DNA crosslinks which affects all process linked to DNA, including replication and transcription, mechanisms that are impaired resulting in apoptosis^{4,5}. Since we have used a short exposure time to cisplatin in our experimental design, we did not detect significant rates of apoptosis during the time course of the experiment. However, our proteomic data revealed the activation of different mechanisms of apoptosis in A549 and A549/CDDP cells. Proteins involved in the regulation of extrinsic apoptotic pathway were found upregulated in A549 cells, while proteins involved in the regulation of intrinsic apoptotic pathway were detected upregulated in A549/CDDP cells. Among these proteins, the serine/threonine-protein phosphatase 2A (PPP2R1A) and receptor of activated protein C kinase 1 (RACK1) were identified; PPP2R1A is involved in the extrinsic apoptotic pathway and RACK1 in intrinsic apoptotic pathway. The anticancer chemotherapy is able to activate the intrinsic and/or extrinsic apoptosis pathway²³. The extrinsic apoptotic pathway occurs through transmembrane receptors, including death receptors members of tumor necrosis factor (TNF) superfamily, like CD95²⁴. On the other hand, the intrinsic apoptotic pathway is activated by several non-mediated receptor stimuli, these stimuli are able to directly activate their target molecules within the cells²⁴. CDDP already was identified inducing both intrinsic and extrinsic pathways²³. Besides the identification of intrinsic (mitochondrial mediated) apoptotic pathway, mitophagy (mitochondrial autophagy) was also detected upregulated in A549/CDDP cells. Mitochondria can induce cell death in response to changes in the intracellular environment; however, cells can degrade dysfunctional mitochondria to defend their survival²⁵. Mitophagy is already known to have role in cisplatin resistance, since it promotes the cell survival in response to stresses^{26,27}. Since A549 and

A549/CDDP can possibly activate distinct mechanisms of cell death in response to CDDP, these pathways could be targets for new treatments to overcome the tumor resistance.

As mentioned above, the cisplatin is able to cause DNA damage in the cells due to DNA crosslink formation. The A549 and A549/CDDP cells showed higher DNA damage in response to CDDP exposure in all evaluated incubation times in comparison with non-treated control cells. Differently of A549/CDDP cells, A549 cells seem to accumulate higher percentage of DNA damage over time. This result suggest that A549/CDDP cells could have a more efficient DNA damage repair machinery, since DNA repair is among the mechanisms of chemotherapy resistance²⁸⁻³⁰. We found proteins related to DNA damage repair, such as UV excision repair protein RAD23 homolog B and ubiquitin-60S ribosomal protein L40, downregulated after 4 h of CDDP exposure in A549 cells, suggesting that the DNA damage response could be impaired in these cells upon CDDP treatment.

Although DNA is the main target of cisplatin, only a small fraction of CDDP actually interact with DNA, therefore, there are other cytotoxic effects caused by cisplatin, including oxidative stress³¹. CDDP can cause oxidative stress^{5,32} and it is also known that it can cause ER stress³³⁻³⁶. Response of oxidative stress and response to unfolded proteins were identified to be involved in drug resistance of several types of tumors³⁷⁻⁴¹, and were detected in our study as well. At this context, we highlight the protein prolyl 4-hydroxylase beta polypeptide (P4HB), a disulfide-isomerase (PDIA1), which was detected upregulated in A549/CDDP cells in all CDDP exposure times and downregulated by CDDP in A549 cells after 2 h of treatment. Protein disulfide-isomerase A4 (PDIA4) and A6 (PDIA6) were also upregulated by CDDP in A549/CDDP after 2 h and 4 h of CDDP treatment, respectively. In A549 cells PDIA6 was upregulated after 2 h of CDDP exposure and downregulated after 4 h. These proteins are usually found in ER and act as chaperone in response to unfolded proteins and also function as disulfide isomerase/oxidoreductases⁴²⁻⁴⁴. PDIA1, PDIA4 and PDIA6 were already found involved in cancer cell resistance in several types of tumor⁴⁵⁻⁴⁸. Therefore, these proteins identified as upregulated in response to CDDP treatment in A549/CDDP

cells can reduce the damage caused by reactive oxygen species and possibly have an important role in CDDP resistance observed in these cells.

Many GO terms related to cytoskeleton reorganization were found upregulated after CDDP exposure in A549 cells, including pseudopodium, podosome, cell spreading, actin filament polymerization and actin cytoskeleton reorganization. Among these proteins, we highlighted vinculin (VCL), moesin (MSN) and vimentin (VIM), a known mesenchymal marker⁴⁹. These molecular mechanisms are observed during epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process that is known to play an important role in cancer progression and drug resistance^{50,51}. Although these processes were found upregulated in A549, the EMT morphological features (cell elongation and membrane protrusions) were observed for A549/CDDP cells. Therefore, these cellular and molecular processes activated in response to CDDP treatment in A549 cells may be positively selected during the establishment of drug resistance subline. Studies have shown that ER stress could be involved in EMT induction^{52,53}. Since CDDP can cause ER stress, the EMT and other survival responses could be selected by the cells to overcome CDDP cytotoxicity.

The oxidative stress caused by CDDP is due to the generation of reactive oxygen species (ROS) when CDDP is in the cells. These molecules can be deleterious to several mechanisms, so the cells need to maintain the correct balance of ROS in order to survive⁵⁴. Since CDDP induces the production of ROS, it is important for the cell to decrease its intrinsic ROS production. In our work, proteins related to the GO term 'negative regulation of ROS metabolic process', including heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (TRAP1) and voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1), were found enriched in A549/CDDP cells after 4 h of CDDP exposure. In oxidative stress, TRAP1 can be phosphorylated and then blocks the generation of ROS, probably because of blocking of the mitochondrial permeability⁵⁵. VDAC1 is located at outer mitochondrial membrane and is proposed to mediate the transport of ROS release from mitochondria to cytosol⁵⁶. Therefore, these proteins could be used by the A549/CDDP cells to combat the ROS induced by CDDP treatment.

The telomere is composed of DNA repeats 5'-TTAGGG-3', which is a good target for CDDP crosslink, since the most common DNA adducts formed by CDDP is 1,2-intrastrand d(GpG) crosslink and 1,2-intrastrand d(ApG) crosslink⁵⁷. When telomere is critically shortened the normal cells do not divide anymore, become senescent and die. In contrast, in cancer cells the telomere length maintenance is upregulated, leading the cells to apparently unlimited capacity of growth^{58,59}. Therefore, the telomere maintenance is important to cancer development and drug resistance⁶⁰⁻⁶³. Functional categories related to telomere maintenance were detected in A549 and A549/CDDP cells, mainly because proteins members of TRiC (TCP-1 Ring Complex) were identified as dynamically regulated by CDDP in both cell lines. This complex is responsible for telomerase right location and, consequently, for telomere elongation⁶⁴. So, if the expression of these proteins is affected, the telomere maintenance can be impaired. Our results showed that this mechanism was dynamically affected by CDDP in both cell lines, and the last response to CDDP exposure was different between A549 and A549/CDDP cells, since the positive regulation of telomere maintenance was down regulated and up regulated after 8 h of CDDP, respectively.

CDDP can also bind RNA molecules instead of DNA, thus CDDP-RNA crosslink can impair the splicing mechanism⁶⁵. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) A1, M and F were detected downregulated in A549 cells after 4 h of CDDP treatment, as well as serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) and spliceosome RNA helicase DDX39B. The role of hnRNPs is to interact and regulate the fate of components required for pre-mRNA processing⁶⁶, while SRSF1 is responsible for splice site recognition⁶⁷. It is know that cisplatin can inhibit the pre-mRNA splicing and when this process is impaired there is a decrease of the proteome diversity and, consequently, of the capability of adaptation to different physiological situations^{65,68,69}. Therefore, impaired splicing observed in A549 cells may play a negative role in the adaptation and survival of these cells in cisplatin-containing medium.

Mechanisms involved in cancer drug resistance are still unclear, so more studies are needed to identify molecular pathways and proteins related to drug resistance. To our best knowledge, this was the first work to employ BONCAT

technology to study proteome dynamics in response to CDDP in drug-resistant and –sensitive cancer cells. In this way, we were able to identify proteins and mechanisms regulated in response to CDDP exposure in CDDP-sensitive and resistant cells. We highlight proteins that could be potential biomarkers of CDDP response and interesting targets to cancer therapeutics.

4. Methods

4.1. Cell culture and cisplatin treatment

Human lung cancer cell line A549 was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The cells were maintained in a humidified incubator of 5% CO₂ at 37 °C. The cisplatin-resistant subline A549/CDDP was generated by continuously exposing 5x10⁵ A549 cells to increasing concentration of CDDP (in 0.9% NaCl) (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 µM) for 72 h each. The GI₅₀ for cisplatin was measured by sulforhodamine B assay⁷⁰. The A549/CDDP subline was maintained in culture medium containing 0.5 µM of cisplatin to maintenance of the resistant phenotype and cultured in drug-free medium at least 3 days before the experiments. CDDP-resistant sublines were independently generated three times, which were considered biological replicates in all experiments performed.

4.2. DNA damage analysis

A549 and A549/CDDP cells were seeded in a 6-well plate at a density of 1x10⁶ cells per well. After overnight adhesion, the cells were treated with their respective GI₅₀ of CDDP (4.5 µM for A549 and 15 µM for A549/CDDP) for 2, 4 and 8 h. The DNA damage was assessed by H2Ax phosphorylation using flow cytometry (anti γ-H2AX as primary antibody and anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugate as secondary antibody), essentially as described⁷¹.

4.4. Protein extraction and sample processing for mass spectrometry analysis

A549 and A549/CDDP cells (3×10^5) were seeded in 6-well plates and allowed to adhere overnight. For metabolic labelling, cells were starved of methionine by 1-h incubation with RPMI 1640 medium without methionine and absence of fetal bovine serum. After the incubation, the methionine analogous, azidohomoalanine (AHA, 1 mM), was added to medium and then the cells were incubated for 2, 4 or 8 h in absence or presence of CDDP (GI_{50} of each cell line). After each incubation time, the proteins were extracted and newly synthesized proteins were enriched using the Click-iT Protein Enrichment Kit (Invitrogen C10416) as previously described⁷². Peptides were desalting using Oasis HLB cartridges (Waters, 186000383) prewashed with 2 mL of 100% acetonitrile and 2 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The samples were loaded in the column and washed with 2 mL of 0.1% TFA and eluted with 0.1% TFA in 50% acetonitrile.

4.5. Mass spectrometry and data analysis

Peptides were analyzed by LC-MS/MS using a nanoACQUITY UPLC system coupled to a Xevo G2-XS Q-ToF mass spectrometer (Waters) with a low-flow probe at the source. Peptides were separated by analytical chromatography (Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm, Waters) at a flow rate of 8 μ L/min, using a 7–85% water/ACN 0.1% formic acid linear gradient over 90 min. The MS survey scan was set to 0.5 s and recorded from 50 to 2000 m/z. MS/MS scans were acquired from 50 to 2000 m/z, and scan time was set to 1 s. Data were collected in data-independent MS^E mode of acquisition.

Continuum LC-MS^E data were processed and searched using ProteinLynx Global Server version 2.5 (PLGS, Waters Corporation). The searches were conducted against human protein sequences obtained from UniProt/Swiss-Prot and tolerances were set to automatic (typically 10 ppm for precursor and 20 ppm for product ions), with trypsin as enzyme, maximum of one missed cleavage, fixed carbamidomethyl modification for cysteine residues, and oxidation of methionine as variable modification. After, the dataset was uploaded in Scaffold (Proteome Software Inc., version 4.8.3) to validate the peptide and protein identifications. The

peptide identifications were accepted if greater than 95.0% probability and the protein identifications were accepted if greater than 99% probability and contained at least 2 identified peptides. The false discovery rate, FDR (Decoy), was 1.9% for proteins and 0.05% for peptides. The quantitative differences between CDDP-treated and untreated cells were analyzed by Student's t-test in Perseus software (MaxQuant, version 1.5.1.6.) using Normalized Top 3 Precursor Intensity values. p-values lower than 0.05 were considered statistically significant. All proteins identified in A549 and A549/CDDP were clustered using log2 fold-change values and RStudio software. To avoid infinite values derived from taking the log of zero, quantitative values of zero were replaced by the lowest quantitative value of the dataset. The ontologies of proteins regulated by CDDP ($p < 0.05$) were identified using the ClueGO plugin⁷³ in the Cytoscape software, with the following parameters: two-sided hypergeometric test (Enrichment/Depletion) with Benjamini-Hochberg correction, the minimum and maximum GO levels were 3 and 5, respectively, the minimum number of genes chosen was 2 and minimum percentage set as 3.4%, the percentage for a cluster to be significant was selected as 67%, the percentage for group sharing as 60% and kappa score threshold was set as 0.52.

Author contributions statement

C.S.D. wrote the main manuscript text and did the data collection and analysis. C.L.M. and N.A.C. helped on data acquisition. K.M.M. and C.S.D. managed the literature searches and designed the experiment. K.M.M. reviewed the manuscript. All listed authors contributed to the discussion of the results.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

5. References

1. Florea, A.-M. & Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. **3**, 1351–71 (2011).
2. Magrini, S. M. *et al.* Cetuximab and Radiotherapy Versus Cisplatin and Radiotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer: A Randomized Phase II Trial. *J. Clin. Oncol.* **34**, 427–35 (2016).
3. Wang, J. & Wu, G. S. Role of Autophagy in Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 17163–17173 (2014).
4. Galluzzi, L. *et al.* Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* **5**, e1257 (2014).
5. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–78 (2014).
6. Köberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S. & Kaina, B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1806**, 172–182 (2010).
7. Zhang, X. *et al.* Establishment and characterization of multidrug-resistant gastric cancer cell lines. *Anticancer Res.* **30**, 915–21 (2010).
8. McDermott, M. *et al.* In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front. Oncol.* **4**, 40 (2014).
9. Xavier, C. P. R., Pesic, M. & Vasconcelos, M. H. Understanding Cancer Drug Resistance by Developing and Studying Resistant Cell Line Models. *Curr. Cancer Drug Targets* **16**, 226–37 (2016).
10. Henkels, K. M. & Turchi, J. J. Induction of Apoptosis in Cisplatin-sensitive and -resistant Human Ovarian Cancer Cell Lines. *ICANCER Res.* **57**, 4488–4492 (1997).
11. Ma, J. *et al.* Characterization of ibrutinib-sensitive and -resistant mantle lymphoma cells. *Br. J. Haematol.* **166**, 849–861 (2014).
12. Feng, X. *et al.* miR-199a modulates cisplatin resistance in ovarian cancer by targeting Hif1 α . *Onco. Targets. Ther.* **Volume 10**, 5899–5906 (2017).
13. Gillet, J.-P., Varma, S. & Gottesman, M. M. The clinical relevance of cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 452–8 (2013).
14. Yu, G. *et al.* Proteomic Analysis of Differential Expression of Cellular Proteins in Response to Avian H9N2 Virus Infection of A549 Cells. *Front. Microbiol.* **7**, 1962 (2016).
15. Petrovic, V. *et al.* Changes in cellular signaling proteins in extracts from A549, H460, and U2OS cells treated with cisplatin or docetaxel. *Data Br.* **12**, 18–21 (2017).
16. Li, J., Wood, W. H., Becker, K. G., Weeraratna, A. T. & Morin, P. J. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* **26**, 2860–2872 (2007).
17. Bicaku, E. *et al.* In vitro analysis of ovarian cancer response to cisplatin, carboplatin, and paclitaxel identifies common pathways that are also associated with overall patient survival. *Br. J. Cancer* **106**, 1967–1975 (2012).
18. Kuang, P. *et al.* Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer* **77**, 427–432 (2012).
19. Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. & Schuman, E. M. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9482–7 (2006).
20. Eichelbaum, K. & Krijgsveld, J. Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis, and

- secretion during macrophage activation. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 792–810 (2014).
21. Hein, C. D., Liu, X.-M. & Wang, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm. Res.* **25**, 2216–30 (2008).
 22. Hatzenpichler, R. *et al.* In situ visualization of newly synthesized proteins in environmental microbes using amino acid tagging and click chemistry. *Environ. Microbiol.* **16**, 2568–90 (2014).
 23. Fulda, S. & Debatin, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–4811 (2006).
 24. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
 25. Kubli, D. A. & Gustafsson, Å. B. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ. Res.* **111**, 1208–21 (2012).
 26. Su, Y.-C. *et al.* Galectin-1-Induced Autophagy Facilitates Cisplatin Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* **11**, e0148408 (2016).
 27. Villa, E. *et al.* Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Rep.* **20**, 2846–2859 (2017).
 28. Oliver, T. G. *et al.* Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev.* **24**, 837–52 (2010).
 29. Martin, L. P., Hamilton, T. C. & Schilder, R. J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1291–5 (2008).
 30. Wang, Q. *et al.* Resistance to Bleomycin in Cancer Cell Lines Is Characterized by Prolonged Doubling Time, Reduced DNA Damage and Evasion of G2/M Arrest and Apoptosis. *PLoS One* **8**, e82363 (2013).
 31. Eastman, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* **2**, 275–80
 32. Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M. & Roberts, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *J. Toxicol.* **2012**, 1–13 (2012).
 33. Xu, Y., Wang, C. & Li, Z. A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress. *Mol. Clin. Oncol.* **2**, 3–7 (2014).
 34. Shi, S. *et al.* ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **35**, 2606–14 (2016).
 35. Tian, J., Liu, R. & Qu, Q. Role of endoplasmic reticulum stress on cisplatin resistance in ovarian carcinoma. *Oncol. Lett.* **13**, 1437–1443 (2017).
 36. Mandic, A., Hansson, J., Linder, S. & Shoshan, M. C. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 9100–6 (2003).
 37. Chen, J. Reactive Oxygen Species and Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Austin J. Clin. Pathol.* **1**, (2014).
 38. K. Maiti, A. Reactive Oxygen Species Reduction is a Key Underlying Mechanism of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Chemother. Open Access* **1**, (2012).
 39. Yan, M.-M., Ni, J.-D., Song, D., Ding, M. & Huang, J. Interplay between unfolded protein response and autophagy promotes tumor drug resistance. *Oncol. Lett.* **10**, 1959–1969 (2015).
 40. Tsai, Y. C. & Weissman, A. M. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* **1**, 764–778 (2010).
 41. Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M. & Piacentini, M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front. Oncol.* **7**, 78 (2017).

42. Noiva, R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 481–493 (1999).
43. Benham, A. M. The Protein Disulfide Isomerase Family: Key Players in Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 781–789 (2012).
44. Grek, C. & Townsend, D. M. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic reticulum Stress Dis.* **1**, 4–17 (2014).
45. Sun, S. *et al.* Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. *Neuro. Oncol.* **15**, 562–77 (2013).
46. Kuo, M. T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 99–133 (2009).
47. Tufo, G. *et al.* The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* **21**, 685–95 (2014).
48. Won, J.-K. *et al.* Protein disulfide isomerase inhibition synergistically enhances the efficacy of sorafenib for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **66**, 855–868 (2017).
49. Ivaska, J. Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small GTPases* **2**, 51–53 (2011).
50. Shang, Y., Cai, X. & Fan, D. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. *Curr. Cancer Drug Targets* **13**, 915–29 (2013).
51. Du, B. & Shim, J. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**, 965 (2016).
52. Tanjore, H. *et al.* Alveolar Epithelial Cells Undergo Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* **286**, 30972–30980 (2011).
53. Shah, P. P., Dupre, T. V, Siskind, L. J. & Beverly, L. J. Common cytotoxic chemotherapeutics induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. *Oncotarget* **8**, 22625–22639 (2017).
54. Okon, I. S. & Zou, M.-H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol. Res.* **100**, 170–4 (2015).
55. Mills, R. D. *et al.* Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J. Neurochem.* **105**, 18–33 (2008).
56. Shoshan-Barmatz, V. & Mizrachi, D. VDAC1: from structure to cancer therapy. *Front. Oncol.* **2**, 164 (2012).
57. Ishibashi, T. & Lippard, S. J. Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4219–23 (1998).
58. Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H. & Shay, J. W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* **8**, 69 (2016).
59. Shay, J. W. & Wright, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 349–53 (2011).
60. Lipinska, N. *et al.* Telomerase and drug resistance in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 4121–4132 (2017).
61. Biroccio, A. *et al.* Telomere dysfunction increases cisplatin and ecteinascidin-743 sensitivity of melanoma cells. *Mol. Pharmacol.* **63**, 632–8 (2003).
62. Zhang, Z. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promotes chemoresistance by suppressing cisplatin-dependent apoptosis in osteosarcoma cells. *Sci. Rep.* **7**, 7070 (2017).
63. Reddel, R. R. Telomere maintenance mechanisms in cancer: clinical implications. *Curr. Pharm. Des.*

- 20**, 6361–74 (2014).
64. Freund, A. *et al.* Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell* **159**, 1389–403 (2014).
 65. Schmittgen, T., Ju, J.-F., Danenberg, K. & Danenberg, P. Inhibition of pre-mRNA splicing by cisplatin and platinum analogs. *Int. J. Oncol.* (2003). doi:10.3892/ijo.23.3.785
 66. Chaudhury, A., Chander, P. & Howe, P. H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA* **16**, 1449–62 (2010).
 67. Gonçalves, V. & Jordan, P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. *Biomed Res. Int.* **2015**, 287048 (2015).
 68. Dutertre, M., Sanchez, G., Barbier, J., Corcos, L. & Auboeuf, D. The emerging role of pre-messenger RNA splicing in stress responses: Sending alternative messages and silent messengers. *RNA Biol.* **8**, 740–747 (2011).
 69. Gabriel, M. *et al.* Role of the splicing factor SRSF4 in cisplatin-induced modifications of pre-mRNA splicing and apoptosis. *BMC Cancer* **15**, 227 (2015).
 70. Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112–1116 (2006).
 71. Huang, X. & Darzynkiewicz, Z. Cytometric Assessment of Histone H2AX Phosphorylation. in *DNA Repair Protocols* **314**, 73–80 (Humana Press, 2006).
 72. Eichelbaum, K., Winter, M., Diaz, M. B., Herzig, S. & Krijgsveld, J. Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat. Biotechnol.* **30**, 984–990 (2012).
 73. Bindea, G. *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **25**, 1091–3 (2009).

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na resistência a cisplatina ainda são pouco entendidos, desta forma estudos para a elucidação e entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência são de grande importância. A análise da dinâmica de proteínas recém-sintetizadas após o tratamento com CDDP é relevante para a elucidação de mecanismos selecionados para o estabelecimento de linhagens resistentes, bem como de processos biológicos e mecanismo de sobrevivência que são ativados em resposta a CDDP em células resistentes a droga. O estudo de proteínas recém-sintetizadas também permite a identificação de proteínas candidatas para serem silenciadas ou superexpressadas, evitando o desenvolvimento da resistência bem como a sobrevivência na presença da droga. Neste estudo, foi utilizado um modelo celular de resistência clinicamente relevante para a análise das mudanças temporais de proteínas recém-sintetizadas após curta exposição a CDDP em células sensíveis (A549) e resistentes (A549/CDDP). Nossos dados permitiram obter uma ampla visão do que ocorre nas células após o tratamento com CDDP, bem como a identificação de possíveis mecanismos e proteínas responsáveis pela resistência a CDDP em células de câncer de pulmão.

A CDDP é capaz de formar ligações cruzadas no DNA e afetar processos moleculares ligados ao DNA, incluindo replicação e transcrição (Esteban-Fernández *et al.*, 2010). Na presença de CDDP, estes mecanismos podem ser prejudicados resultando na ativação de vias apoptóticas. Embora alterações na taxa de apoptose não tenham sido observadas através da análise de citometria de fluxo, foi possível identificar proteínas relacionadas a mecanismos de apoptose através dos estudos proteômicos realizados. Nas células A549 foi possível identificar proteínas com regulação aumentada envolvidas na via extrínseca de apoptose, enquanto que nas células A549/CDDP proteínas envolvidas na regulação da via intrínseca de apoptose foram reguladas positivamente. A via extrínseca de ativação da apoptose envolve receptores transmembrana, como os receptores membros da superfamília dos receptores de fatores de necrose (Elmore, 2007). Já a via intrínseca de ativação da apoptose não envolve receptores transmembrana e é ativada por estímulos que produzem sinais

intracelulares que são capazes de atuar diretamente em alvos dentro da célula, como, por exemplo, a mitocôndria (Elmore, 2007).

Dentre as proteínas identificadas com regulação aumentada por CDDP nas células A549 e A549/CDDP podemos destacar a proteína serina/treonina fosfatase 2A (PPP2R1A) e o receptor de proteína quinase C ativada 1 (RACK1), respectivamente. PPP2R1A possui envolvimento na via extrínseca de apoptose e RACK1 na via intrínseca de apoptose. Bax é um membro da família Bcl-2 que possui papel importante na via de sinalização de apoptose enquanto que Bcl-XL é uma proteína anti-apoptótica associada a Bax. Portanto, a ligação de Bcl-XL a Bax, impede que Bax exerça seu papel pró-apoptótico. Wu *et al.* (2010) demonstraram que RACK1 promove a oligomerização de Bax e a dissociação da interação Bax-Bcl-XL, tendo como consequência a indução de apoptose. Src ativado possui um papel de proteção contra apoptose em células de câncer de colón e foi demonstrado que RACK1 também é capaz de reprimir a atividade de Src levando a ativação de apoptose (Mamidipudi e Cartwright, 2009). Por outro lado, diversos estudos encontraram que RACK1 é capaz de reprimir a apoptose, inclusive em células de câncer tratadas com paclitaxel (Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Inayat-Hussain *et al.*, 2009). RACK1 é capaz de promover a degradação de BimEL em células tratadas com paclitaxel, resultando na repressão da apoptose. BimEL, sob condições normais, é regulada pela ligação a microtúbulos ou por interação direta com proteínas 14-3-3. Porém, após estímulos apoptóticos, BimEL é translocada para a membrana mitocondrial externa, onde promove a apoptose (Zhang *et al.*, 2008).

Proteínas envolvidas no processo de mitofagia foram identificadas com expressão aumentada em células A549/CDDP após o tratamento com CDDP, sendo elas a proteína deglicase DJ-1 e a proteína VDAC1 (do inglês “Voltage-Dependent Anion-selective Channel 1). O processo de mitofagia já foi descrito como envolvido na resistência a CDDP, já que células tumorais podem degradar mitocôndrias disfuncionais para promover a sobrevivência celular em resposta a estresses (Su *et al.*, 2016; Villa *et al.*, 2017). VDAC1 é uma proteína que está presente na membrana mitocondrial externa e é proposta como alvo de ligação de moléculas pró- e anti-apoptóticas, como membros da família Bcl-2 e HK-I/HK-II,

respectivamente (Shoshan-Barmatz e Mizrachi, 2012). DJ-1 já foi identificada como potencial marcador de resistência a CDDP em câncer de pulmão de não pequenas células (Zeng *et al.*, 2011).

Como mencionado acima, CDDP é capaz de causar dano no DNA devido a formação de ligações cruzadas no DNA. Em nossos resultados, o dano no DNA em ambas linhagens celulares, A549 e A549/CDDP, apresentaram maior número de células marcadas positivamente para a presença de dano no DNA após os períodos de exposição a CDDP quando comparadas com as células controle não tratadas. Comparando as taxas de dano entre as linhagens A549 e A549/CDDP, as células A549 parecem acumular maior porcentagem de dano no DNA ao longo do tempo, já que foi possível detectar diferença nas taxas de dano das células tratadas por 2 e 4 horas quando comparadas com a taxa de dano no DNA após 8 horas de tratamento com CDDP. Por outro lado, nas células A549/CDDP esta diferença no dano no DNA não foi observada. Estes resultados podem indicar que as células A549/CDDP sofrem menor dano no DNA causado por CDDP ou possuem uma maquinaria de reparo ao dano no DNA mais eficiente, mecanismos de resistência a CDDP comumente observados em outros modelos celulares (Martin *et al.*, 2008; Oliver *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Além disso, proteínas relacionadas ao reparo de dano no DNA pela via de reparo por excisão de nucleotídeo foram identificadas com expressão diminuída após 4 horas de exposição a CDDP nas células A549. Este resultado pode indicar que a resposta ao dano no DNA está prejudicada nestas células.

As proteínas que estão envolvidas neste processo de reparo e que foram identificadas com expressão alterada em resposta a CDDP são as proteínas RAD23 homóloga B (RAD23B) e proteína ribossomal 60S L40 conjugada a ubiquitina. RAD23B faz parte do complexo XPC, o qual é responsável pela detecção de dano no DNA pela via de reparo de excisão de nucleotídeo no genoma global (Zhang *et al.*, 2015). RAD23B se liga ao complexo XPC e estabiliza sua ligação e sua função de reparo ao DNA (Sugasawa *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2015). A poli-ubiquitinação geralmente leva a degradação de proteínas via proteossomos, porém a conjugação da ubiquitina em determinados resíduos de proteínas tem sido relacionada a resposta ao dano no DNA

(Hofmann, 2009). Proteínas contendo uma única ubiquitina ou cadeias de ubiquitinas não clássicas normalmente se encontram perto de sítios de dano no DNA e podem atuar no seu reparo (Hofmann, 2009). Sendo assim, a proteína ribossomal 60S L40 pode ter um papel no reparo ao dano no DNA devido a sua conjugação a ubiquitina.

Processos relacionados a reorganização do citoesqueleto foram identificados em células A549 após o tratamento com CDDP, incluindo propagação celular, pseudópodes, polimerização de filamentos de actina e reorganização do citoesqueleto de actina. Proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto, como vinculina (VCL), moesina (MSN) e vimentina (VIM), sendo esta última um marcador mesenquimal (Ivaska, 2011), foram detectadas com expressão aumentada nas células A549. A morfologia celular sofre alterações dependentemente da quantidade de VIM endógena encontrada na célula, quanto maior a quantidade de VIM mais alongada será a sua morfologia, enquanto que menores concentrações de VIM favorecem uma morfologia mais arredondada (Mendez *et al.*, 2010). Além disso, VIM também é capaz de aumentar a motilidade celular de células epiteliais, bem como afetar a capacidade de adesão destas células. A proteína VCL é encontrada nos sítios de adesão focal e já foi identificada relacionada com uma maior motilidade celular em condições de hipóxia (Misra *et al.*, 2012). Outro estudo demonstrou que VCL diminui a capacidade de invasão de células de câncer colorretal, bem como a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês “Epithelial-Mesenchymal Transition”) (Li *et al.*, 2014). Estes mecanismos relacionados a reorganização do citoesqueleto são observados durante a EMT, um processo que é conhecido por possuir um papel importante na progressão do câncer e na resistência a drogas (Shang *et al.*, 2013; Du e Shim, 2016).

A EMT é um processo celular no qual as células perdem as características epiteliais e ganham características mesenquimais. Durante o processo de EMT as células geralmente adquirem uma maior motilidade e maior capacidade de invasão, além disso as células perdem seus contatos célula-célula e se tornam mais alongadas e migratórias (Shah *et al.*, 2017). Embora estes processos estejam representativamente mais expressos nas células A549, as características

da transição epitélio-mesenquimal (alongamento celular e protrusões membranares) estão relacionadas a morfologia observada nas células A549/CDDP. Estes processos celulares e moleculares ativados em resposta ao tratamento com CDDP podem, portanto, ter sido positivamente selecionados durante o estabelecimento da linhagem celular resistente a CDDP. Estudos têm mostrado que o estresse no retículo endoplasmático, processo também identificado em nossos resultados, pode ser responsável pela indução da transição epitélio-mesenquimal (Tanjore *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2017). Além do estresse no retículo endoplasmático induzir a EMT, o próprio microambiente tumoral pode possibilitar a ativação da EMT, como, por exemplo, hipóxia. Além disso, fibroblastos associados ao câncer, encontrados no estroma tumoral, possuem um papel importante no comportamento invasivo e proliferativo das células tumorais já que são capazes de secretar citocinas facilitando a EMT (Du e Shim, 2016). Já que a CDDP pode causar estresse no retículo endoplasmático, a EMT e respostas de sobrevivência podem ser selecionadas pelas células para superar os efeitos citotóxicos da droga. Estudos tem demonstrado que EMT pode ser utilizada como alvo para a reversão da resistência a quimioterapia (Du e Shim, 2016).

Embora o DNA seja o principal alvo da CDDP, apenas uma pequena fração da droga interage de fato com o DNA. Existem, portanto, outros efeitos citotóxicos causados pela CDDP, incluindo estresse oxidativo (Eastman, 1990). Já foi identificado que a CDDP pode causar estresse oxidativo (Deavall *et al.*, 2012; Dasari e Tchounwou, 2014) e também é capaz de causar estresse no retículo endoplasmático (Mandic *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2017). Mecanismos de resposta a estresse oxidativo e de resposta a proteínas desenoveladas já foram identificados envolvidos na resistência a quimioterapia em células tumorais (Tsai e Weissman, 2010; Maiti, 2012; Yan *et al.*, 2015; Corazzari *et al.*, 2017), e estes mecanismos também foram identificadas em nosso estudo. Como as causas de resistência a CDDP podem ser múltiplas, a adaptação ao estresse no retículo endoplasmático pode ser um dos mecanismos de resistência a droga. Neste contexto, é importante destacar a proteína dissulfeto isomerase (P4HB, também conhecida como PDIA1), a qual foi detectada com

expressão aumentada nas células A549/CDDP após todos os tempos de tratamento com CDDP, e também foi identificada com a expressão diminuída nas células A549 após 2 horas de exposição a CDDP. As proteínas dissulfeto isomerase A4 (PDIA4) e A6 (PDIA6) também foram identificadas com expressão aumentada em resposta a tratamento com CDDP nas células A549/CDDP e A549, respectivamente.

PDIA1, PDIA4 e PDIA6 já foram identificadas envolvidas na resistência ao tratamento de células de câncer, incluindo resistência ao tratamento com CDDP (Kuo, 2009; Sun *et al.*, 2013; Tufo *et al.*, 2014; Won *et al.*, 2017). PDIA4 e PDIA6 foram identificadas com expressão aumentada em células de câncer de pulmão resistentes a CDDP, sugerindo que elas possuem um papel na adaptação ao estresse no retículo endoplasmático. O silenciamento de PDIA4 e PDIA6 foi capaz de aumentar a morte celular induzida por CDDP, por outro lado o silenciamento de PDIA1 não alterou a viabilidade celular após o tratamento com CDDP. Após o silenciamento de PDIA4 e PDIA6, as vias de morte celular ativadas são diferentes, enquanto o silenciamento de PDIA4 ativa as caspases 3/7, o silenciamento de PDIA6 ativa a caspase 4 (Tufo *et al.*, 2014). Em células de glioma maligno, a expressão aumentada de PDIA1 aumentou a viabilidade celular em resposta ao tratamento com diferentes doses de temozolamida, enquanto a sua inibição diminuiu a resistência destas células a droga (Sun *et al.*, 2013).

As PDI são geralmente encontradas no retículo endoplasmático e atuam como chaperonas em resposta a presença de proteínas desenoveladas, atuando também como dissulfeto isomerase/oxidoredutases (Noiva, 1999; Benham, 2012; Grek e Townsend, 2014). Portanto, estas proteínas são capazes de reduzir o dano causado pelo estresse oxidativo gerado pelas diferentes interações da CDDP com moléculas intracelulares. PDIA6 e PDIA1 também podem ser encontradas na membrana plasmática, porém com funções distintas de quando encontradas no retículo.

O estresse oxidativo causado pela CDDP ocorre devido a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxygen Species”) após a sua entrada nas células. Estas moléculas podem ser prejudiciais para diversos mecanismos celulares. Desta forma, é importante que as células mantenham um

equilíbrio correto de ROS para sua sobrevivência (Okon e Zou, 2015). Já que a presença de cisplatina no interior da célula induz a produção de ROS, é importante que as células sejam capazes de diminuir a sua produção intrínseca de ROS. Em nossos resultados, foi possível identificar termos de GO relacionados a regulação negativa dos processos metabólicos de ROS enriquecidos nas células A549/CDDP após 4 horas de tratamento com CDDP. As proteínas identificadas nesta ontologia foram as proteínas de choque térmico 75 kDa mitocondrial (TRAP1) e proteína de canal ânion-seletiva dependente de voltagem 1 (VDAC1), ambas encontradas na mitocôndria.

TRAP1 possui propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas, resultando na proteção da células contra estresse oxidativo e morte celular mitocondrial. A expressão aumentada de TRAP1 em células escamosas de câncer de esôfago está relacionada a metástase linfática, maior capacidade de invasão e migração e, por fim, com mau prognóstico (Ou *et al.*, 2014). TRAP1 também foi capaz de antagonizar a morte celular em resposta ao tratamento com CDDP em células de câncer de esôfago. Quando as células se encontram em estado de estresse oxidativo, TRAP1 pode ser fosforilada e se torna capaz de bloquear a geração de ROS, provavelmente pelo impedimento da permeabilização da membrana mitocondrial (Mills *et al.*, 2008). TRAP1 teve sua expressão diminuída em células de osteosarcoma tratadas com CDDP, porém em linhagem resistente a sua expressão foi aumentada em células tratadas com CDDP (Montesano Gesualdi *et al.*, 2007).

VDAC1 está localizada na membrana mitocondrial externa e controla a troca de metabólitos entre mitocôndria e citoplasma, incluindo o transporte de ROS (Shoshan-Barmatz e Mizrachi, 2012). A localização de VDAC1 permite que ela seja capaz de interagir com proteínas que intermediam e regulam a integração das funções mitocôndrias com outras funções celulares.

Proteínas relacionadas com a regulação negativa da via de proteína quinase ativada por estresse (SAPK, do inglês, "Stress-Activated Protein Kinase") foram identificadas com expressão aumentada nas células A549 após 8 h de tratamento com CDDP. A via SAPK, também conhecida como quinase Jun N-terminal (JNK), possui papel importante na regulação da expressão gênica em

resposta a diferentes condições e estímulos ambientais (Yan *et al.*, 2016). Como a CDDP é capaz de induzir dano no DNA, as células resistentes a droga desenvolvem mecanismos de resistência, como a perda do reconhecimento do dano, perda da função de p53, bem como interferência na ativação da cascata de caspases (Yan *et al.*, 2016). Todos estes eventos são capazes de ativar a via JNK/SAPK. A ativação excessiva de proteínas envolvidas na via JNK/SAPK já foi associada a resistência a quimioterápicos em diversos tipos de tumores (Yan *et al.*, 2016). O papel de JNK/SAPK na resposta ao tratamento com CDDP ainda não é bem definido, já que a ativação desta via já foi identificada como indutora de morte celular bem como relacionada a resistência a CDDP (Zanke *et al.*, 1996; Potapova *et al.*, 1997).

As proteínas envolvidas na via JNK/SAPK identificadas nesse trabalho foram glutathione S-transferase P (GSTP1) e a proteína DnaJ membro 1 homóloga da subfamília A. GSTP1 é capaz de sequestrar JNK através de um complexo multiprotéico JNK-GSTP1. Porém, em condições de estresse oxidativo, GSTP1 se dissocia de JNK e forma oligômeros de GSTP, e acaba liberando JNK e, conseqüentemente, resultando em eventos dependentes de JNK, que podem ser eventos de proliferação ou morte celular (Tew *et al.*, 2011). Em células tumorais, é possível assumir que a apoptose induzida por JNK/SAPK deve ser diminuída durante o desenvolvimento tumoral, portanto GSTP pode possuir um papel protetor nestas células, atuando no sequestro de JNK/SAPK. Como as proteínas identificadas estão relacionadas a regulação negativa de SAPK, as células A549 possivelmente possuem atividade diminuída da via JNK/SAPK.

O telômero é composto pelas seguintes repetições de DNA: 5'-TTAGGG-3'. Estas repetições podem ser um bom alvo para a ligação de CDDP no DNA, já que os adutos mais comuns CDDP-DNA são os crosslinks 1,2-d(GpG) na mesma fita de DNA, representando aproximadamente 65% dos adutos formados, seguido pelo crosslink 1,2-d(ApG) intracadeia, aproximadamente 25% do total de adutos (Ishibashi e Lippard, 1998). O telômero é responsável pela estabilidade do genoma, e possui papel de proteção das extremidades do DNA de cromossomos lineares. A extensão do telômero é de grande importância para as células e em cada ciclo celular, o seu comprimento diminui progressivamente e quando está

criticamente diminuído, as células normais não se dividem mais, se tornam senescentes e morrem (Pfeiffer e Lingner, 2013; Freund *et al.*, 2014). Por outro lado, em células tumorais, a manutenção do comprimento do telômero é mantida em mais ciclos celulares, levando as células a uma aparente capacidade de divisão e crescimento ilimitada (Shay e Wright, 2011; Jafri *et al.*, 2016). Portanto, a manutenção do telômero é importante para o desenvolvimento do câncer e resistência a drogas em células tumorais (Biroccio *et al.*, 2003; Reddel, 2014; Lipinska *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). A manutenção do telômero foi dinamicamente regulada em ambas linhagens celulares analisadas, A549 e A549/CDDP, a qual está principalmente associada a identificação de proteínas participantes do complexo TRiC (do inglês “TCP-1 Ring Complex”).

O complexo TRiC é conhecido principalmente pela sua função de enovelamento de proteínas do citoesqueleto como actina e tubulina (Spiess *et al.*, 2004). Sua principal função é a participação no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas. Porém, este complexo foi identificado como responsável pela correta localização da enzima telomerase e, conseqüentemente, pelo alongamento do telômero (Freund *et al.*, 2014). O complexo TRiC também é responsável pela correta localização de TCAB1 no corpo de Cajal. Além de TCAB1, TRiC também auxilia na correta localização de TERC, um dos componentes da RNA da telomerase. TCAB1 é um cofator da telomerase que é responsável pelo deslocamento da telomerase e dos pequenos RNAs do corpo de Cajal (scaRNAs) (Freund *et al.*, 2014). Desta forma, a ausência ou deficiência de TRiC perturbam diferentes componentes que possuem funções para a correta atuação da telomerase. Portanto, se a expressão destas proteínas é afetada por CDDP, a manutenção do telômero também é prejudicada pela droga.

A CDDP também é capaz de se ligar a moléculas de RNA ao invés de moléculas de DNA e, desta forma, a ligação CDDP-RNA pode prejudicar o mecanismo de *splicing* (Schmittgen *et al.*, 2003). As ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs, do inglês “Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins”) A1, M e F foram detectadas com a expressão diminuída em células A549 após 4 horas de exposição a CDDP, bem como o fator de *splicing* rico em serina/arginina (SRSF1) e a RNA helicase de spliceossomo DDX39B. As

hnRNPs são proteínas multifuncionais, e podem atuar na interação e regulação do destino dos componentes necessários para o processamento de pré-mRNA. As hnRNPs podem participar da exportação, localização, estabilidade e tradução das moléculas de mRNA, bem como no processo de *splicing* (Chaudhury *et al.*, 2010). Algumas hnRNPs também podem ser encontradas no citoplasma, como, por exemplo, a hnRNP A1 e a hnRNP F. Quando presentes no núcleo, elas participam no *splicing* de RNA e na regulação da transcrição na recombinação do gene da imunoglobulina. A hnRNP A1 funciona como um repressor de *splicing* de éxons, ou seja, promove a exclusão de éxons (Guo *et al.*, 2013), já que é antagonista da proteína reguladora de *splicing* rica em serina/arginina SF2/ASF. Assim como hnRNP A1, hnRNP F participa no *splicing* alternativo de éxons (Chaudhury *et al.*, 2010). hnRNP A1 e A2 já foram identificadas com expressão aumentada em células de câncer, incluindo células de câncer de pulmão (Pino *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2010).

Outra importante classe de proteínas reguladoras do processamento de mRNA é a família de proteínas SR filogeneticamente conservadas. As proteínas SR são proteínas reguladoras-chave do processo de *splicing*, que ocorre em aproximadamente 95% dos genes humanos (Das e Krainer, 2014). SRSF1 promove a associação do complexo de *splicing* e é responsável pelo reconhecimento de sítios de *splicing* (Das e Krainer, 2014; Gonçalves e Jordan, 2015). SRSF1 foi encontrada com expressão aumentada em muitos tipos diferentes de células de câncer, incluindo câncer de pulmão (Das e Krainer, 2014). Em câncer de pulmão a expressão aumentada de SRSF1 resultou em um fenótipo mais agressivo e também conferiu resistência a drogas anti-tumorais como carboplatina e paclitaxel (Schmittgen *et al.*, 2003; Das e Krainer, 2014). Além de atuar diretamente no *splicing*, SRSF1 também possui envolvimento na regulação da transcrição, na estabilidade e no transporte de mRNAs. Sabe-se que a CDDP é capaz de inibir o *splicing* de pré-mRNAs e que, caso este processo sofra alteração, a diversidade do proteoma da célula é diminuída, bem como a capacidade de adaptação celular a diferentes situações fisiológicas (Schmittgen *et al.*, 2003; Dutertre *et al.*, 2011; Gabriel *et al.*, 2015). Estes resultados podem indicar que mecanismos de *splicing* alternativo estão prejudicados nas células

A549, já que estas proteínas foram identificadas com expressão diminuída nestas células após o tratamento com CDDP.

Mecanismos envolvidos na resistência de células tumorais a quimioterápicos ainda não estão bem elucidados. Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de estudos que descubram processos moleculares e proteínas relacionados a resistência a drogas em células de câncer. Além das proteínas identificadas como diferencialmente expressas nas linhagens sensíveis e resistentes a drogas, as proteínas que inicialmente não apresentam diferença de expressão entre estas linhagens também podem ser bons alvos de estudo para a descoberta de melhores tratamentos do câncer, já que elas podem ser diferencialmente reguladas apenas após a exposição a droga. Neste trabalho, nós identificamos possíveis proteínas e mecanismos moleculares regulados por CDDP em células de adenocarcinoma de pulmão humano sensíveis e resistentes a CDDP. Este estudo, em nosso conhecimento, foi o primeiro trabalho que utilizou a técnica BONCAT para estudar a dinâmica das proteínas recém-sintetizadas em resposta a CDDP em células tumorais. Portanto, este é um trabalho pioneiro de identificação de mecanismos e proteínas que estão potencialmente regulados e envolvidos com a resistência a cisplatina em células de adenocarcinoma de pulmão humano.

6. PERSPECTIVAS

Confirmação da expressão diferencial de proteínas alvos por *western blot* e superexpressão ou silenciamento de proteínas alvos para confirmação de sua participação na resistência a CDDP em células de adenocarcinoma de pulmão humano.

7. REFERÊNCIAS

ACS, American Cancer Society. Signs and symptoms of lung cancer. Feb 2106a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/prevention-and-early-detection/signs-and-symptoms.html>> Acesso em: 26 de jul 2017.

ACS, American Cancer Society. Exams and tests that look for lung cancer. Feb 2106b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/prevention-and-early-detection/exams-and-tests.html>> Acesso em: 26 de jul 2017.

ACS, American Cancer Society. Cancer facts & figures 2017. 2017a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>> Acesso em: 17 de abr 2017.

ACS, American Cancer Society. Non-small cell lung cancer stages. Mar 2017b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>> Acesso em: 26 de jul 2017.

BICAKU, E. et al. In vitro analysis of ovarian cancer response to cisplatin, carboplatin, and paclitaxel identifies common pathways that are also associated with overall patient survival. **Br J Cancer**, v. 106, n. 12, p. 1967-75, Jun 05 2012. ISSN 0007-0920.

BENHAM, A. M. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 8, p. 781-9, Apr 2012. ISSN 1557-7716.

BILELLO, K. S.; MURIN, S.; MATTHAY, R. A. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. **Clin Chest Med**, v. 23, n. 1, p. 1-25, Mar 2002. ISSN 0272-5231.

BIROCCIO, A. et al. Telomere dysfunction increases cisplatin and ecteinascidin-743 sensitivity of melanoma cells. **Mol Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 632-8, Mar 2003. ISSN 0026-895X.

CARDENAS, V. M. et al. Environmental tobacco smoke and lung cancer mortality in the American Cancer Society's Cancer Prevention Study. II. **Cancer Causes Control**, v. 8, n. 1, p. 57-64, Jan 1997. ISSN 0957-5243.

CHAUDHURY, A.; CHANDER, P.; HOWE, P. H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. **RNA**, v. 16, n. 8, p. 1449-62, Aug 2010. ISSN 1469-9001.

CHOI, J. R. et al. Gene mutation discovery research of non-smoking lung cancer patients due to indoor radon exposure. **Ann Occup Environ Med**, v. 28, p. 13, 2016. ISSN 2052-4374.

CORAZZARI, M. et al. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. **Front Oncol**, v. 7, p. 78, 2017. ISSN 2234-943X.

CUI, H. et al. Up-regulation and subcellular localization of hnRNP A2/B1 in the development of hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 10, p. 356, Jul 2010. ISSN 1471-2407.

DAS, S.; KRAINER, A. R. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. **Mol Cancer Res**, v. 12, n. 9, p. 1195-204, Sep 2014. ISSN 1557-3125.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 364-78, Oct 2014. ISSN 1879-0712.

DEAVALL, D. G. et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **J Toxicol**, v. 2012, p. 645460, 2012. ISSN 1687-8205.

DIETERICH, D. C. et al. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 25, p. 9482-7, Jun 20 2006. ISSN 0027-8424.

DU, B.; SHIM, J. S. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. **Molecules**, v. 21, n. 7, Jul 2016. ISSN 1420-3049.

DUTERTRE, M. et al. The emerging role of pre-messenger RNA splicing in stress responses: sending alternative messages and silent messengers. **RNA Biol**, v. 8, n. 5, p. 740-7, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 1555-8584.

EASTMAN, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. **Cancer Cells**, v. 2, n. 8-9, p. 275-80, 1990 Aug-Sep 1990. ISSN 1042-2196.

EGGERT, J. A.; PALAVANZADEH, M.; BLANTON, A. Screening and early detection of lung cancer. **Seminars in oncology nursing**, v. 33, n. 2, p. 129-140, 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233.

ESTEBAN-FERNÁNDEZ, D. et al. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. **Metallomics**, v. 2, n. 1, p. 19-38, Jan 2010. ISSN 1756-591X.

FANG, Y. et al. Transcriptome Sequencing Reveals Key Pathways and Genes Associated with Cisplatin Resistance in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170609, 2017. ISSN 1932-6203.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. In: (Ed.). **Cancers (Basel)**, v.3, 2011. p.1351-71. ISBN 2072-6694.

FREUND, A. et al. Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1389-403, Dec 2014. ISSN 1097-4172.

GABRIEL, M. et al. Role of the splicing factor SRSF4 in cisplatin-induced modifications of pre-mRNA splicing and apoptosis. **BMC Cancer**, v. 15, p. 227, Apr 2015. ISSN 1471-2407.

GALLUZZI, L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1257, May 29 2014.

GILLILAND, F. D. et al. Uranium mining and lung cancer among Navajo men in New Mexico and Arizona, 1969 to 1993. **J Occup Environ Med**, v. 42, n. 3, p. 278-83, Mar 2000. ISSN 1076-2752.

GONÇALVES, V.; JORDAN, P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 287048, 2015. ISSN 2314-6141.

GREK, C.; TOWNSEND, D. M. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. **Endoplasmic Reticulum Stress Dis**, v. 1, n. 1, p. 4-17, Jan 2014. ISSN 2300-4266.

GUO, R. et al. HnRNP A1/A2 and SF2/ASF regulate alternative splicing of interferon regulatory factor-3 and affect immunomodulatory functions in human non-small cell lung cancer cells. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62729, 2013. ISSN 1932-6203.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011. ISSN 0092-8674.

HERBST, R. S.; HEYMACH, J. V.; LIPPMAN, S. M. Lung cancer. **N Engl J Med**, v. 359, n. 13, p. 1367-80, Sep 25 2008. ISSN 0028-4793.

HODGSON, D. C. et al. Individualized estimates of second cancer risks after contemporary radiation therapy for Hodgkin lymphoma. **Cancer**, v. 110, n. 11, p. 2576-86, Dec 01 2007. ISSN 0008-543X.

HOFMANN, K. Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 4, p. 544-56, Apr 2009. ISSN 1568-7864.

INAYAT-HUSSAIN, S. H. et al. RACK-1 overexpression protects against goniiothalamine-induced cell death. **Toxicol Lett**, v. 191, n. 2-3, p. 118-22, Dec 2009. ISSN 1879-3169.

IRIBARREN, C. et al. Effect of cigar smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men. **N Engl J Med**, v. 340, n. 23, p. 1773-80, Jun 10 1999. ISSN 0028-4793.

ISHIBASHI, T.; LIPPARD, S. J. Telomere loss in cells treated with cisplatin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4219-23, Apr 1998. ISSN 0027-8424.

IVASKA, J. Vimentin: Central hub in EMT induction? **Small GTPases**, v. 2, n. 1, p. 51-53, Jan 2011. ISSN 2154-1256.

JAFRI, M. A. et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome Med**, v. 8, n. 1, p. 69, 06 2016. ISSN 1756-994X.

JOHNSON, S. W. et al. Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. **Cancer Res**, v. 54, n. 22, p. 5911-6, Nov 15 1994. ISSN 0008-5472.

KARA, G. et al. Downregulation of ABCE1 via siRNA affects the sensitivity of A549 cells against chemotherapeutic agents. **Med Oncol**, v. 32, n. 4, p. 103, Apr 2015. ISSN 1357-0560.

KAUFMAN, E. L. et al. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 3, p. 392-8, Jan 20 2008. ISSN 0732-183x.

KÖBERLE, B. et al. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1806, n. 2, p. 172-82, Dec 2010. ISSN 0006-3002.

KORRODI-GREGORIO, L. et al. From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0165973, 2016. ISSN 1932-6203.

KUANG, P. et al. Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients. **Lung Cancer**, v. 77, n. 2, p. 427-32, Aug 2012. ISSN 0169-5002.

KUO, M. T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 1, p. 99-133, Jan 2009. ISSN 1557-7716.

KUO, M. T. et al. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 1, p. 71-83, Mar 2007. ISSN 0167-7659.

LEMJABBAR-ALAOUI, H. et al. Lung cancer: Biology and treatment options. **Biochim Biophys Acta**, v. 1856, n. 2, p. 189-210, Dec 2015. ISSN 0006-3002.

LENG, S. et al. Radon Exposure, IL-6 Promoter Variants, and Lung Squamous Cell Carcinoma in Former Uranium Miners. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 4, p. 445-51, Apr 2016. ISSN 0091-6765.

LI, T. et al. Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. **Mol Cancer**, v. 13, p. 263, Dec 2014. ISSN 1476-4598.

LIPINSKA, N. et al. Telomerase and drug resistance in cancer. **Cell Mol Life Sci**, v. 74, n. 22, p. 4121-4132, Nov 2017. ISSN 1420-9071.

LUBIN, J. H. et al. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, n. 11, p. 817-27, Jun 07 1995. ISSN 0027-8874.

MAITI, A. K. Reactive Oxygen Species Reduction Is a Key Underlying Mechanism of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Chemotherapy: Open Access**, v. 1, n. 2, 2012. ISSN 2167-7700.

MAMIDIPUDI, V.; CARTWRIGHT, C. A. A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. **Oncogene**, v. 28, n. 50, p. 4421-33, Dec 2009. ISSN 1476-5594.

MANDIC, A. et al. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. **J Biol Chem**, v. 278, n. 11, p. 9100-6, Mar 2003. ISSN 0021-9258.

MARTIN, L. P.; HAMILTON, T. C.; SCHILDER, R. J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 5, p. 1291-5, Mar 2008. ISSN 1078-0432.

MCDERMOTT, M. et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. **Front Oncol**, v. 4, p. 40, 2014. ISSN 2234-943x.

MELLISH, K. J.; KELLAND, L. R.; HARRAP, K. R. In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. **Br J Cancer**, v. 68, n. 2, p. 240-50, Aug 1993. ISSN 0007-0920.

MENDEZ, M. G.; KOJIMA, S.; GOLDMAN, R. D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. **FASEB J**, v. 24, n. 6, p. 1838-51, Jun 2010. ISSN 1530-6860.

MILLS, R. D. et al. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). **J Neurochem**, v. 105, n. 1, p. 18-33, Apr 2008. ISSN 1471-4159.

MISRA, A. et al. Hypoxia activated EGFR signaling induces epithelial to mesenchymal transition (EMT). **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49766, 2012. ISSN 1932-6203.

MONTESANO GESUALDI, N. et al. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. **Stress**, v. 10, n. 4, p. 342-50, Nov 2007. ISSN 1025-3890.

MOURTADA-MAARABOUNI, M. et al. Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase C 1 (RACK1) in T cell apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 2, p. 503-14, Aug 2005. ISSN 0741-5400.

NAVARANJAN, G. et al. Cancer incidence and mortality from exposure to radon progeny among Ontario uranium miners. **Occup Environ Med**, v. 73, n. 12, p. 838-845, Dec 2016. ISSN 1351-0711.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Semin Cell Dev Biol**, v. 10, n. 5, p. 481-93, Oct 1999. ISSN 1084-9521.

OKON, I. S.; ZOU, M. H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. **Pharmacol Res**, v. 100, p. 170-4, Oct 2015. ISSN 1096-1186.

OLIVER, T. G. et al. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. **Genes Dev**, v. 24, n. 8, p. 837-52, Apr 2010. ISSN 1549-5477.

OU, Y. et al. TRAP1 shows clinical significance and promotes cellular migration and invasion through STAT3/MMP2 pathway in human esophageal squamous cell cancer. **J Genet Genomics**, v. 41, n. 10, p. 529-37, Oct 2014. ISSN 1673-8527.

PELISSIER, C. et al. Design and validation of a self-administered questionnaire as an aid to detection of occupational exposure to lung carcinogens. **Public Health**, v. 143, p. 44-51, Feb 2017. ISSN 0033-3506.

PETROVIC, V. et al. Changes in cellular signaling proteins in extracts from A549, H460, and U2OS cells treated with cisplatin or docetaxel. **Data Brief**, v. 12, p. 18-21, Jun 2017. ISSN 2352-3409.

PFEIFFER, V.; LINGNER, J. Replication of telomeres and the regulation of telomerase. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 5, p. a010405, May 2013. ISSN 1943-0264.

PINO, I. et al. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 41, n. 2, p. 131-43, Aug 2003. ISSN 0169-5002.

POTAPOVA, O. et al. The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. **J Biol Chem**, v. 272, n. 22, p. 14041-4, May 1997. ISSN 0021-9258.

REDDEL, R. R. Telomere maintenance mechanisms in cancer: clinical implications. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 41, p. 6361-74, 2014. ISSN 1873-4286.

SCHMITTGEN, T. D. et al. Inhibition of pre-mRNA splicing by cisplatin and platinum analogs. **Int J Oncol**, v. 23, n. 3, p. 785-9, Sep 2003. ISSN 1019-6439.

SELIGER, B. et al. Combined analysis of transcriptome and proteome data as a tool for the identification of candidate biomarkers in renal cell carcinoma. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1567-81, Mar 2009. ISSN 1615-9853.

SHAH, P. P. et al. Common cytotoxic chemotherapeutics induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 22625-22639, Apr 2017. ISSN 1949-2553.

SHANG, Y.; CAI, X.; FAN, D. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 915-29, Nov 2013. ISSN 1873-5576.

SHAPIRO, J. A.; JACOBS, E. J.; THUN, M. J. Cigar smoking in men and risk of death from tobacco-related cancers. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 4, p. 333-7, Feb 16 2000. ISSN 0027-8874.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 21, n. 6, p. 349-53, Dec 2011. ISSN 1096-3650.

SHEEN, S. et al. An updated review of case-control studies of lung cancer and indoor radon-Is indoor radon the risk factor for lung cancer? **Ann Occup Environ Med**, v. 28, p. 9, 2016. ISSN 2052-4374.

SHI, S. et al. ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. **Oncol Rep**, v. 35, n. 5, p. 2606-14, May 2016. ISSN 1791-2431.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; MIZRACHI, D. VDAC1: from structure to cancer therapy. **Front Oncol**, v. 2, p. 164, 2012. ISSN 2234-943X.

SHUCK, S. C.; SHORT, E. A.; TURCHI, J. J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. **Cell Res**, v. 18, n. 1, p. 64-72, Jan 2008. ISSN 1001-0602.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017. ISSN 1542-4863.

SPIESS, C. et al. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 11, p. 598-604, Nov 2004. ISSN 0962-8924.

SU, Y. C. et al. Galectin-1-Induced Autophagy Facilitates Cisplatin Resistance of Hepatocellular Carcinoma. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148408, 2016. ISSN 1932-6203.

SUGASAWA, K. et al. HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 9, p. 4852-61, Sep 1996. ISSN 0270-7306.

SUN, S. et al. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. **Neuro Oncol**, v. 15, n. 5, p. 562-77, May 2013. ISSN 1523-5866.

TANJORE, H. et al. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. **J Biol Chem**, v. 286, n. 35, p. 30972-80, Sep 2011. ISSN 1083-351X.

TEW, K. D. et al. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 2, p. 299-313, Jul 2011. ISSN 1873-4596.

TIAN, J.; LIU, R.; QU, Q. Role of endoplasmic reticulum stress on cisplatin resistance in ovarian carcinoma. **Oncol Lett**, v. 13, n. 3, p. 1437-1443, Mar 2017. ISSN 1792-1074.

TIMERBAEV, A. R. et al. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. **Chem Rev**, v. 106, n. 6, p. 2224-48, Jun 2006. ISSN 0009-2665.

TSAI, Y. C.; WEISSMAN, A. M. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. **Genes Cancer**, v. 1, n. 7, p. 764-778, Jul 2010. ISSN 1947-6019.

TUFO, G. et al. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 5, p. 685-95, May 2014. ISSN 1476-5403.

VILLA, E. et al. Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. **Cell Rep**, v. 20, n. 12, p. 2846-2859, Sep 2017. ISSN 2211-1247.

VUONG, N. Q. et al. Proteomic changes in human lung epithelial cells (A549) in response to carbon black and titanium dioxide exposures. **J Proteomics**, v. 149, p. 53-63, Oct 21 2016. ISSN 1874-3919.

WANG, Q. et al. Resistance to bleomycin in cancer cell lines is characterized by prolonged doubling time, reduced DNA damage and evasion of G2/M arrest and apoptosis. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82363, 2013. ISSN 1932-6203.

WON, J. K. et al. Protein disulfide isomerase inhibition synergistically enhances the efficacy of sorafenib for hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 66, n. 3, p. 855-868, Sep 2017. ISSN 1527-3350.

WYNNE, P. et al. Enhanced repair of DNA interstrand crosslinking in ovarian cancer cells from patients following treatment with platinum-based chemotherapy. **Br J Cancer**, v. 97, n. 7, p. 927-33, Oct 08 2007. ISSN 0007-0920.

XAVIER, C. P.; PESIC, M.; VASCONCELOS, M. H. Understanding Cancer Drug Resistance by Developing and Studying Resistant Cell Line Models. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 16, n. 3, p. 226-37, 2016. ISSN 1568-0096.

XU, R. et al. The long noncoding RNA ANRIL acts as an oncogene and contributes to paclitaxel resistance of lung adenocarcinoma A549 cells. **Oncotarget**, Mar 29 2017. ISSN 1949-2553.

XU, Y.; WANG, C.; LI, Z. A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress. **Mol Clin Oncol**, v. 2, n. 1, p. 3-7, Jan 2014. ISSN 2049-9450.

YAN, D.; AN, G.; KUO, M. T. C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin. **J Cell Mol Med**, v. 20, n. 11, p. 2013-2019, 11 2016. ISSN 1582-4934.

YAN, M. M. et al. Interplay between unfolded protein response and autophagy promotes tumor drug resistance. **Oncol Lett**, v. 10, n. 4, p. 1959-1969, Oct 2015. ISSN 1792-1074.

YAN, X. D. et al. Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different administrations. **Oncol Rep**, v. 17, n. 5, p. 1163-9, May 2007. ISSN 1021-335X.

YU, G. et al. Proteomic Analysis of Differential Expression of Cellular Proteins in Response to Avian H9N2 Virus Infection of A549 Cells. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1962, 2016. ISSN 1664-302x.

YU, T. et al. Circumvention of cisplatin resistance in ovarian cancer by combination of cyclosporin A and low-intensity ultrasound. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 91, p. 103-10, Apr 2015. ISSN 0939-6411.

ZANKE, B. W. et al. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. **Curr Biol**, v. 6, n. 5, p. 606-13, May 1996. ISSN 0960-9822.

ZENG, H. Z. et al. Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 6, p. 3489-99, 2011. ISSN 1422-0067.

ZHANG, E. T. et al. Architecture of the human XPC DNA repair and stem cell coactivator complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 48, p. 14817-22, Dec 2015. ISSN 1091-6490.

ZHANG, W. et al. RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells. **J Biol Chem**, v. 283, n. 24, p. 16416-26, Jun 2008. ISSN 0021-9258.

ZHANG, X. et al. Establishment and characterization of multidrug-resistant gastric cancer cell lines. **Anticancer Res**, v. 30, n. 3, p. 915-21, Mar 2010. ISSN 1791-7530.

ZHANG, Z. et al. Telomerase reverse transcriptase promotes chemoresistance by suppressing cisplatin-dependent apoptosis in osteosarcoma cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7070, Aug 2017. ISSN 2045-2322.

8. CURRÍCULO VITÆ RESUMIDO

DUTRA, CS

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Cristine de Souza Dutra

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil – 07/05/1991

Endereço Profissional:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de
Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 salas 204 e 206

Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos

Agronomia – Porto Alegre

91501-970, RS – Brasil

Telefone Profissional: 51 33086070

E-mail: cristinedutra@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

2010 - 2014

Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Título: Caracterização funcional de isoformas de proteínas 14-3-3 de
Echinococcus granulosus

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

2015 – 2017

Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Título: Análise proteômica de proteínas recém-sintetizadas em resposta a cisplatina em células de adenocarcinoma de pulmão humano resistentes e sensíveis a droga

Orientador: Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

3. ESTÁGIOS

2010 - 2011

Bolsista de Iniciação científica voluntário

Vínculo: Graduação

Instituição: UFRGS, Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Atividades desenvolvidas: Genotipagem de espécies de *Echinococcus* encontrados em cistos hidáticos de bovinos.

2011 - 2013

Bolsista de Iniciação científica

Agência de Fomento: Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS (FAPERGS)

Vínculo: Graduação

Instituição: UFRGS, Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Atividades desenvolvidas: Caracterização funcional de isoformas de proteínas 14-3-3 de *Echinococcus granulosus*

2014/2 sem

Estágio curricular

Vínculo: Graduação

Instituição: University of Newcastle, AUS

Supervisor: Prof. Dr. Mark Baker

Atividades desenvolvidas: Identificação de glicoproteínas presentes em espermatozoides humanos potencialmente envolvidas na infertilidade masculina.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

TEICHMANN A, VARGAS DM, MONTEIRO KM, MENEGHETTI BV, DUTRA CS, PAREDES R, *et al.* Characterization of 14-3-3 isoforms expressed in the *Echinococcus granulosus* pathogenic larval stage. *J Proteome Res.* 2015;14(4):1700-15.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

DUTRA, C.S., FERREIRA, H.B. Identificação de ligantes proteicos das isoformas zeta 2 e zeta 3 de proteínas 14-3-3 do parasito cestódeo *Echinococcus granulosus*. In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS.** 2012.

DUTRA, C.S., MARTELLO, C., BALBINOTTI, H., CADORE, N., MONTEIRO, K. Identification of newly synthesized proteins in human lung adenocarcinoma cells exposed to cisplatin. In: 6º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2015, Brasília. **6º Congresso Brasileiro de Biotecnologia,** 2015.