

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

**Interação entre ácido retinóico e cisplatina no tratamento de células
A549 através da via do fator de transcrição NRF2.**

VITOR DE MIRANDA RAMOS

Orientador:

Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

-Porto Alegre-

2018

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

**Interação entre ácido retinóico e cisplatina no tratamento de células
A549 através da via do fator de transcrição NRF2.**

VITOR DE MIRANDA RAMOS

Orientador:

Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, como um pré-requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Bioquímica.

Banca examinadora:

Dra. Ana Maria Oliveira Battastin (UFRGS)

Dr. Guido Lenz (UFRGS)

Dra. Elizandra Braganhol (UFCSPA)

-Porto Alegre-

2018

CIP - Catalogação na Publicação

de Miranda Ramos, Vitor

Interação entre ácido retinóico e cisplatina no tratamento de células A549 através da via do fator de transcrição NRF2. / Vitor de Miranda Ramos. -- 2018.

63 f.

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Câncer de pulmão. 2. Ácido retinóico. 3. Cisplatina. 4. NRF2. 5. Estresse oxidativo. I. Fonseca Moreira, José Cláudio, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiro de tudo ao Zé (prof. José Cláudio) por todo aprendizado que me proporcionou nos últimos anos. Espero que um dia eu possa retornar o mínimo do que ele representou na minha trajetória. Com certeza foi o melhor exemplo de dedicação e amor ao trabalho que eu pude ter. Obrigado pela confiança que tiveste em mim e pela paciência! E principalmente, obrigado por ser capaz de despertar a paixão pelo ensino e pela bioquímica em todos teus alunos! Obrigado!

Gostaria também de agradecer ao professor Daniel, que contribuiu muito para minha formação dentro do laboratório! Muito obrigado pela parceria e pelas conversas!

Gostaria de agradecer aos professores e amigos Matheus Pasquali e Alfeu Zanotto-Filho. Apesar de não terem participado diretamente deste trabalho, só consegui realiza-lo por que pude conviver com eles no passado!

Quero agradecer muito aos meus amigos do lab 32. Principalmente ao Rafael Bortolin e ao Juciano que estiveram junto comigo desde que entrei no lab! O exemplo e a amizade deles foi fundamental! Também quero agradecer ao Alexandre que encarou tudo isso junto comigo, e sempre pude contar! A minha querida amiga Nauana sempre ajudando a deixar o ambiente mais feliz! E ao querido Maurilio por toda ajuda e amizade dentro e fora do lab! As amigas Alice, Lyvia e Helen e a todos outros amigos e colegas que sempre ajudaram a divertir o ambiente e fazer o 32 ser o que é! Tamo junto!

Quero agradecer a todos colegas que dequiram parte do seu tempo para colaborar com este trabalho! Em especial a ajuda do prof. Fabrício que foi essencial para que pudesse conclui-lo. E também a contribuição da colega Diana pelas horas de bancada dedicadas!

Agradeço o aceite dos membros da banca, e obrigado por abrirem mão de parte de seu tempo para colaborarem com este trabalho!

Muito obrigado aos funcionários do departamento de do PPG, principalmente aos membros da secretaria!

Quero agradecer muito as pessoas da minha família, em especial a dedicação da minha mãe que com certeza abriu mão de muita coisa na vida dela para que hoje eu pudesse estar aqui! Você é uma mulher incrível!

Agradeço imensamente a todos meus amigos por fazerem parte da minha vida, realmente sou muito grato por estar do lado de pessoas tão maravilhosas! O convívio com vocês facilita muuuito hahal!! Agradecimento especial pra Bibs, Ju, Julinha e Debs que estiveram muito presentes nesses últimos anos! Beeijos!!

Por último, quero dedicar esta dissertação a todos que fazem parte da ciência brasileira, pesquisadores, funcionários, alunos, professores e sociedade! Mesmo sem todos os recursos básicos continuam se dedicando com empenho ao que fazem!

Sumário

PARTE I.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIACÕES.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Câncer de pulmão.....	5
1.1.1) Visão global.....	5
1.1.2) Classificações.....	6
1.1.3) Tratamentos.....	7
1.2 Ácido retinóico.....	9
1.2.1) Origem e efeitos.....	9
1.2.2) Mecanismos de ação.....	9
1.2.3) Ácido retinóico e câncer.....	10
1.3 <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2)</i>	12
1.3.1) Função.....	12
1.3.2) Regulação.....	15
1.3.3) NRF2 e câncer.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos gerais.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	19
PARTE II.....	20
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
PARTE III.....	49
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	53
7. PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

PARTE I

RESUMO

O tratamento com quimioterápicos ainda hoje é a principal abordagem para combater casos de câncer de pulmão. Porém, muitos tumores adquirem resistência a fármacos, dificultando o tratamento e aumentando a reincidência. Na tentativa de otimizar a resposta dos tratamentos e de circunvir problemas como resistência tumoral, novos estudos vem testando a combinação de diferentes fármacos como abordagem terapêutica. Dentre estes, a combinação entre as moléculas de ácido retinóico (AR) e cisplatina apresentaram resultados promissores tanto em ensaios clínicos quanto em modelos de pesquisa básica. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares presentes na interação de ambos. Uma das vias de sinalização altamente relacionada com a resposta tumoral a quimioterápicos é a via do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2). Sendo assim, o objetivo desta dissertação foi investigar e discutir os efeitos moleculares do tratamento combinado de AR e cisplatina em uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar (A549), focando principalmente na via do NRF2. Mais especificamente, foi investigado os efeitos sobre a expressão do NRF2 e de seus genes-alvo, ambiente redox celular, apoptose, autofagia e reparo de fita de DNA por recombinação homóloga (RH). O AR demonstrou ter um efeito inibitório sobre as vias do NRF2 e de RH. Além disso, o AR elevou a produção de espécies reativas e a oxidação de grupamentos sulfidrilas. Combinados, estes efeitos parecem ter contribuído para uma sensibilização ao efeito pró-apoptótico derivado do tratamento com cisplatina. Além do mais, a autofagia também se mostrou elevada nos tratamentos individuais e em conjunto, podendo indicar um possível mecanismo de resistência celular. Nestes resultados, ficou demonstrado diferentes mecanismos por onde o AR pode atuar para potencializar o efeito da cisplatina em células de câncer de pulmão. Além disso, esta dissertação colabora com perspectivas de outros autores sobre abordagens que atuem no ambiente redox celular, na tentativa de combater células tumorais. Portanto, estas informações podem contribuir com outros trabalhos para a otimização do uso do AR associado a cisplatina em pacientes com câncer de pulmão.

ABSTRACT

Chemotherapy is still today the most used strategy to treat lung cancer cases. Meanwhile, many tumors can develop resistance to drugs, suppressing treatment effectiveness and increasing probability of recurrence. As an attempt to optimize treatment response and circumvent problems such as cancer resistance, new studies have been testing the combination of different molecules as therapeutic approach. In this context, the combination of retinoic acid (RA) and cisplatin have presented promising results in clinical trials as well as in basic research models. Although, little is known about the molecular mechanisms underlying both chemicals interaction. One pathway that is highly related to tumor response to chemotherapy is the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) pathway. Thus, the aim of this dissertation is to investigate and discuss the molecular effects of combined RA and cisplatin treatment in a lung adenocarcinoma cell lineage (A549), mainly through NRF2 modulation. More specific, the effects over NRF2 and NRF2-target genes expression, cellular redox environment, apoptosis, autophagy and DNA repair through homologous recombination (HR). RA treatment demonstrated an inhibitory effect over NRF2 and HR activation. Moreover, RA increased reactive species production and the oxidation of sulfhydryl groups. All combined, these effects contributed to cell sensitization to pro-apoptotic effect derived from cisplatin exposure. In addition, autophagy also was increased after individual and combined treatments, indicating a possible cell resistance mechanism. Taken together, these results demonstrated different mechanisms by which RA potentiates cisplatin effects in lung cancer cells. Furthermore, this dissertation corroborates with other authors perspectives about cancer therapies approaches that acts on cellular redox environment. Therefore, these information can contribute with other works on the attempt to optimize RA usage associated with cisplatin in lung cancer patients.

LISTA DE ABREVIACÕES

SCLC: câncer de pulmão de pequenas células

NSCLC: câncer de pulmão de não-pequenas células

SCC: carcinoma de células escamosas

AR: ácido retinóico todo trans

RARs: receptores de ácido retinóico

RAR α : receptor de ácido retinóico subtipo alfa

RAR β : receptor de ácido retinóico subtipo beta

RAR λ : receptor de ácido retinóico subtipo gama

RXRs: receptores X de retinóides

ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase

NRF2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

ER: espécies reativas

GSH: glutathiona reduzida

GPx: glutathiona peroxidase

TXN: tioredoxinas

GR: glutathiona redutase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

KEAP1: kelch-like ECH-associated protein 1

PKC: proteína cinase C

Akt: proteína cinase B

GSK-3: glicogênio sintase cinase 3

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pulmão

1.1.1) Visão global

Com o aumento do consumo de cigarros nas décadas entre 1930 e 1990, casos de câncer de pulmão se tornaram cada vez mais frequentes tornando-o hoje o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em homens e mulheres. Apesar de campanhas antitabagismo e estudos científicos terem contribuído para que o número de casos decaíssem nas últimas décadas, ainda hoje, o câncer de pulmão é o maior causador de óbitos, estimando-se corresponder a um quarto das mortes por câncer em 2017 (American Cancer Society 2017) (Dela Cruz, Tanoue, and Matthay 2011). Apenas 15% dos homens e 21% das mulheres sobrevivem mais de 5 anos após o diagnóstico. Esta baixa taxa de sobrevivência está associada ao fato de que os sintomas normalmente não são perceptíveis até um estágio mais avançado do tumor, levando ao diagnóstico tardio (American Cancer Society 2017). O diagnóstico tardio é diretamente associado a um prognóstico ruim devido ao rápido espalhamento do tumor para diferentes regiões do pulmão, limitando as possibilidades de tratamento (Flood et al. 2004). Hoje em dia o sucesso do tratamento de pacientes com câncer de pulmão depende muito do estágio em que a doença é diagnosticada. Sendo assim, a avaliação de grupos de risco por tomografia computadorizada e a busca por marcadores moleculares que indiquem células precursoras tumorais são, atualmente, os principais meios para que se possa conseguir um diagnóstico precoce, diminuindo o risco de morte dos pacientes. Aliado a isto, existe também uma alta necessidade de se expandir as opções de tratamentos

eficazes em todos estágios da doença, tornando os estudos sobre combinações de estratégias envolvendo quimioterápicos de grande importância (American Cancer Society 2017) (Flood et al. 2004).

1.1.2) Classificações

Os tipos mais comuns de câncer de pulmão são derivados de células do epitélio respiratório (Travis et al. 2015). Estes são divididos em dois grupos principais: câncer de pulmão de pequenas células (do inglês *small cell lung cancer* – *SCLC*) e câncer de pulmão de não-pequenas células (do inglês *non-small cell lung cancer* – *NSCLC*) (Dela Cruz, Tanoue, and Matthay 2011). *SCLC* corresponde a cerca de 13% dos casos de câncer de pulmão (American Cancer Society 2017) e se origina na porção média dos bronquíolos a partir de células neuroendócrinas (Sutherland and Berns 2010). O *NSCLC* corresponde a 84% dos casos e é subdividido em três tipos histológicos principais: carcinoma de células escamosas (do inglês *squamos cell carcinoma* – *SCC*) correspondendo em média a 30% dos casos de câncer de pulmão; adenocarcinoma (39%) e carcinoma de grandes células (15%) (American Cancer Society 2017). O *SCC* tem sua origem no epitélio da traqueia e acredita-se ser proveniente de células basais com alterações genéticas que levam a proliferação descontrolada (Sutherland and Berns 2010). Junto com *SCLC*, este é o tipo mais comum em pacientes fumantes (Herbst, Heymach, and Lippman 2009) já que ocorrem na porção central do pulmão onde se acumulam a maior parte das partículas provenientes do cigarro. Em contrapartida, o adenocarcinoma é o tipo mais comum em pacientes não fumantes (Herbst, Heymach, and Lippman 2009), pois este ocorre em regiões mais periféricas do pulmão sendo proveniente de células surfactantes presentes nos alvéolos,

denominadas de células alveolares do tipo II (Sutherland and Berns 2010). Nos últimos anos houve uma diminuição na incidência de *SCC* e *SCLC* contraposta por um aumento dos casos de adenocarcinoma. Acredita-se que esta alteração está relacionada com uma mudança nos filtros contidos nos cigarros ao longo dos anos. Com uma diminuição nos poros dos filtros as partículas absorvidas tornaram-se menores e, portanto, deixaram de se acumular em regiões mais centrais da via respiratória (traqueia e bronquíolos) e passaram a se acumular nas regiões mais periféricas (alvéolos) (Flood et al. 2004), fazendo com que hoje o adenocarcinoma de células não-pequenas seja o tipo mais comum de câncer de pulmão.

1.1.3) Tratamentos

A abordagem para tratar casos de câncer de pulmão depende principalmente do estágio da doença e do tipo histológico do tumor. Em pacientes com *NSCLC* localizado e não associado a outras estruturas vitais do corpo (ex.: vertebras, coração, traqueia) a cirurgia se torna o procedimento mais utilizado, podendo ser aliada a radioterapia ou quimioterapia. Porém, em casos mais avançados onde o tumor já se encontra em diversas localidades do pulmão a abordagem principal passa a ser através de quimioterapia sozinha, ou em conjunto com terapias alvo ou associada a imunoterapias. Mesmo em casos onde seja possível a remoção cirúrgica do tumor, o tratamento com quimioterápicos antes ou após o procedimento demonstra-se melhorar a taxa de sobrevivência dos pacientes (Flood et al. 2004). Sendo assim, o tratamento com fármacos ainda é o principal recurso para combater o câncer de pulmão. A partir disso, um estudo de metanálise que reuniu diversos ensaios clínicos que utilizavam três grupos principais de quimioterápicos, apontou a cisplatina como tratamento de

maior eficiência em pacientes com a doença, observando-se um aumento de 10% na sobrevivência no período de um ano. Controversamente, agentes alquilantes se mostraram prejudiciais diminuindo a taxa de sobrevivência (Stewart 1995)(Flood et al. 2004). Atualmente também se encontra em fase de estudos a utilização de inibidores de EGFR (*epidermal growth factor receptor*) como alternativa possível no tratamento de NSCLC, tendo apresentado resultados positivos em ensaios clínicos (Flood et al. 2004) tanto sozinho quando em conjunto com outros quimioterápicos.

O uso da cisplatina ou dos seus derivados é classificado como “*platin-based therapies*” justamente por estes possuírem um átomo central de platina na sua estrutura. No meio intracelular, a cisplatina é hidrolisada e se torna um potente eletrófilo, reagindo principalmente com grupos sulfidrilas em proteínas e com bases nitrogenadas nos ácidos nucleicos (Shaloam and Tchounwou 2014). A interação da cisplatina com moléculas de DNA é considerado o principal mecanismo de citotoxicidade da droga. Essa se liga aos resíduos de purinas da dupla-fita bloqueando a divisão das células tumorais e induzindo apoptose. Além do dano ao DNA, a cisplatina também é capaz de induzir apoptose por estresse oxidativo dependendo da dose e tempo de exposição. Isto ocorre principalmente por ela levar a uma depleção de glutathiona e por afetar o funcionamento mitocondrial (Cho et al. 2008) (Shaloam and Tchounwou 2014). Pelo fato de a cisplatina induzir a ativação de diversas vias de resposta a genotoxicidade e estresse oxidativo, é comum que pacientes desenvolvam resistência a este tratamento (Shaloam and Tchounwou 2014). Além do mais, os efeitos citotóxicos não se restringem apenas ao tumor, fazendo com que existam diversos efeitos colaterais como toxicidade renal, náusea e vômito. Portanto, na tentativa de circunvir estes problemas,

a combinação de outras drogas junto ao tratamento com cisplatina tem sido alvo de inúmeros estudos e ensaios clínicos.

1.2 Ácido retinóico

1.2.1) Origem e efeitos

O ácido retinóico todo trans (AR) é a principal forma biologicamente ativa da vitamina A sendo bem conhecido por suas propriedades morfógenas. Este deriva da oxidação do retinol por desidrogenases intracelulares gerando primeiramente a molécula de retinaldeído seguida pela de ácido retinóico (Tang and Gudas 2011). A nível de organismo, o AR atua principalmente regulando processos de desenvolvimento embrionário como neurogênese (Maden 2002) e cardiogênese, entre outros tecidos (Campo-Paysaa et al. 2008)(Duester 2008). Em indivíduos adultos, este é capaz de atuar regulando o crescimento e remodelamento de tecidos (Noy 2010) além de, também, interferir na transmissão sináptica (Liou et al. 2005). A nível celular ele age principalmente causando uma parada no ciclo e alterando o padrão de expressão gênica, tanto através de fatores de transcrição quanto por alterações epigenéticas (Connolly, Nguyen, and Sukumar 2013). Sendo assim, pode-se dizer que a principal propriedade do AR é regular processos de proliferação/diferenciação celular.

1.2.2) Mecanismos de ação

Quando o retinol é liberado pelo fígado na corrente sanguínea ele é captado por células que expressam proteínas capazes de internalizar e metabolizar a vitamina A. Estas transformam o retinol em AR, liberando-o para atuar como sinalizador nas células ao redor (Duester 2008). Diferente de outros sinalizadores célula-célula, o AR

não se liga a receptores na parte externa das células-alvo, mas é internalizado e transportado para o núcleo ligando-se a um grupo de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição (Duester 2008). A principal família de receptores que fazem a transdução desse sinal é chamada de RAR (*retinoic acid receptor*) que é subdividida em três isoformas: RAR α , RAR β e RAR λ . Estes formam heterodímeros com RXRs (*retinoid X receptors*) e ligam-se em regiões promotoras do DNA reprimindo ou ativando a transcrição de diferentes genes, principalmente através de acetilação/desacetilação de histonas (Schenk, Stengel, and Zelent 2014). Em contrapartida, existem trabalhos que mostram a presença dos receptores RAR fora do núcleo da célula, podendo se encontrar na membrana celular ou no citoplasma e levando a ativação de outras cascatas de sinalização não-clássicas do AR (revisado em Tanoury et al. 2013). A ativação de proteínas cinases como ERK e PI3K (Zanotto-Filho et al. 2008) (Masiá et al. 2007) e a modulação de expressão gênica via estresse oxidativo (Pasquali et al. 2008) são exemplos de mecanismos através dos quais o AR pode modificar o fenótipo celular por vias chamadas de não-genômicas. De fato, cada vez mais se tem dado atenção para ações não-genômicas do AR, já que estas contribuem significativamente para os efeitos desta molécula na resposta celular, o que contribui para o aprimorar o seu uso farmacológico.

1.2.3) Ácido retinóico e câncer

Por sua capacidade de inibir a proliferação celular e de induzir a expressão de diversos genes supressores tumorais (Nagpal 2004), o AR passou a ser investigado como possível agente na prevenção e tratamento contra o câncer. Dentre tentativas com diferentes tipos de câncer, pacientes com neuroblastoma de alto risco e leucemia

promieloide aguda foram os que demonstraram melhor resposta ao fármaco, sendo ainda hoje tratados com este (Reynolds et al. 2003)(Ablain and De Thé 2014). Além disso, atualmente o AR tem sido testado em conjunto com outros quimioterápicos já utilizados na clínica, buscando melhorar a eficiência destes e circunvir possíveis efeitos colaterais (Arrieta et al. 2011) (Li et al. 2015)(Zhang et al. 2013). No caso do câncer de pulmão, um estudo clínico de fase II testou o sinergismo do AR com a administração de cisplatina e paclitaxel, demonstrando uma melhora na resposta e sobrevivência dos pacientes com *NSCLC* (Arrieta et al. 2010). Porém, não são todos os casos que respondem de forma positiva ao tratamento com AR, e em alguns contextos celulares este pode até levar a uma hiperproliferação e crescimento tumoral (revisado em Noy 2010). Isto indica que o efeito do AR em células tumorais não depende apenas de quais vias moleculares este atua, mas também de como cada célula é capaz responder a elas. Neste contexto, Tang and Gudas discutem como diversos tumores apresentam as vias de sinalização de retinoides comprometida, sugerindo que a diminuição da resposta celular ao AR é necessária para o desenvolvimento do tecido tumoral (Tang and Gudas 2011). Em conjunto, um trabalho clássico que visou investigar o papel preventivo da vitamina A em grupos de alto risco de desenvolver câncer de pulmão (fumantes intensivos e trabalhadores expostos a asbesto), teve seus estudos interrompidos pois a suplementação com retinol e β -caroteno mostrou aumentar a incidência de tumores e mortalidade dos pacientes. Portanto, apesar de resultados promissores em testes clínicos, é necessário entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na atividade do AR para podermos compreender em quais contextos seu uso pode ser benéfico.

1.3 *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (NRF2)

1.3.1) Função

Um dos principais grupos de moléculas indicadoras do metabolismo celular são os radicais livres. Justamente por estes serem produtos secundários dos processos dentro da mitocôndria eles podem atuar como sinalizadores, conectando o metabolismo energético da célula com suas outras partes. Porém, os radicais livres e outras espécies reativas (ER) têm a capacidade de oxidar biomoléculas, comprometendo suas estruturas e funções. Sendo assim, a célula desenvolveu sistemas capazes de controlar os níveis de ER na tentativa de manter um equilíbrio entre o metabolismo oxidativo e o dano gerado por seus próprios produtos. Não coincidentemente, grande parte deste sistema chamado de antioxidante se utiliza de moléculas reduzidas (ex.: NADPH) provenientes do metabolismo energético para poder reverter o dano oxidativo e neutralizar as ER (FIG 1). Com isso, fica explícito que é necessária uma conversa molecular entre metabolismo e sistema antioxidante dentro da célula. Cumprindo este papel encontramos o fator de transcrição *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (NRF2) que em situações de estresse, onde os níveis de ER começam a se elevar, se torna um dos principais responsáveis pela adaptação celular, reprogramando o metabolismo e induzindo a expressão de enzimas antioxidantes (Hayes and Dinkova-Kostova 2014).

Dentre a diversidade de genes que o NRF2 regula pode-se dizer que os principais grupos funcionais são: enzimas relacionadas com detoxificação de xenobióticos (ex.: NAD(P)H:quinona oxireductase 1 – *NQO1*; glutathione S-transferase – *GSTP1*), metabolismo antioxidantes de tióis (ex.: tioredoxina – *TXN1*; glutamato-cysteina ligase

– *GCLC* e *GCLM*) e metabolismo de carboidratos/geração de NADPH (ex.: glicose-6-fosfato 1-desidrogenase – *G6PD*; enzima málica – *ME1*).

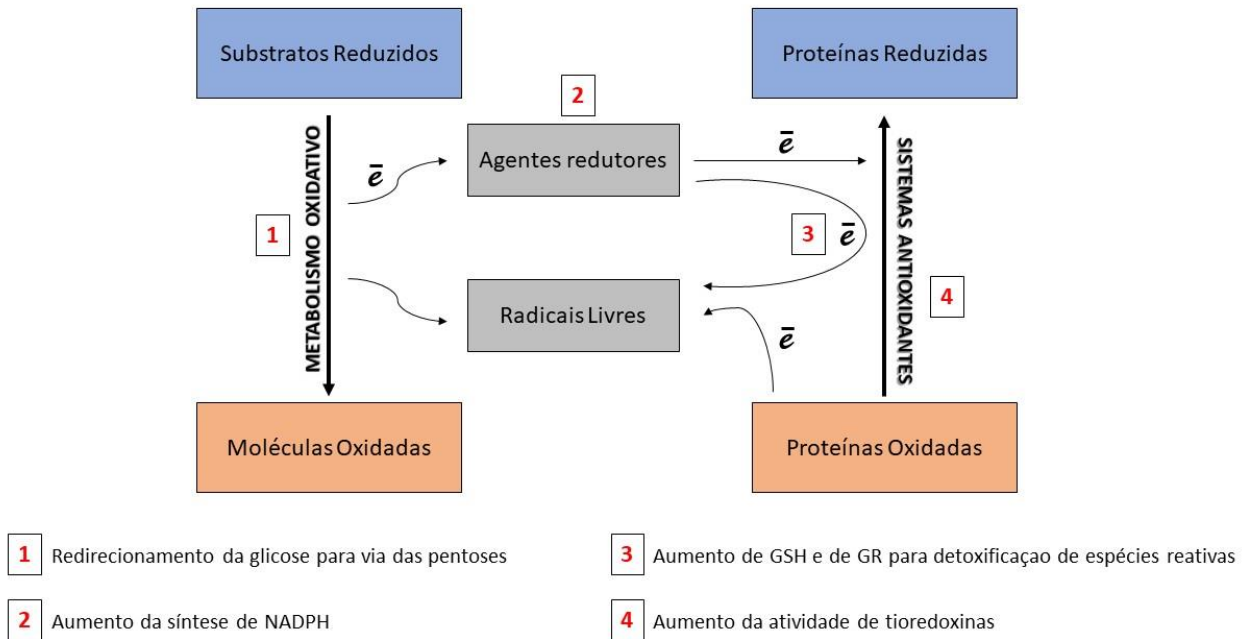


Figura 1. Conexão entre metabolismo oxidativo e sistemas antioxidantes. Números em vermelho representam regulações via ativação do NRF2.

O metabolismo de tióis é um dos principais mecanismos pelo qual o NRF2 regula o ambiente redox celular. A molécula de glutathione (GSH) auxilia como tampão redox dentro da célula doando seus elétrons para neutralizar ER diretamente ou através de enzimas antioxidantes, como no caso da glutathione peroxidase (GPx) e da peroxiredoxina (Shelly C. Lu 2014). Na presença de ER, os grupos sulfidrilas das proteínas podem ser rapidamente oxidados comprometendo a função destas. Neste contexto, a GSH também funciona como doadora de elétrons para tioredoxinas (TXN), que por sua vez reduzem grupamentos sulfidrilas oxidados em proteínas, revertendo o

dano oxidativo (Matsuzawa 2017). A reciclagem de GSH, de oxidada para reduzida, é feita através da enzima glutathione reductase (GR) que retira elétrons do NADPH e passa para a glutathione oxidada, permitindo que esta sirva novamente de substrato para enzimas antioxidantes (Shelly C. Lu 2014). Desse modo, as enzimas responsáveis pela síntese e regeneração de glutathione, junto com as tioredoxinas e tioredoxinas reductases, e as enzimas de síntese de NADPH, possuem elementos de resposta ao NRF2 na região promotora dos seus respectivos genes (Hayes and Dinkova-Kostova 2014).

Além de regular o ambiente redox da célula e de atuar no reparo de danos oxidativos, o NRF2 também está envolvido na síntese de enzimas do metabolismo de xenobióticos, auxiliando na detoxificação de drogas e de outros agentes externos. Sendo assim, pode-se dizer que este fator de transcrição é responsável pelos mecanismos de defesa celular frente a diferentes agentes estressores. Entretanto, o estresse celular também pode surgir como uma resposta fisiológica frente a um estímulo por fatores de crescimento ou influxo de nutrientes. Neste contexto, o NRF2 é capaz de inibir a síntese de ácidos graxos, favorecendo a β -oxidação e o aporte energético para proliferação celular (Hayes and Dinkova-Kostova 2014). Em concordância, este também induz a expressão de enzimas da via das pentoses, redirecionando o metabolismo de carboidratos da glicólise para a biossíntese de purinas necessárias para síntese de ácidos nucleicos. Conseqüentemente, os níveis de NADPH são aumentados, fornecendo substrato para rotas anabólicas e para sistemas de defesa antioxidantes (Mitsuishi et al. 2012)(Hayes and Ashford 2012).

Por estar envolvido com metabolismo redox, metabolismo energético e detoxificação de fármacos, muitos pesquisadores passaram a investigar o papel do NRF2 em patologias como alvo farmacológico de prevenção ou tratamento (Zenkov, Menshchikova, and Tkachev 2013). A partir disso, diversos trabalhos surgiram correlacionando sua atividade com diferentes processos celulares como proliferação (Hayes and Ashford 2012), diferenciação (Zhao et al. 2009), resistência (Homma et al. 2009), autofagia (Pajares et al. 2016) e reparo de dano ao DNA (Jayakumar, Pal, and Sandur 2015). Portanto, entender o funcionamento deste fator de transcrição frente ao tratamento com diferentes fármacos é de grande auxílio na tentativa de compreender e aprimorar as diferentes respostas a estes.

1.3.2) Regulação

Em estado basal, os níveis de NRF2 são mantidos constantes devido a um balanço entre sua síntese e degradação proteossomal (Niture, Khatri, and Jaiswal 2014). O rápido *turnover* da proteína auxilia uma resposta rápida da célula frente a algum estresse. Dessa forma, a maior parte dos mecanismos de regulação do NRF2 são após sua transcrição. Quando expresso, o NRF2 é capturado no citoplasma por duas unidades da proteína *kelch- like ECH associated protein 1* (Keap1) (Itoh et al. 1999), a qual favorece sua ubiquitinação, direcionando-o para degradação (Baird et al. 2013). A maior parte dos ativadores de NRF2, endógenos e exógenos, são moléculas eletrófilas capazes de oxidar diferentes resíduos de cisteína na estrutura da Keap1, levando a sua inativação (Hayes and Dinkova-Kostova 2014). Dessa forma, novas molécula de NRF2 sintetizadas são capazes de translocar para o núcleo da célula e se ligar na fita de DNA em regiões promotoras chamadas de elementos responsivos antioxidantes (do inglês

antioxidants responsive elements – ARE), promovendo a transcrição gênica. Curiosamente, muitas moléculas descritas como antioxidantes (ex.: tocoferóis e alguns fitoquímicos) são, na verdade, fortes ativadores de NRF2, justamente por no seu metabolismo gerarem espécies reativas, levando a uma inativação de Keap1 (Niture, Khatri, and Jaiswal 2014). Além da inativação por eletrófilos, outras proteínas endógenas podem interagir com a Keap1, impedindo-a de se ligar ao NRF2. Este mecanismo de competição permite um *crosstalk* entre atividade de NRF2 e outras vias de sinalização (revisado em Hayes & Dinkova-Kostova 2014). Em conjunto, muitas cinases também influenciam na regulação do NRF2. Por exemplo, a PKC (*Protein kinase C*) é capaz de fosforilar o NRF2 durante sua ativação, favorecendo sua translocação para o núcleo (Niture, Khatri, and Jaiswal 2014). A via da fosfatidilinositol 3-quinase/proteína cinase B (PI3K/Akt) também parece ser uma reguladora positiva da ativação de NRF2, por esta inibir a atividade da glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3), que, por sua vez, regula a fosforilação inibitória de NRF2 diretamente ou através de outros reguladores negativos (revisado por Hayes & Dinkova-Kostova 2014).

1.3.3) NRF2 e câncer

A visão do papel do NRF2 na patologia do câncer já passou por diferentes abordagens na literatura científica (revisado por Lau et al. 2008). Na época em que se começou a descobrir que diferentes xenobióticos eram eficazes contra a ação de agentes mutagênicos, muitos destes foram identificados como potentes ativadores de NRF2. Sendo assim, esta via passou a ser estudada como alvo de ação preventiva contra o câncer. Pelo fato do NRF2 regular a detoxificação de agentes genotóxicos, além de controlar os níveis de ER, as quais também podem promover mutagênese,

este ganhou uma visão positiva como agente citoprotetor. De fato, se sabe que a perda da expressão de NRF2 aumenta a sensibilidade da célula a agentes citotóxicos, fazendo com que moléculas ativadores de NRF2 sejam estudadas no contexto de muitas doenças associadas com estresse oxidativo (Zenkov, Menshchikova, and Tkachev 2013). Porém, nos últimos anos começou-se a perceber que a alta atividade deste fator de transcrição em tecido tumoral está associada a um pior prognóstico. De fato, o efeito citoprotetor do NRF2 que, em células saudáveis, atua contra agentes carcinogênicos, em tecido tumoral auxilia na proliferação celular e resistência do tumor a quimioterapia (Homma et al. 2009). No desenvolvimento tumoral, o aumento da proliferação celular leva a uma maior atividade mitocondrial e, conseqüentemente, um aumento na produção de ER. Desse modo, a alta atividade do NRF2 eleva as defesas antioxidantes e favorece o crescimento do tumor. Em concordância, Denicola et al. 2011 demonstrou que a expressão de diferentes oncogenes é capaz de induzir este aumento na atividade de NRF2, criando um ambiente intracelular menos oxidativo e promovendo a tumorigênese. Mais recentemente, Mitsuishi et al. 2012 provou que a expressão de NRF2 em células tumorais aliada a ativação da via PI3K/Akt, atua redirecionando o metabolismo de glicose e glicina para vias anabólicas, o que ajuda a explicar a associação positiva entre sua atividade com fenótipos tumorais agressivos. No caso de câncer de pulmão, a presença de mutações somáticas ou perdas de alelos que levem a uma baixa atividade de Keap1 é associada com incidência do tumor em pacientes (revisado por Lau et al. 2008), acreditando-se que alta atividade deste fator de transcrição seja essencial para o início da doença. Sendo assim, a via de sinalização do NRF2 hoje é correlacionada com o início, progresso e agressividade do

câncer. Outra associação existente é com a resistência tumoral. Devido a indução de enzimas de detoxificação, sabe-se que o aumento da atividade do NRF2 é um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de resistência a quimioterapias em diversos tipos tumorais. Portanto, o paradoxo entre o papel preventivo e o papel promotor do NRF2 no contexto do câncer faz com que cada vez mais seja necessário entender a diferença entre os mecanismos associados à sua atividade, dando melhor direcionamento ao tratamento de pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a quimioterapia ainda é um dos principais recursos para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão, e que o uso do AR apresentou resultados promissores em ensaios clínicos quando administrado em conjunto com cisplatina, se torna necessário compreender melhor as vias de sinalização que levam a interação de ambos quimioterápicos. Especificamente, a ativação do NRF2 é um fator determinante na resposta de células tumorais ao tratamento com fármacos, tornando-se um importante alvo de investigação.

3. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação foi investigar os efeitos do ácido retinóico na resposta celular ao tratamento com cisplatina na linhagem de adenocarcinoma pulmonar humano, A549.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do AR sobre a atividade do fator de transcrição NRF2.
- Investigar os efeitos do AR sozinho ou associado com cisplatina na proliferação e morte celular.
- Investigar a participação de sistemas antioxidantes dependentes de tióis na interação entre AR e cisplatina.
- Investigar a participação da via de reparo de DNA por recombinação homóloga na interação entre Ar e cisplatina.
- Gerar novas perspectivas para aprimoramento da terapia com AR associada à cisplatina.

PARTE II

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Esta seção do trabalho será apresentada na forma de artigo científico a ser submetido à revista *Biochemical Pharmacology*. Normas de submissão foram retiradas do site: <https://www.elsevier.com/journals/biochemical-pharmacology/0006-2952/guide-for-authors>.

Retinoic acid promotes A549 cells sensitization to cisplatin through downregulation of thiol antioxidant defenses and homologous recombination.

Vitor de Miranda Ramos¹, Juciano Gasparotto¹, Fabrício Figueiró^{1,2}, Amanda de Fraga Dias², Diana Rostirolla¹, Nauana Somensi¹, Helen Tais da Rosa¹, Daniel Pens Gelain^{1,2}, José Cláudio Fonseca Moreira^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

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

Declaration of interest: None

Corresponding Author:

Vitor de Miranda Ramos; Department of Biochemistry, Basic Health Science Institute, University of Rio Grande do Sul. Mail address: Ramiro Barcelos, 2600 – Porto Alegre, RS. 90035-035.

Phone: +55 51 33085578. Email: vitorramos1908@gmail.com.

Abstract

Recent studies have investigated the use of retinoic acid (RA) molecule in combined chemotherapies to cancer cells as an attempt to increase treatment efficiency and circumvent cell resistance. Positive results were obtained in clinical trials from lung cancer patients treated with cisplatin. Meanwhile, the signaling process that results from the interaction of both molecules remains unclear. One of the pathways that RA is able to modulate is the activity of NRF2 transcription factor, which is highly associated with tumor progression and resistance. Therefore, the aim of this work was to investigate molecular mechanism of RA and cisplatin co-treatment in A549 cells, focusing in NRF2 pathway. To this end, we investigated NRF2 and NRF2-target genes expression, cellular redox status, cisplatin-induced apoptosis, autophagy and DNA repair through homologous recombination. RA demonstrated to have an inhibitory effect over NRF2 activation, which regulates the expression of thiol antioxidants enzymes. Moreover, RA increased reactive species production associated with increased oxidation of thiol groups within the cells. DNA repair through homologous recombination was also suppressed by RA pre-treatment. All combined, these effects created a more sensitive cellular environment to cisplatin treatment, increasing apoptosis frequency. Interestingly, autophagy was also increased by combination therapy, suggesting a resistance mechanism by A549 cells. In conclusion, these results provided new information about molecular mechanisms of RA and cisplatin treatment contributing to chemotherapy optimization.

Keywords

Retinoic acid, cisplatin, A549 cells, NRF2, antioxidants systems, homologous recombination.

1. Introduction

Physiologically, retinoic acid (RA) is a signaling molecule derived from Vitamin A which acts on biological process such as early organogenesis and tissue remodeling [1]. Thus, because of its primary ability to promote cell cycle arrest and trigger cell differentiation, RA has been considered an inducer of tumor growth suppressors taking an important part in cancer treatment [2]. More recently, studies have explored the efficiency of RA treatment in combination with other existent chemotherapies as an attempt

to increase tumor response and circumvent resistance mechanisms in models of glioma [3], hepatocellular carcinoma [4], and non-small cell lung cancer (NSCLC) [5]. More specifically, RA has been tested in clinical trials combined with cisplatin and paclitaxel, demonstrating promising results in NSCLC patients response [6][7]. Therefore, these results create an urgent necessity to better understand the molecular pathways involved in cancer cell response to combination treatments. In this context, most of RA effects are associated with the activation of subtypes of retinoic acid receptors (RARs), which are a family of nuclear receptors that regulate gene expression [8]. Besides their transcription factor function, these receptors are able to interact with different kinases outside cell nucleus and regulate several signaling cascade in a very cell type specific manner [9]. These aforementioned mechanisms are part of the non-genomic effects of RA, which are independent of gene expression modulation and have shown to contribute significantly to cellular response.

NRF2 transcription factor regulates the expression of several enzymes related with antioxidants defenses/glutathione metabolism, drug detoxification, and metabolic reprogramming, which makes its activation highly associated with cancer initiation, progression and resistance [10][11][12][13]. Additionally, increased evidences have been correlating NRF2 activation with cellular process that are targets in cancer therapy, such as DNA repair [14] and autophagy [15]. Therefore, there is a necessity for chemicals that can regulate its activation, suppressing its downstream effects. Normally, NRF2 protein is constantly expressed within the cell and directed to degradation by its inhibitor kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). In the presence of nucleophile agents, Keap1 activity is impaired and NRF2 is able to translocate to cell nucleus [16]. Interestingly, RA was shown to modulate NRF2 pathway in some types of cancer cells [17][18], but the molecular mechanisms underlying this effect are still poorly understood.

Taking it into account, the aim of this work was to investigate molecular mechanism by which RA treatment can affect A549 lung cancer lineage cell response to cisplatin chemotherapy, focusing mainly in the activity of NRF2 transcription factor. Particularly, we provided information over RA effects on NRF2 and NRF2-target genes expression, cellular redox status, cisplatin-induced apoptosis and DNA repair through homologous recombination. All together, these data indicate new insights on RA application to cancer treatment, which can contribute to combination therapies optimization.

2. Material and methods

2.1) Chemicals

All-trans retinoic acid (RA), n-acetyl-cystein (NAC), cisplatin, 2',7'- dichlorofluorescin (DCFH-DA), 3-(4,5-dimethyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sulforhodamine B (SRB), propidium iodide (PI), acridine orange (AO), anti-RAD51 (HPA039310) and 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) were purchased from Sigma-Aldrich®. Alexa Fluor® 555 rabbit secondary antibody (A21429), anti-NQO1 primary antibody (M0716672) and MitoSOX™ Red were purchased from Thermo-Fisher Scientific, USA. Electrophoresis reagents were all purchased from Bio-Rad. Anti-NRF2 (M200-3) was purchased from MBL. Anti-Transketolase (sc-390179) and anti-GSPD (sc-373886) primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-β-actin (#3700) and anti-Histone H3 (#4499) were from Cell Signaling Technology.

2.2) Cell culture and treatments

A549 cells (kindly donated by Prof. Claudia Simoes, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil) were grown in culture flasks containing RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1x antibiotic/antimycotic (Gibco™). Flasks were maintained inside a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ atmosphere. When confluence was reached, cells were trypsinized and seeded at culture plates for further experiments. Treatments started 24 hours after seeding. All chemicals were previously diluted in culture medium at higher concentrations before added to each well reaching final concentration. Retinoic acid stock solution was dissolved in DMSO and stored at -20°C protected from light for no longer than two weeks. RA concentration was determined by spectrophotometry read at 351 nm immediately before treatments. N-acetyl-cysteine and cisplatin stock solutions were dissolved in PBS and water, respectively, and stored at -20°C protected from light.

2.3) Intracellular Reactive Species Production (DCF Assay)

Intracellular ROS production was detected using the 2',7'- dichlorofluorescin (DCFH-DA, Sigma) as described [19]. DCFH-DA stock solution was dissolved in DMSO stored at -20 °C protected from light. Before cells were treated, DCFH-DA was diluted to 100 μM in 10 % FBS supplemented medium solution

and added to culture plates. Cells were incubated at 37 °C, with 5% CO₂, and protected from light exposure for 1 hour. After DCFH internalization, the medium was replaced by fresh medium solution and treatments were initiated. When internalized, RS cause DCFH oxidation and it becomes a fluorophore (DCF), which was monitored using a SpectraMAX i3 (Molecular Devices) fluorescence plate reader (Ex/Em=485/532 nm). Results were expressed in relative fluorescence units (RFU). Reactive species production rate was obtained by calculating the Δ of individual hours ($RFU_{\text{hour } x} - RFU_{\text{hour } x-1}$).

2.4) Mitochondrial superoxide indicator (MitoSOX™ Red)

To access mitochondrial superoxide production, live cells were stained with MitoSOX™ Red probe. Stock solution was dissolved in 13 μ L of DMSO reaching the concentration of 5 mM accordingly to the manufacture. By the end of cells exposure to treatments, MitoSOX™ Red probe was diluted in fresh culture medium at a concentration of 20 μ M and then added to the wells reaching final concentration of 2 μ M. The incubation proceeded for 30 minutes before culture medium was removed and cells were washed with 1x PBS. At this point, cells were fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde and washed one more time with 1x PBS. Equal volumes of PBS were added to the cells and images were taken on Microscopy EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific; MA, USA).

2.5) Sulfhydryl groups content

Total reduced thiol (SH) content was determined as an estimation of overall intracellular redox status [20]. First, cells extracts were prepared in phosphate buffer and clarified by centrifugation. Protein content was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo-Fisher) and all samples were diluted to equal protein concentrations. Later, samples were mixed in a slightly alkaline buffer with 10 mM of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) dissolved in ethanol. System was incubated for 1 hour at room temperature allowing DTNB to react with sulfhydryl groups generating a yellowish coloration. Therefore, absorbance was determined at 412 nm and results were expressed as μ mol SH/ mg of protein.

2.6) Sulforhodamine B Assay

The percentage of viable cells was estimated by colorimetric quantification of sulforhodamine B (SRB) stained cells [21]. After treatments, culture medium was removed, and adhered cells were fixated with 10 % trichloroacetic acid (TCA) for 1 h at 4 °C. The precipitated proteins were then stained by 15 min incubation with a 0.4 % (w/v) SRB solution dissolved in 1 % acetic acid. Excess unbound dye was removed by washing with 1 % acetic acid (3-times); stained cells were solubilized in a 10 mM Tris base solution (pH 10.5). Absorbance was quantified using SpectraMAX i3 (Molecular Devices) spectrophotometer set at 515 nm.

2.7) LDH Activity Assay

The leakage of lactate dehydrogenase into culture medium was assessed as a measure of detached cells and losses cell membrane integrity, typically of cultured dead cells. LDH activity was determined by quantifying NADH decay through the conversion of pyruvate in lactate using a commercial kit (Labtest® Brazil). NADH absorbance was obtained by SpectraMAX i3 (Molecular Devices) spectrophotometer set at 340 nm.

2.8) Propidium Iodide Uptake

After treatments, propidium iodide (PI) was added to culture medium at a final concentration of 6 µM followed by one-hour incubation. Since PI is not able to internalize in viable cells, its uptake is an indicative of non-viable cells. Images were taken on a Microscopy EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific; MA, USA).

2.9) MTT assay

A549 cells viability was assessed by the MTT assay. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT and form a purple formazan product. Immediately after treatments, MTT solution prepared in culture medium was added to the cells at a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were incubated for 45 min at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was then removed and 200 µL of DMSO was added to each well of 96-well plate. Samples were homogenized by up-and-down pipetting, and optical density of each well was measured at 560 nm (test) and 630 nm (reference).

2.10) Annexin-V/PI staining

The FITC-Annexin V/PI Detection Kit I (BD Pharmingen™) was used to evaluate the percentage of apoptotic/necrotic cells. After treatments, culture medium was removed, cells were trypsinized and then washed with cold PBS. Next, cells were suspended in 100 µL of 1x Annexin Binding Buffer (ABB) containing FITC-labeled Annexin and Propidium Iodide (kit provided). After 15 minutes incubation, 400 µL of ABB was added to each sample and analyzed by BD FACSCalibur™ cytometer at FL1-H (FITC) and FL3-H (PI) channels. Proper staining controls were used to set the cytometer. Viable (annexin-/PI-), early apoptotic (annexin+/PI-), late apoptotic (annexin+/PI+) and necrotic (annexin-/PI+) cells were assigned and quantified using FLOWJO® software.

2.11) Acridine orange staining

To access the presence of autophagosomes acidification, cells were stained with acridine orange (AO) which, at low pH environments, changes its fluorescence emission from green to red. After treatments, culture medium was collected and cells trypsinized. At this point, cells were pelleted by centrifugation and washed once with cold PBS to remove remaining culture medium. Cells were then suspended in 300 µL of 1x PBS containing 1µg/mL of AO followed by 15 minutes incubation at room temperature. Red/green (FL3-H/FL1-H) fluorescence was measured by BD FACSCalibur™ cytometer and percentage of autophagy positive cells was calculated using FLOWJO® software.

2.12) RT-qPCR

Total RNA extracts were obtained by Trizol® reagent (Invitrogen, USA) isolation protocol. Immediately after isolation, total RNA was quantified and used to cDNA synthesis accordingly to High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo-Fischer, USA). All reactions were performed by 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystem) and samples were amplified in duplicates using 10 ng of cDNA. Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo-Fischer, USA) was used at a final reaction volume of 20 µL per well and specific pair of primers concentration was determined by preceding efficiency tests. All primers sequences had their specificity previously tested by Primer-BLAST tool and

were synthesized by Sigma-Aldrich®, Brazil. Relative quantification was obtained by 2- $\Delta\Delta$ CT method using GNB2L as housekeeping gene. Primers sequences are described in Table 1.

2.13) RAD51 Immunofluorescence

To evaluate homologous recombination response to DNA damage, RAD51 protein was labeled by immunofluorescence indicating nuclear foci formation. First, culture medium from treated cells was removed and 1x PBS was added three times to remove exceeding medium. Afterwards, cells were incubated for 15 minutes with 4% paraformaldehyde followed by three more washes with 1x PBS. Fixed cells were then permeabilized and blocked by adding pre-incubation solution (1x PBS, 0,15% Triton X-100, 5% FBS) for 1 hour at room temperature. At this point, anti-RAD51 primary antibody solution (1x PBS, 0,15% Triton X-100, 3% FBS, antibody 1:300) was added and incubated overnight at 4°C with mild agitation. Next, four washes of 10 min shaking were performed with 1x PBS containing 0,1% Triton X-100 (wash solution). Fluorescent secondary antibody solution (1x PBS, 0,15% Triton X-100, 3% FBS, anti-rabbit Alexa Fluor 555® 1:500) was added to the cells for 2 hours at room temperature with agitation followed by four washes with wash solution. Finally, DAPI solution (1x PBS, 0,15% Triton X-100, 3% FBS, DAPI 1:500) incubation occurred for 5 min with agitation. Three more washes were made before fluorescence imaging medium was added to the wells. Images were taken on Microscopy EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific; MA, USA).

2.14) Nuclear extraction

Nuclear protein extracts isolation was performed as previously described [22]. After isolation, protein content was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo-Fisher) and samples were prepared for western blot analyses.

2.15) Immunoblotting

A549 cells protein lysate was prepared in 2x Laemli-sample buffer containing 10% of 2-mercaptoethanol. Equal amounts of protein were electrophoresed using self-prepared 10 % SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, GE Healthcare Lifesciences) using the

Trans-blot® SD transfer cell (Bio-Rad). Membranes were then incubated in Tris-buffered saline Tween-20 [TBS-T; 20 mM Tris– HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20] containing 5 % (w/v) BSA for 1 hour at room temperature. Primary antibodies were diluted (1:1000) in TBS-T with 5% dissolved BSA and incubated overnight at 4°C. Afterwards, membranes were washed and incubated for 2 hours at room temperature with specie-specific HRP-conjugated secondary antibodies (1:3000 dilution in TBS-T). The bands were detected using a CCD camera (GE ImageQuant LAS 4000) by adding SuperSignal® West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). Densitometry was quantified by ImageJ software.

2.16) Cell Cycle

First, cells were trypsinized, centrifuged and washed with 1x cold PBS. Then, cell pellet was suspended in 500 µL of permeabilization buffer (10mM PBS, 0.1% v/v IGEPAL, 1 mg/mL spermine, 50 µg/mL RNase, and 4 µg/mL PI, pH 7.4). Cells were incubated for 10 minutes before PI fluorescence was determined by FACSCalibur™ cytometer. DNA content and cell cycle analyses were performed by FLOWJO® software.

2.17) Statistical analysis

Statistical tests were undertaken using GraphPad Prism 7 software. student's t test was applied to compare two groups (one parameter). Two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test was applied to compare multiple groups (two parameters). $P < 0.05$ was considered statistically significant. Results are expressed by means \pm SEM. *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$; ***= $P < 0.001$. All experiments were performed at least three individual times.

3. Results

3.1) Retinoic acid modulates NRF2 and NRF2-target genes expression in A549 cells.

At first, RA effects on A549 cells viability were tested in order to determine proper dosage and exposure time. Therefore, cells were treated with 10, 20 or 40 µM of RA for 24, 48 or 72 hours before the percentage of viable cells was quantified by SBR assay (FIG 1A). RA treatment was able to reduce the percentage of viable cells in a dose and time dependent manner (Fig. 1A and Fig. 1B – phase contrast)

when compared to DMSO-treated cells (vehicle control). In addition, no significant membrane disruption was evident after 72 hours as shown by PI staining (Fig. 1B). Thus, the effect of RA on A549 cells number (Fig. 1A) is probably due to an inhibition in cell proliferation rather than a result from cells death, as previously published [5]. Between 48 and 72 hours, there was no significant change in relative cell number (Fig 1A), suggesting that AR effects were more evident until 48 hours. Therefore, we excluded 72 hours time point from further experiments and opted to use an intermediary concentration (20 μ M), since it is well known that high RA concentrations can cause cytotoxic effects *in vivo* and *in vitro* [23][24].

To access the effects of RA on NRF2 activity, RT-qPCR was conducted for NRF2 target genes. The expression of genes related with thiol antioxidant systems (*GCLC*, *GCLM*, *TXNRD1*), detoxification enzymes (*NQO1*, *GSTP1*) and metabolic reprogramming/NADPH generation (*GSPD*, *TALDO1*, *TKT*, *ME1*) was quantified after 24 and 48 hours of RA exposure. After 24 hours of treatment, three (*NQO1*, *GCLC* and *GCLM*) of ten evaluated genes showed significant decreased expression in RA group compared to DMSO group (Fig. 1C). Moreover, all analyzed genes, including NRF2 gene itself (*NFE2L2*), showed significantly decreased expression after 48 hours (Fig. 1C), indicating an inhibitory effect of RA over NRF2 activity in A549 cells. In order to confirm mRNA expression results significance, the immunocontent of NRF2, NQO1, GSPD and Transketolase (TKT) proteins were measured by western blot analyses. This treatment was conducted for 48 hours with 10 and 20 μ M RA. Interestingly, 10 μ M RA showed no substantial effect on NQO1, TKT and NRF2 immunocontent, while decreasing G6PD protein (Fig. 1D - 10 μ M). In contrast, 20 μ M RA reduced all four proteins immunocontent in comparison with DMSO control (Fig. 1D – 20 μ M), corroborating with RT-qPCR results. Last of all, the presence of NRF2 in cell nucleus was investigated as an indicative of its activity. As expected, RA treatment decreased nuclear NRF2 protein in A549 cells after 48 hours (Fig. 1E). Taken together, these results demonstrate that RA, at concentration of 20 μ M, is able to inhibit NRF2 protein expression after 48 hours as well as downregulate NRF2 target genes in A549 cells.

3.2) Retinoic acid alters cellular redox environment

Knowing that RA can promote intracellular reactive species (RS) production in different cell types [23][22], and that NRF2 is a major regulator of cell's redox status [25], we decided to investigate RA

effects on cellular redox environment. To this end, intracellular RS production was indirectly measured by DCFH oxidation. In the first hour, RA treatment significantly increased reactive species production rate in a dose dependent manner (Fig. 2A and 2B - 1 hour), which remained significant in the following hour (Fig. 2B - 2 hours). For six hours of RA exposure, no significant change in the RS production rate was observed compared to DMSO group (Fig. 2B - 6 hours). Next, we investigated mitochondrial superoxide (O_2^-) generation. Cells treated with RA for 3 hours showed greater O_2^- production than cells treated with DMSO (Fig. 2C – 3 hours). In contrast, when the end point was extended to 6 hours no significant difference was observed between groups (Fig. 2C – 6 hours), corroborating with DCF assay results. Thus, it is evident that RA treatment induced a peak of RS production at initial hours within the cells, when it starts to decrease in the following hours, returning to control levels near 6 hours.

Considering RA-induced downregulation of thiol antioxidant enzymes expression (Fig. 1C) and increased RS production (Fig 2A, B, C), we quantified total sulfhydryl groups (R-SH) in A549 cells treated with RA for 24 and 48 hours. As result, we found lower concentration of reduced sulfhydryl groups in RA treated cells compared to DMSO (Fig. 2D), indicating an oxidized cellular state.

3.3) Retinoic acid affects homologous recombination in cisplatin-induced DNA damage.

Considering previous results, A549 cells were pre-treated with RA (20 μ M) for 48 hours before cisplatin addition on further experiments. It has been reported that RA-induced downregulation of NRF2 activity compromises homologous recombination (HR) in A549 cells treated with radiation [14]. Therefore, RAD51 (a HR signaling protein) foci formation was investigated in our model by immunofluorescence. Initially, no difference was observed in RA-treated cells in comparison to DMSO (Fig. 3A – Control line). Whereas, 24 hours cisplatin (10 μ g/mL) treatment increased RAD51 foci number in the nucleus, although this increase was less evident in RA pre-treated cells (Fig 3A – Cisplatin line). Next, the mRNA content of RAD51 and one of its regulator proteins, BRCA2, was quantified. NQO1 expression was measured simultaneously as an indication of NRF2 activity. RA was able to significantly reduce all three genes expressions in control and cisplatin-treated cells (Fig 3B – Control and Cisplatin groups). These results were also observed in proteins immunocontent as shown by western blot (Fig 3C).

3.4) Retinoic acid pre-treatment changes cisplatin-induced cell cycle arrest.

To better understand the effects of RA on cisplatin-induced DNA repair we decided to investigate cell cycle progression, since its influence on the choice of DNA-repair pathway is crucial [26]. RA alone decreased the percentage of S-phase cells, although this change was not statistically significant (Fig 4). Further, cisplatin treatment induced a major arrest of cell cycle in the S-phase, reducing the percentage of cells in the G₀/G₁-phase (Fig 4). Curiously, when cells were pre-treated with RA, the percentage of arrested cells in the S-phase was significantly lower than cisplatin alone, leading to an increase in the G₀/G₁-phase (Fig 4). Therefore, these results reveal that RA pre-treatment is able to regulate A549 cell cycle progression of cisplatin-treated cells.

3.5) Retinoic affects cisplatin-induced apoptosis and cell autophagy

To evaluate the effects of RA-mediated downregulation of NRF2/thiol-defenses and homologous recombination suppression on cell sensitivity to cisplatin, we performed the following experiments. First, cell viability was accessed by MTT assay. Combined treatment of cisplatin and RA at increasing concentrations reduced cells viability to a greater extent than treatments alone (Fig. 5A). It is worth noting that no potentiation effects were observed in this assay. Regarding LDH activity assay, RA treated cells showed no significant difference from DMSO group (Fig 5B – Control group), indicating no cytotoxic effects at this concentration as previously observed (Fig 1B). Meanwhile, cisplatin treatment at 10 µg/mL was able to increase LDH leakage within 48 hours. Importantly, this increase was significantly higher in RA pre-treated cells than in DMSO pre-treatment (Fig. 5B – Cisplatin group). Considering that RA alone had zero increase compared to DMSO, that cisplatin alone showed 100% increase and combination (cisplatin+RA) showed 200% increase, we postulated that RA potentiated cisplatin effect in the percentage of cell death. To investigate the influence of thiol antioxidants, NAC (5 mM) was added to the cells 30 minutes before cisplatin. Interestingly, NAC treatment at this concentration had no significant effect on cisplatin-induced cell death (Fig. 5B – Cisplatin+NAC group – DMSO), but significantly protected from RA pre-treatment (Fig. 3B – Cisplatin+NAC group – RA).

The frequency of apoptotic/necrotic cells was quantified by Annexin V/PI staining 24 hours after cisplatin treatment. Representative populations are presented in Fig 5 C(II) and total apoptosis

(early+late) results are shown in graph C(I). RA alone did not induced apoptosis in A549 cells. Meanwhile, when combined with cisplatin treatment, it elevated the percentage of apoptotic cells to about 20% in comparison to 15% of cisplatin treatment alone (Fig 5C). Also, NAC co-incubation with cisplatin inhibited RA pre-incubation effect (Fig. 5C), suggesting that RA-induced sensitivity of A549 cells is in fact correlated with thiol antioxidants systems.

Lastly, the induction of autophagy in A459 cells was evaluated in the presence of same treatments. RA alone increased about 12% the frequency of autophagy-positive cells in comparison to DMSO (Fig. 5D). As expected, cisplatin alone increased autophagic cells frequency in the population. Also, RA pre-treated cells plus cisplatin showed higher frequency of autophagy when compared to cisplatin alone for 24 hours (Fig. 5D – Cisplatin vs. Cisplatin+RA), but without potentiation effect. Curiously, NAC co-incubation increased in about 10% the number of autophagic cells in both, cisplatin and cisplatin + RA in comparison to the respective groups (Fig. 5D).

4. Discussion

In the present study, RA treatment at pharmacological concentrations presented inhibitory effects over A549 cells proliferation, NRF2 expression and activity (Section 3.1), as well as downregulation of HR signaling (Section 3.3 and 3.4). Moreover, this approach also led to increased RS production, in part derived from mitochondrial superoxide generation, concomitant with increased thiol groups oxidation (Section 3.2). All combined, these effects provided a more sensitive cellular environment towards cisplatin treatment, increasing its efficacy in triggering cell apoptosis (Section 3.5).

The response to RA treatment can vary drastically depending on cells phenotype. For instance, a low concentration of 0.5 μM can induce apoptosis in Sertoli [23] and MCF-7 [27] cells, whereas in other tissues RA is able to increase cells proliferation and promote cell survival (revised by [28]). In this work, A549 cells responded with a significant decreased proliferation and no lethal toxicity when exposed to intermediary doses (10, 20 and 40 μM). Noteworthy, other authors calculated an IC_{50} of ~ 200 μM to RA effects on A549 cell proliferation [5], while our conditions had similar result with 40 μM . Not only cell viability has a variable response, but also RA modulation of NRF2 pathway has been investigated in

different models demonstrating variable cell-to-cell outcome. While in mice and human hepatocytes [24], as well as in some neuroblastoma lineages [18][29] RA treatment alone upregulated NRF2-target genes, an inhibitory effect is observed in glioma [3] and mammary carcinoma MCF-7 cells [17]. Our results demonstrated that RA has an inhibitory effect over NRF2 pathway in A549 cells, agreeing with other authors proposal [14]. After 48 hours, not only NRF2-target genes expressions were downregulated, but also NRF2 mRNA and protein content. This is of great significance because the initiation and progression of many lung cancers are associated with Keap-1 mutations [30] that allow NRF2 to translocate freely to cell nucleus increasing its promoter activity. Thus, downregulation of its gene expression is an important target for cancer prevention and therapy. Meanwhile, the fact that *NQO1*, *GCLC* and *GCLM* genes were downregulated after 24 hours of RA treatment (Fig 1C), leads us to think that other mechanisms are involved in NRF2 inhibition that not only through its gene expression regulation. In fact, the reduced NRF2 content could be a consequence of a previous inhibition of NRF2 promoter activity inside cell's nucleus, since this transcription factor is able to autoregulate its expression [31]. In line with this thought, it is known that RA can promote retinoic acid receptor alfa (RAR α) interaction with NRF2 protein, inhibiting its activation in MCF-7 cells [17]. Also, RXR α can act as NRF2 inhibitor through direct protein-protein interaction in A549 cells even in the absence of ligands [32]. Therefore, more studies are necessary to investigate the role of RXR and RAR receptors on RA modulation of NRF2 pathway.

The participation of RS on RA signaling has been little explored in scientific literature, especially in the context of cancer treatment. In fact, most of the mechanism discussed are related to retinoid receptors and epigenetic modulations (revised in [8]). On this bias, few research articles have demonstrated the modulation of mitochondrial function as well as the involvement of RS on neuroblastoma cells response to RA-mediated differentiation [33][34][29]. Also, it has been reported that RA can induce oxidative damage and loss of mitochondrial membrane potential in hepatocytes, particularly in siNRF2 transfected cells [24]. In line with these observations, we found that RA treatment increased RS production in A549 cells (Fig. 2). This increase was correlated with generation of mitochondrial superoxide which culminated in thiol groups oxidation. Furthermore, glutathione synthesis and thioredoxin activity were likely compromised since the expression of glutamate cysteine ligase (GCL) and thioredoxin reductase enzymes were decreased (Fig. 1C). Mitochondrial superoxide, when

detoxified, is converted to hydrogen peroxide (H_2O_2) by superoxide dismutase (SOD) enzyme, and then converted to oxygen and water mainly by glutathione peroxidase (GPx) activity, which depends on reduced glutathione molecules (GSH) [35]. Thus, we may assume that an increase on superoxide production associated with glutathione depletion, leads to an accumulation of H_2O_2 which is highly reactive with protein thiol groups. In conclusion, RA treatment created a less protected cellular environment against redox-acting agents by downregulating NRF2 activity and increasing mitochondrial superoxide production.

Inter-strand DNA crosslink has a significant role in cisplatin cytotoxicity [36][37], which is opposed by the cell through DNA repair pathways such as homologous recombination (HR). Here we have demonstrated that RA pre-treatment downregulated RAD51 and BRCA2 expression in A549 cells, simultaneously to suppressing RAD51 foci formation after cisplatin exposure (Fig. 4). Simultaneously, it also decreased NQO1 expression and protein content. NRF2 protein has been shown to promote the expression of DNA repair related proteins including the expression of RAD51 in A549 cells exposed to radiation [14][38]. Thus, it is proposable that suppressed HR is linked to NRF2 inhibition in RA pre-treated cells. Further, HR is a processes virtually exclusively of cell cycle in the late S-phase and G2-phase due to the necessity of sister chromatids to its correct function [38][26]. Thus, the effect of RA on decreasing the percentage of S-phase cells after cisplatin treatment, probably contributed to HR suppression. Other double-strand DNA repair pathways can be recruited in the G0/G1 phases like nonhomologous end joining (NHEJ) process. Though, this mechanism is more likely to fail correct DNA repair than HR, which can increase apoptotic fate.

In addition to DNA cross-link, oxidative stress is known to play an essential role in cisplatin cytotoxicity, while glutathione antioxidant systems are the main cellular defense against it [36]. The fact that NAC co-incubation was able to completely reverse RA pre-treatment sensitization to cisplatin (Fig 3B and C), corroborates the idea that downregulation of thiol-dependent antioxidants defenses through NRF2 inhibition is an essential mechanism by which RA may contribute to apoptotic effects of cisplatin. In agreement, it has been demonstrated that NRF2 inhibition through siRNA potentiates cisplatin cytotoxicity in A549 cells [10]. In contrast, oxidative stress can also trigger cytoprotective autophagic process,

causing cancer resistance to apoptosis [39][40]. In line with this observation, autophagic cells population was increased by cisplatin treatment alone. Also, RA alone increased AO red fluorescence (Fig. 3D), suggesting autophagosome activation. This result agrees with other authors proposal that autophagy is a required mechanisms to RA-mediated cell differentiation [41] and counteracts apoptosis in breast cancer cells [42]. Therefore, separate treatments promoted autophagic response likely contributing to cell survival. Furthermore, RA+Cisplatin group presented a higher percentage of autophagy than individual groups, although this value (43%) was inferior to the sum of both individually (49%). As possible explanation, RS-mediated protective autophagy in cancer cells has been associated with activation of p62 protein, which recruits oxidized proteins to autophagosomes for degradation. Additionally, NRF2 pathway was shown to promote p62 expression, creating a crosstalk between antioxidants defenses and protective autophagy, counteracting oxidative damage (revised by [43]). Thus, downregulation of NRF2/antioxidants systems by RA could be suppressing autophagic response and simultaneously leading to RS accumulation after cisplatin exposure, overcoming cell resistance and promoting apoptotic pathways activation [43]. This observation agrees with the fact that NAC incubation suppressed apoptosis and promoted autophagy, likely by regulating RS levels and compensating thiol antioxidants systems downregulation. Taken together, these results are in line with other authors idea that RS, when at controlled levels, can promote activation of resistance pathways and contribute to tumor progression. Instead, when this level overcomes cells defenses, it can promote cell death [43]. Noteworthy, the use of pharmacological inhibitor targeting autophagic pathways can be an alternative to overcome cancer resistance and increase RA chemotherapy efficiency in this context.

5. Conclusion

In this study, we provide important mechanisms by which RA contributes to cisplatin cytotoxicity in A549 cells, majorly through downregulation of NRF2/thiol-antioxidants systems and suppressing homologous recombination signaling. NRF2 elevated activity is highly correlated with poor prognosis in lung cancer, making RA an important effector in this context. Additionally, we demonstrated the redox environment has an essential role on cell response to these chemotherapies, and further attention should be given to this mechanism. In fact, Galadari, S. *et al.* recently discuss that combination of RS generating

chemicals allied to antioxidants systems inhibitors might be a promising strategy in cancer treatment [43]. Lastly, the use of pharmacological inhibitor targeting autophagic pathways can be an alternative to increase RA chemotherapy efficiency. In conclusion, this work agrees with scientific literature where RA administration can ameliorate cisplatin chemotherapy in NSCLC patients and further mechanisms of this effect should be investigated.

6. Acknowledgments

We acknowledge the Brazilian funds CAPES, FAPERGS/ CNPq – PRONEX 16/2551-0000 499-4 and PPG-Bioquímica/UFRGS.

7. References

- [1] G. Duester, "Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis," *Cell*, vol. 134, pp. 921–931, 2008.
- [2] S. Nagpal, "Retinoids: Inducers of tumor/growth suppressors," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 123, pp. 1–2, 2004.
- [3] L. I. N. Shi, H. Li, and Y. Zhan, "All - trans retinoic acid enhances temozolomide - induced autophagy in human glioma cells U251 via targeting Keap1 / Nrf2 / ARE signaling pathway," pp. 2709–2714, 2017.
- [4] Y. Zhang, D. X. Guan, J. Shi, H. Gao, J. J. Li, J. S. Zhao, L. Qiu, J. Liu, N. Li, W. X. Guo, J. Xue, F. G. Zhou, M. C. Wu, H. Y. Wang, D. Xie, and S. Q. Cheng, "All-trans retinoic acid potentiates the chemotherapeutic effect of cisplatin by inducing differentiation of tumor initiating cells in liver cancer," *J. Hepatol.*, vol. 59, no. 6, pp. 1255–1263, 2013.
- [5] B. Li, M.-H. Gao, X.-M. Chu, L. Teng, C.-Y. Lv, P. Yang, and Q.-F. Yin, "The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycoerythrin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 749, pp. 107–114, 2015.
- [6] O. Arrieta, C. H. González-De La Rosa, E. Aréchaga-Ocampo, G. Villanueva-Rodríguez, T. L. Cerón-Lizárraga, L. Martínez-Barrera, M. E. Vázquez-Manríquez, M. Á. Ríos-Trejo, M. Á. Álvarez-Avitia, N. Hernández-Pedro, C. Rojas-Marín, and J. De La Garza, "Randomized phase II Trial of all-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 21, pp. 3463–3471, 2010.
- [7] O. Arrieta, N. Hernandez-Pedro, M. C. Fernandez-Gonzalez-Aragon, D. Saavedra-Perez, A. D. Campos-Parra, M. A. Rios-Trejo, T. Ceron-Lizarraga, L. Martinez-Barrera, B. Pineda, G. Ordonez, A. Ortiz-Plata, V. Granados-Soto, and J. Sotelo, "Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer.," *Neurology*, vol. 77, no. 10, pp. 987–995, 2011.
- [8] R. M. Connolly, N. K. Nguyen, and S. Sukumar, "Molecular pathways: Current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 7, pp. 1651–1659, 2013.
- [9] T. Schenk, S. Stengel, and A. Zelent, "Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy," *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 11, pp. 2039–2045, 2014.
- [10] S. Homma, Y. Ishii, Y. Morishima, T. Yamadori, Y. Matsuno, N. Haraguchi, N. Kikuchi, H. Satoh, T. Sakamoto, N. Hizawa, K. Itoh, and M. Yamamoto, "Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 10, pp. 3423–3432, 2009.

- [11] G. M. DeNicola, F. A. Karreth, T. J. Humpton, A. Gopinathan, C. Wei, K. Frese, D. Mangal, K. H. Yu, C. J. Yeo, E. S. Calhoun, F. Scrimieri, J. M. Winter, R. H. Hruban, C. Iacobuzio-donahue, S. E. Kern, I. A. Blair, and D. A. Tuveson, "Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis.," *Nature*, vol. 475, no. 7354, pp. 106–109, 2011.
- [12] Y. Mitsuishi, K. Taguchi, Y. Kawatani, T. Shibata, T. Nukiwa, H. Aburatani, M. Yamamoto, and H. Motohashi, "Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 1, pp. 66–79, 2012.
- [13] I. I. C. Chio, S. M. Jafarnejad, M. Ponz-Sarvisé, Y. Park, K. Rivera, W. Palm, J. Wilson, V. Sangar, Y. Hao, D. Öhlund, K. Wright, D. Filippini, E. J. Lee, B. Da Silva, C. Schoepfer, J. E. Wilkinson, J. M. Buscaglia, G. M. DeNicola, H. Tiriác, M. Hammell, H. C. Crawford, E. E. Schmidt, C. B. Thompson, D. J. Pappin, N. Sonenberg, and D. A. Tuveson, "NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer," *Cell*, vol. 166, no. 4, pp. 963–976, 2016.
- [14] S. Jayakumar, D. Pal, and S. K. Sandur, "Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 779, pp. 33–45, 2015.
- [15] M. Pajares, N. Jiménez-Moreno, Á. J. García-Yagüe, M. Escoll, M. L. de Ceballos, F. Van Leuven, A. Rábano, M. Yamamoto, A. I. Rojo, and A. Cuadrado, "Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes," *Autophagy*, vol. 12, no. 10, pp. 1902–1916, 2016.
- [16] L. Baird, D. Llères, S. Swift, and A. T. Dinkova-kostova, "Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex," *PNAS*, vol. 110, no. 38, pp. 15259–15264, 2013.
- [17] X. J. Wang, J. D. Hayes, C. J. Henderson, and C. R. Wolf, "Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 49, pp. 19589–19594, 2007.
- [18] F. Zhao, T. Wu, A. Lau, T. Jiang, Z. Huang, X.-J. Wang, W. Chen, P. K. Wong, and D. D. Zhang, "Nrf2 promotes neuronal cell differentiation.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, no. 6, pp. 867–79, Sep. 2009.
- [19] H. Wang and J. Joseph, "Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 27, no. 99, pp. 612–616, 1999.
- [20] G. L. Ellman, "Tissue Sulfhydryl Groups," *Arch. Biochem. abd Biophys.*, vol. 82, pp. 70–77, 1959.
- [21] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, a Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M. R. Boyd, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, pp. 1107–1112, 1990.
- [22] V. de Miranda Ramos, A. Zanotto-Filho, M. A. de Bittencourt Pasquali, K. Klafke, J. Gasparotto, P. Dunkley, D. P. Gelain, and J. C. F. Moreira, "NRF2 Mediates Neuroblastoma Proliferation and Resistance to Retinoic Acid Cytotoxicity in a Model of In Vitro Neuronal Differentiation," *Mol. Neurobiol.*, vol. 53, no. 9, pp. 6124–6135, 2016.
- [23] A. Zanotto-Filho, M. Cammarota, D. P. Gelain, R. B. Oliveira, A. Delgado-Cañedo, R. J. S. Dalmolin, M. a B. Pasquali, and J. C. F. Moreira, "Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation," *Toxicol. Vitr.*, vol. 22, pp. 1205–1212, 2008.
- [24] K. P. Tan, K. Kosuge, M. Yang, and S. Ito, "NRF2 as a determinant of cellular resistance in retinoic acid cytotoxicity," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 45, no. 12, pp. 1663–1673, 2008.
- [25] N. K. Zenkov, E. B. Menshchikova, and V. O. Tkachev, "Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target.," *Biochem. Biokhimiia*, vol. 78, no. 1, pp. 19–36, 2013.
- [26] D. Branzei and M. Foiani, "Regulation of DNA repair throughout the cell cycle," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 297–308, 2008.
- [27] L. J. Donato and N. Noy, "Suppression of Mammary Carcinoma Growth by Retinoic Acid: Proapoptotic Genes Are Targets for Retinoic Acid Receptor and Cellular Retinoic Acid – Binding Protein II Signaling," no. 18, pp. 8193–8200, 2005.
- [28] N. Noy, "Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis.," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 30, pp.

201–217, 2010.

- [29] M. A. de Bittencourt Pasquali, V. M. de Ramos, R. D. O. Albanus, A. Kunzler, L. H. T. de Souza, R. J. S. Dalmolin, D. P. Gelain, L. Ribeiro, L. Carro, and J. C. F. Moreira, “Gene Expression Profile of NF- κ B, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid.,” *Mol. Neurobiol.*, Dec. 2014.
- [30] A. Lau, N. F. Villeneuve, Z. Sun, P. K. Wong, and D. D. Zhang, “Dual roles of Nrf2 in cancer,” *Pharmacol. Res.*, vol. 58, pp. 262–270, 2008.
- [31] J. D. Hayes and A. T. Dinkova-Kostova, “The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, no. 4, pp. 199–218, 2014.
- [32] H. Wang, K. Liu, M. Geng, P. Gao, X. Wu, Y. Hai, Y. Li, Y. Li, L. Luo, J. D. Hayes, X. J. Wang, and X. Tang, “RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 10, pp. 3097–3108, 2013.
- [33] L. Schneider, S. Giordano, B. R. Zelickson, M. S. Johnson, G. A. Benavides, X. Ouyang, N. Fineberg, V. M. Darley-Usmar, and J. Zhang, “Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 2007–17, Dec. 2011.
- [34] A. Kunzler, F. Zeidán-Chuliá, J. Gasparotto, C. S. Girardi, K. Klafke, L. L. Petiz, R. C. Bortolin, D. C. Rostrolla, A. Zanotto-Filho, M. A. de Bittencourt Pasquali, P. Dickson, P. Dunkley, J. C. F. Moreira, and D. P. Gelain, “Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 54, no. 9, pp. 6903–6916, 2017.
- [35] M. D. Shelly C. Lu, “Glutathione Synthesis,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1830, no. 5, pp. 3143–3153, 2014.
- [36] D. Shaloam and P. B. Tchounwou, “Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 740, pp. 364–378, 2014.
- [37] S. O’Grady, S. P. Finn, S. Cuffe, D. J. Richard, K. J. O’Byrne, and M. P. Barr, “The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 40, no. 10, pp. 1161–1170, 2014.
- [38] K. R. Sekhar and M. L. Freeman, “Nrf2 promotes survival following exposure to ionizing radiation,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 88, no. Part B, pp. 268–274, 2015.
- [39] L. Zhang, J. Li, J. Ma, X. Chen, K. Chen, Z. Jiang, L. Zong, S. Yu, X. Li, Q. Xu, J. Lei, W. Duan, W. Li, T. Shan, Q. Ma, and X. Shen, “The Relevance of Nrf2 Pathway and Autophagy in Pancreatic Cancer Cells upon Stimulation of Reactive Oxygen Species,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016.
- [40] Z. J. Yang, C. E. Chee, S. Huang, and F. A. Sinicrope, “Autophagy modulation for cancer therapy,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 11, no. 2, pp. 169–176, 2011.
- [41] N. Orfali, T. R. O’Donovan, M. J. Nyhan, A. Britschgi, M. P. Tschan, M. R. Cahill, N. P. Mongan, L. J. Gudas, and S. L. McKenna, “Induction of autophagy is a key component of all-trans-retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells and a potential target for pharmacologic modulation,” *Exp. Hematol.*, vol. 43, no. 9, pp. 781–793, 2015.
- [42] D. Brigger, A. M. Schläfli, E. Garattini, and M. P. Tschan, “Activation of RAR α induces autophagy in SKBR3 breast cancer cells and depletion of key autophagy genes enhances ATRA toxicity,” *Cell Death Dis.*, vol. 6, no. 8, pp. 1–10, 2015.
- [43] S. Galadari, A. Rahman, S. Pallichankandy, and F. Thayyullathil, “Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 104, no. August 2016, pp. 144–164, 2017.

Table 1. RT-qPCR human primers sequences.

Tables

Gene name	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<i>NQO1</i>	CCTTGTGATATTCCAGTTCCCC	AGGGTCCTTTGTCATACATGG
<i>GCLC</i>	AAAAGTCCGTTGGTCCTG	GTTTTCGCATGTTGGCCTC
<i>GCLM</i>	ACTAGAAGTGCAGTTGACATGG	AGGCTGTAAATGCTCCAAGG
<i>GSTP1</i>	TTGGGCTCTATGGGAAGGAC	GGGAGATGTATTTGCAGCGGA
<i>ME1</i>	TGCCTATTGTTTATACTCCCACTG	TTCCATTACAGCCAAGGTCTC
<i>NFE2L2</i>	ACATCCAGTCAGAAACCAGTG	CCGGGAATATCAGGAACAAGTG
<i>TXNRD1</i>	ATATGGCAAGAAGGTGATGGTCC	GGGCTTGCCTAACAAAGCTG
<i>G6PD</i>	TCTGCCCGAAAACACCTTC	GCATTCATGTGGCTGTTGAG
<i>TALDO1</i>	GCCGAGTATCCACAGAAGTAG	GATCCCAGCTTCCTTGTAGAG
<i>TKT</i>	ATCGAGTGCTACATTGCTGAG	CATGCGAATCTGGTCAAAGG
<i>RAD51</i>	AGTGGCTGAGAGGTATGGTC	TGTTCTGTAAAGGGCGGTG
<i>BRCA2</i>	TTCATGGAGCAGAACTGGTG	ATAAGGGCAGAGGAAAAGGTC
<i>GNB2L</i>	GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG	GCTTGCAGTTAGCCAGGTTTC

Figures captions

Fig. 1 *Retinoic acid modulates NRF2 and NRF2-target genes expression in A549 cells.* **(A)** Percentage of A549 viable cells measured by sulforhodamine B Assay 24, 48 and 72 hours after retinoic acid (RA) treatment (10, 20 and 40 μ M). **(B)** Phase contrast and PI uptake images of A549 cells treated with increasing doses of RA after 72 hours. **(C)** mRNA levels of NRF2-target genes measured by RT-qPCR 24 and 48 hours after RA treatment (20 μ M). **(D)** Immunocontent of NQO1, TKT, GSPD and NRF2 proteins in A549 cells treated for 48 hours with RA (10 and 20 μ M). Bands intensity relative to β -actin is expressed as fold from DMSO group. **(E)** Nuclear NRF2 immunocontent relative to Histone H3 protein 48 hours after RA treatment (20 μ M). Graphs are shown by means \pm SEM. * means different from DMSO group (vehicle control).

Fig. 2 *Retinoic acid alters cellular redox environment.* **(A)** Time curve of DCF fluorescence expressed in relative fluorescence unit (RFU), indicating reactive species formation and **(B)** reactive species production rate ($\text{RFU}_{\text{hour } x} - \text{RFU}_{\text{hour } x-1}$) in A549 cells treated with increasing doses of retinoic acid (RA). **(C)** Fluorescent images indicating superoxide generation assessed by MitoSOXTM Red probe after 3 and 6 hours of RA treatment. **(D)** Total sulfhydryl groups content of A549 cells after 24 and 48 hours of treatment (DMSO or RA 20 μ M) expressed in μ mol of SH/ mg of protein. Graphs are shown by means \pm SEM. * means different from DMSO group (vehicle control).

Fig. 3 *Retinoic acid affects homologous recombination in cisplatin-induced DNA damage.* A549 cells were pre-treated for 48 hours with RA 20 μ M or DMSO before cisplatin (10 μ g/mL) addition for 24 hours. **(A)** RAD51 foci formation accessed by immunofluorescence. Red fluorescence indicates RAD51 protein and blue fluorescence indicates nuclear staining by DAPI **(B)** mRNA levels of *RAD51*, *BRCA2* and *NQO1* genes measured by RT-qPCR **(C)** Western blot representative image indicating proteins immunocontent. Results are shown by means \pm SEM. * means different from DMSO group (vehicle control), when not differently indicated.

Fig. 4 *Retinoic acid pre-treatment changes cisplatin-induced cell cycle stops.* A549 cells were pre-treated for 48 hours with RA 20 μ M or DMSO before cisplatin (10 μ g/mL) addition for 24 hours. Cell cycle was accessed by PI fluorescence measured by flow cytometry. Left image are representative images shown cell number (y-axis) and PI fluorescence (x-axis). Right graph shows the relative percentage of cells in each cell cycle phase. Graph is shown with means \pm SEM.

Fig. 5 *Retinoic affects cisplatin-induced apoptosis and cell autophagy.* A549 cells were pre-treated for 48 hours with RA 20 μ M or DMSO before cisplatin addition. **(A)** Cell viability was measured by MTT assay after exposure to increasing doses, together with **(B)** the percentage of cell death measured by LDH

activity in culture medium (LDH leakage) after 10 µg/mL cisplatin exposure for 48 hours. **(C)** Frequency of apoptotic cells measured by annexin V – FITC/ PI staining and **(D)** indicative of autophagic activity measured by acridine orange red fluorescence after 24 hours of cisplatin (10 µg/mL) exposure in A549 cells pre-treated. **C(I)** graph indicates total apoptosis (early+late) and **C(II)** figures are representative of cells population. N-acetyl-cysteine (NAC) was used at final concentration of 5 mM. Results are shown by means ± SEM. * means different from DMSO group (vehicle control), when not differently indicated.

Figures:

Figure 1

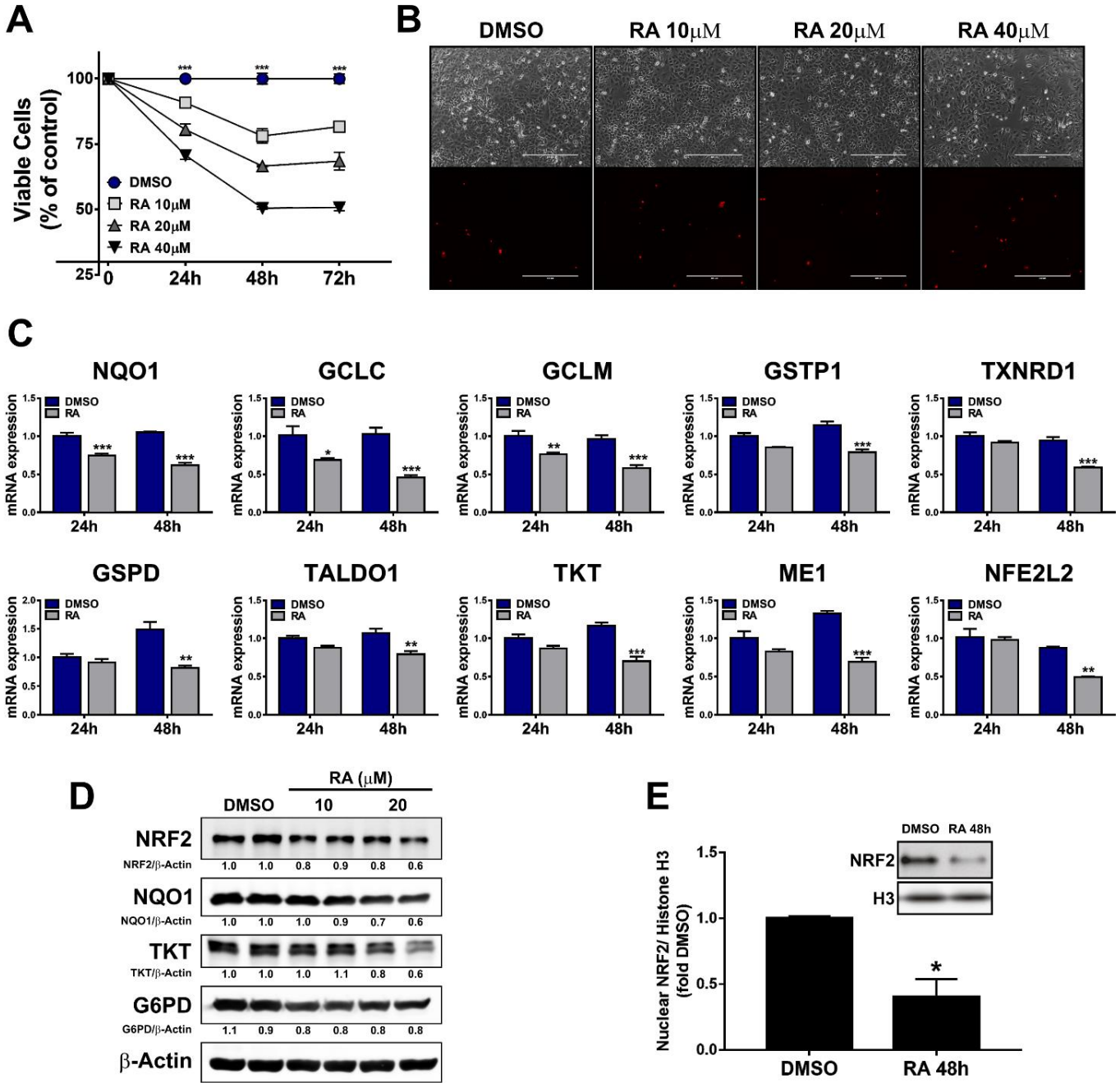


Figure 2

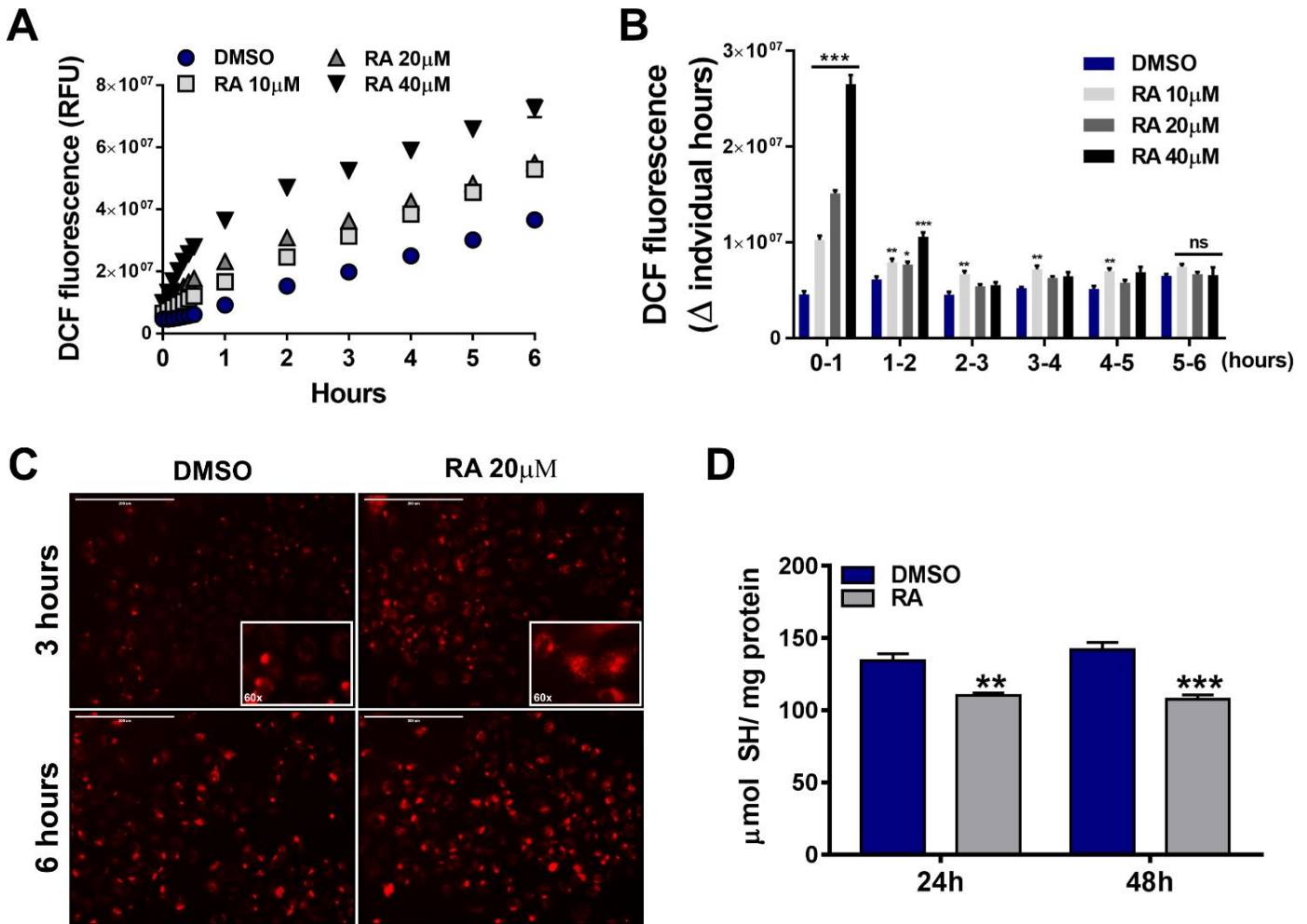


Figure 3

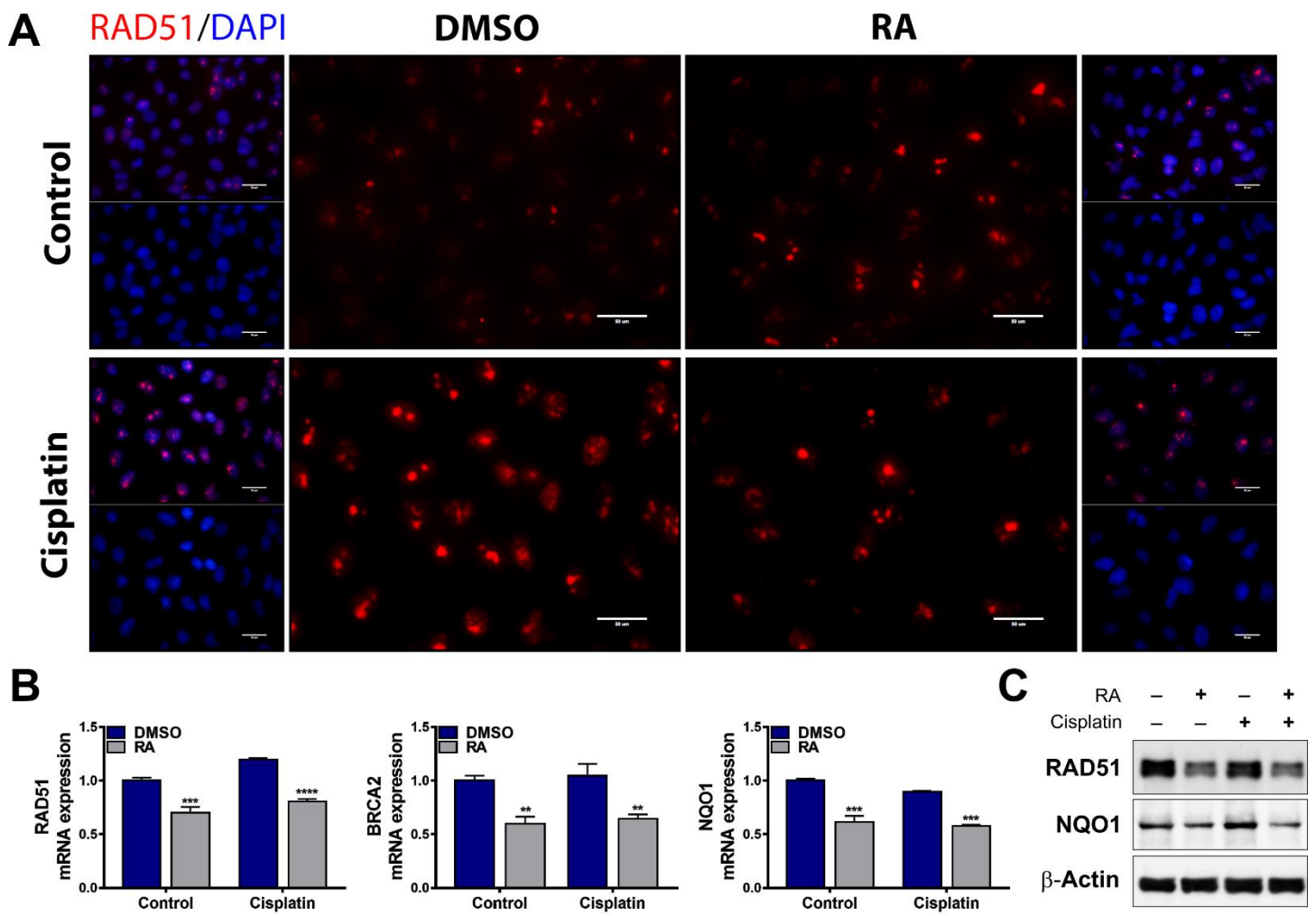


Figure 4

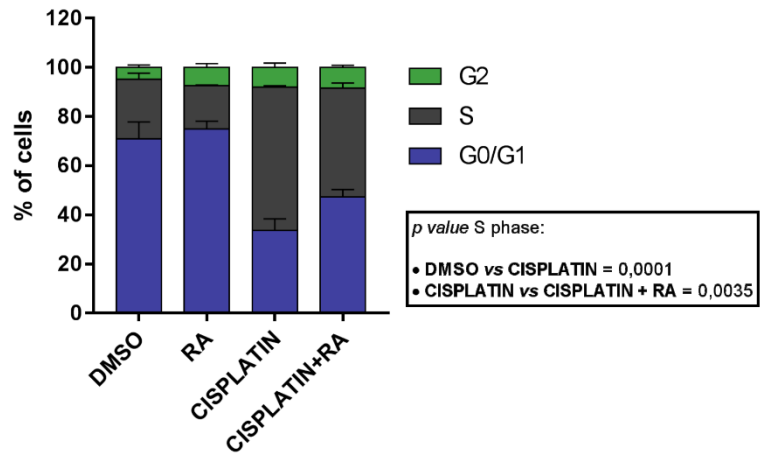
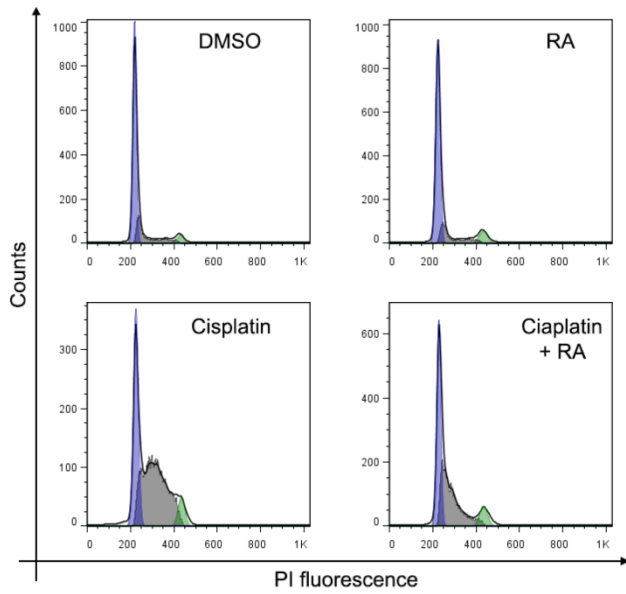
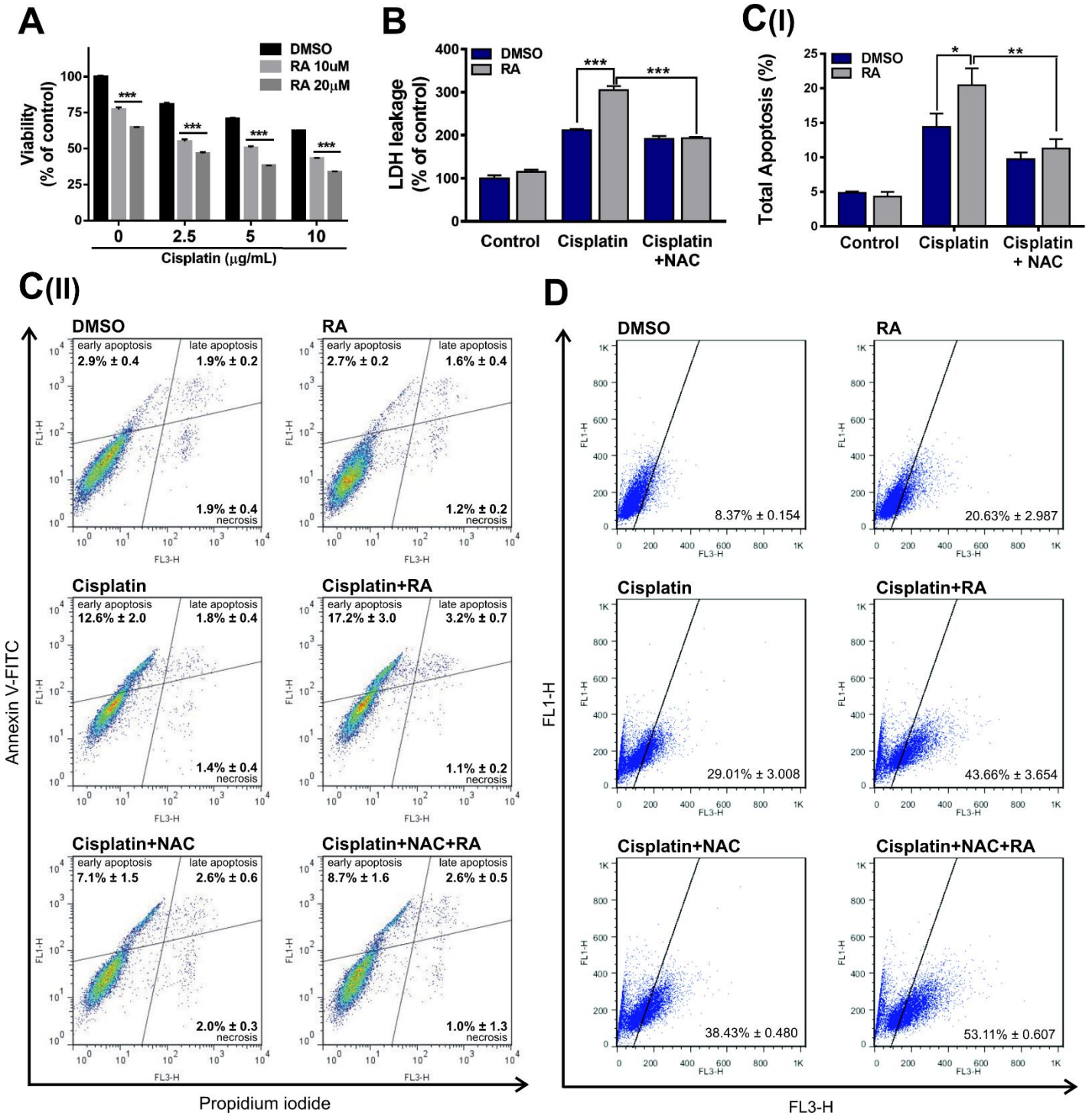


Figure 5



PARTE III

5. DISCUSSÃO

As maiores dificuldades de abordagens terapêuticas por fármacos são a toxicidade sistêmica ao paciente e a indução de resistência em células tumorais, aumentando assim o risco de reincidência. Neste sentido, alguns estudos têm apontado resultados positivos quanto ao uso do AR. Por exemplo, em modelos de NSCLC o tratamento com AR diminuiu a incidência de células resistentes à cisplatina em subpopulações de células iniciadoras tumorais (*tumor initiating cells – TICs*) (Moro et al. 2015). Entretanto, como discutido na parte II desta dissertação, o AR também pode ser capaz de ativar vias que levam a mecanismos de resistência a morte celular. No contexto de toxicidade, o tratamento com cisplatina e paclitaxel podem induzir neuropatias periféricas prejudicando a qualidade de vida de pacientes com NSCLC e o AR se mostrou eficaz em atenuar estes efeitos colaterais (Arrieta et al. 2011). Porém, pela experiência do uso terapêutico, se sabe que o AR também pode promover toxicidade sistêmica, especialmente no fígado. Curiosamente, Tan et al. 2008, demonstraram que o fator de transcrição NRF2 é ativado em células hepáticas após a administração de AR em modelos *in vitro* e *in vivo*, sendo um fator determinante para combater sua toxicidade. Em comparação dos estudos *in vitro*, as doses mínimas utilizadas pelos autores com efeitos citotóxicos aos hepatócitos foram acima das doses em que encontramos efeitos do AR nas células de NSCLC. Apesar das ressalvas, isto é um bom indicativo de que doses efetivas do AR contra o tecido tumoral podem não causar significativa toxicidade a outros tecidos. De fato, a toxicidade observada nos ensaios clínicos realizados foram consideradas aceitáveis (Arrieta et al. 2010). Dessa forma, estudos *in vivo* com o uso conjunto do AR e cisplatina podem trazer

perspectivas de doses e de possíveis toxicidades sistêmicas, podendo contribuir para o bem estar de pacientes nos casos clínicos.

Quanto aos mecanismos de sinalização encontrados nesta dissertação, ficou evidente que o ambiente redox celular é um fator importante para a sensibilização mediada pelo AR ao tratamento com cisplatina. Por terem uma taxa de proliferação elevada normalmente células tumorais produzem mais ER e, conseqüentemente, possuem um aumento nas defesas antioxidantes, podendo contrapor o efeito pró-apoptótico de quimioterápicos (Galadari et al. 2017). Essa regulação entre sistemas antioxidantes e proliferação possui como um dos mediadores o fator de transcrição NRF2. Portanto, o efeito inibitório do AR sobre esta via com certeza contribui para um desequilíbrio no ambiente redox celular, levando a uma sensibilização à cisplatina. A abordagem de induzir a produção de ER como estratégia antitumoral vem sendo amplamente discutida na literatura. Galadari et al. 2017 discute que pelo fato de células tumorais possuírem um nível basal de ER maior do que células saudáveis, estas poderiam ultrapassar um limiar de resistência mais facilmente quando expostas a agentes químicos que elevem ainda mais os níveis de ER (ideia representada na figura 2). Assim a combinação de drogas que induzam produção de ER, juntamente com inibidores de sistemas antioxidantes é apontado como uma estratégia promissora no combate a células tumorais (Galadari et al. 2017). Porém, é sabido que o efeito de ER pode variar de acordo com o contexto, e saber qual o tipo e a fonte geradora de ER é de grande significância. Sendo assim, outro fator importante encontrado foi o aumento na produção de superóxido mitocondrial na presença do AR, que parece ter contribuído para um efeito oxidativo. De fato, pouco se sabe sobre os efeitos do AR sobre atividade

e viabilidade mitocondrial em células tumorais. Por ter ocorrido já nas primeiras horas de exposição, é bem provável que o aumento de ER seja independente de vias de expressão gênicas, se encaixando nos efeitos não-genômicos do AR. Portanto, entender melhor estas vias de sinalização pode contribuir significativamente para melhorar a aplicabilidade desta molécula.

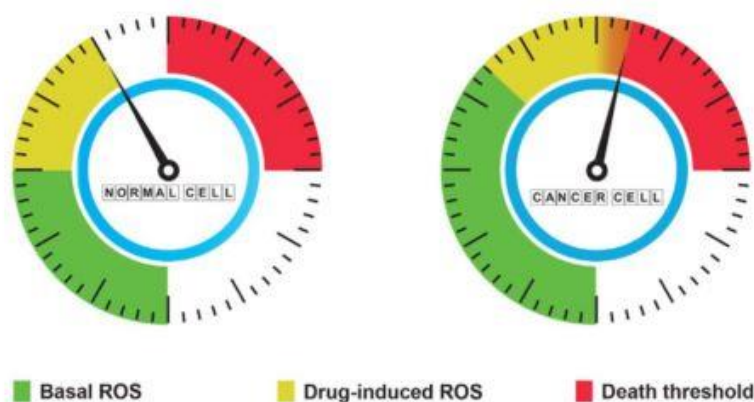


Figura 2. Retirada de “*Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? Galadari et al. 2017*”

A maior parte dos efeitos clássicos do AR em células tumorais são descritos como mediados pela ativação do receptor RAR β , que é considerado um gene supressor tumoral (Nagpal 2004). Porém, um estudo encontrou que 90% dos pacientes de câncer de pulmão analisados não apresentaram expressão de RAR- β 2 no tecido tumoral, enquanto todos apresentaram expressão no tecido sadio (Arrieta et al. 2010). Em conjunto, a perda de expressão dos RARs parece estar associada com o desenvolvimento do tumor e piores desfechos da doença em casos de NSCLC (Muñiz-Hernández et al. 2016). Contudo, não se conseguiu uma associação clara entre níveis de expressão de RAR- β 2 e resposta ao tratamento por AR em pacientes com câncer de pulmão (Arrieta et al. 2010), indicando que outras vias de sinalização também

podem estar mediando seus efeitos. Dessa forma, trabalhos que investiguem quais respostas dependem ou não da ação dos receptores de retinóides podem ajudar a traçar um perfil de resposta individual para pacientes.

6. CONCLUSÃO

Esta dissertação contribui com diversos trabalhos da literatura que procuram entender os mecanismos e a variedade de efeitos que a molécula de AR pode ter em células tumorais. Diferente de outros quimioterápicos, o AR já é uma molécula com um papel na fisiologia do corpo humano fazendo com que as respostas encontradas sejam extremamente dependentes do contexto celular. Isto cria a necessidade de uma discussão mais detalhada para se entender estas diferenças na tentativa de poder transpô-las para casos clínicos. No contexto de terapias para NSCLC, os resultados aqui apresentados podem contribuir para que novos alvos moleculares sejam testados, aprimorando assim a eficácia do uso conjunto do AR e cisplatina. Fica evidente que, dentro da célula, a molécula de AR é capaz de atuar sobre diversas vias de sinalização. Aqui por exemplo ficou demonstrado efeitos sobre vias antioxidantes e de reparo de DNA. Ambas vias são de grande relevância quando existe a associação com cisplatina. Porém, outras vias de atuação do AR, principalmente que interajam com outros quimioterápicos, também devem ter suas regulações estudadas para que o uso clínico destas moléculas tenha melhor direcionamento.

Em resposta aos objetivos específicos desta dissertação, o AR:

- Demonstrou um efeito inibitório sobre a expressão e atividade do NRF2 nas células A549.
- Demonstrou um efeito inibitório sobre a proliferação celular.
- Aumentou a produção de ER, diminuiu a expressão de enzimas de sistemas antioxidantes, e aumentou a concentração de grupamentos tióis oxidados.
- Pontencializou a morte celular por apoptose frente ao tratamento com cisplatina.
- Demonstrou um efeito inibitório sobre ativação de vias de recombinação homologa frente ao dano a DNA mediado por cisplatina.

7. PERSPECTIVAS

- Testar o uso de inibidores de autofagia em conjunto com os tratamentos utilizados.
- Aprofundar a investigação da relação entre o ambiente redox e o reparo por recombinação homologa.
- Investigar o papel da mitocôndria no sinergismo entre o AR e cisplatina.
- Investigar a participação dos receptores de retinóides (RARs e RXRs) nos efeitos encontrados.
- Realizar estudos com modelos *in vivo* visando confirmar os mecanismos encontrados e investigar possíveis toxicidades em outros tecidos.
- Analisar a resposta de diferentes subtipos de câncer de pulmão ao tratamento com AR e cisplatina, visando encontrar possíveis marcadores moleculares correlacionados com cada resposta.

REFERÊNCIAS

- Ablain, Julien, and Hugues De Thé. 2014. "Retinoic Acid Signaling in Cancer: The Parable of Acute Promyelocytic Leukemia." *International Journal of Cancer* 135 (10): 2262–72. doi:10.1002/ijc.29081.
- American Cancer Society. 2017. "Cancer Facts and Figures 2017." *Genes and Development* 21 (20): 2525–38. doi:10.1101/gad.1593107.
- Arrieta, Oscar, Claudia H. González-De La Rosa, Elena Aréchaga-Ocampo, Geraldine Villanueva-Rodríguez, Tania L. Cerón-Lizárraga, Luis Martínez-Barrera, María E. Vázquez-Manríquez, et al. 2010. "Randomized Phase II Trial of All-Trans-Retinoic Acid with Chemotherapy Based on Paclitaxel and Cisplatin as First-Line Treatment in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 28 (21): 3463–71. doi:10.1200/JCO.2009.26.6452.
- Arrieta, Oscar, N Hernandez-Pedro, M C Fernandez-Gonzalez-Aragon, D Saavedra-Perez, A D Campos-Parra, M A Rios-Trejo, T Ceron-Lizarraga, et al. 2011. "Retinoic Acid Reduces Chemotherapy-Induced Neuropathy in an Animal Model and Patients with Lung Cancer." *Neurology* 77 (10): 987–95. doi:10.1212/WNL.0b013e31822e045c.
- Baird, Liam, David Llères, Sam Swift, and Albena T Dinkova-kostova. 2013. "Regulatory FI Exibility in the Nrf2-Mediated Stress Response Is Conferred by Conformational Cycling of the Keap1-Nrf2 Protein Complex." *PNAS* 110 (38): 15259–64. doi:10.1073/pnas.1305687110.
- Campo-Paysaa, Florent, Ferdinand Marlétaz, Vincent Laudet, and Michael Schubert. 2008. "Retinoic Acid Signaling in Development: Tissue-Specific Functions and Evolutionary Origins." *Genesis* 46 (November): 640–56. doi:10.1002/dvg.20444.
- Cho, Jeong Min, Sarala Manandhar, Hyang Rim Lee, Hyun Min Park, and Mi Kyoung Kwak. 2008. "Role of the Nrf2-Antioxidant System in Cytotoxicity Mediated by Anticancer Cisplatin: Implication to Cancer Cell Resistance." *Cancer Letters* 260 (1–2): 96–108. doi:10.1016/j.canlet.2007.10.022.
- Connolly, Roisin M., Nguyen K. Nguyen, and Saraswati Sukumar. 2013. "Molecular Pathways: Current Role and Future Directions of the Retinoic Acid Pathway in Cancer Prevention and Treatment." *Clinical Cancer Research* 19 (7): 1651–1959. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
- Dela Cruz, Charles S., Lynn T. Tanoue, and Richard a. Matthay. 2011. "Lung Cancer: Epidemiology, Etiology and Prevention." *Clin Chest Med* 32 (4): 1–61. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001.Lung.
- DeNicola, Gina M, Florian A Karreth, Timothy J Humpton, Aarthi Gopinathan, Cong Wei, Kristopher Frese, Dipti Mangal, et al. 2011. "Oncogene-Induced Nrf2 Transcription Promotes ROS Detoxification and Tumorigenesis." *Nature* 475 (7354). Nature Publishing Group: 106–9. doi:10.1038/nature10189.

- Duester, Gregg. 2008. "Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis." *Cell* 134: 921–31. doi:10.1016/j.cell.2008.09.002.
- Flood, William A., Ramalingan S., Jeffrey L. Lenow, Phillip L. Benditt, and James T. Kenney JR. 2004. "Managed Care Best Practices in The Treatment and Management Of Non-Small Cell Lung Cancer." *Managed Care* 14 (2).
- Galadari, Sehamuddin, Anees Rahman, Siraj Pallichankandy, and Faisal Thayyullathil. 2017. "Reactive Oxygen Species and Cancer Paradox: To Promote or to Suppress?" *Free Radical Biology and Medicine* 104 (August 2016). Elsevier B.V.: 144–64. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
- Hayes, John D., and Michael L J Ashford. 2012. "Nrf2 Orchestrates Fuel Partitioning for Cell Proliferation." *Cell Metabolism* 16: 139–41. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.009.
- Hayes, John D., and Albena T. Dinkova-Kostova. 2014. "The Nrf2 Regulatory Network Provides an Interface between Redox and Intermediary Metabolism." *Trends in Biochemical Sciences* 39 (4). Elsevier Ltd: 199–218. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.002.
- Herbst, Roy S., John V. Heymach, and Scott M. Lippman. 2009. "Molecular Origins of Cancer-Lung Cancer." *The New England Journal of Medicine*, 1367–80. doi:10.1136/bmj.1.5379.377-f.
- Homma, Shinsuke, Yukio Ishii, Yuko Morishima, Tadahiro Yamadori, Yosuke Matsuno, Norihiro Haraguchi, Norihiro Kikuchi, et al. 2009. "Nrf2 Enhances Cell Proliferation and Resistance to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer." *Clinical Cancer Research* 15 (10): 3423–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2822.
- Itoh, Ken, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, Tetsuro Ishii, Kazuhiko Igarashi, James Douglas Engel, and Masayuki Yamamoto. 1999. "Keap1 Represses Nuclear Activation of Antioxidant Responsive Elements by Nrf2 through Binding to the Amino-Terminal Neh2 Domain." *Genes and Development* 13 (1): 76–86. doi:10.1101/gad.13.1.76.
- Jayakumar, Sundarraj, Debojyoti Pal, and Santosh K. Sandur. 2015. "Nrf2 Facilitates Repair of Radiation Induced DNA Damage through Homologous Recombination Repair Pathway in a ROS Independent Manner in Cancer Cells." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 779. Elsevier B.V.: 33–45. doi:10.1016/j.mrfmmm.2015.06.007.
- Lau, Alexandria, Nicole F. Villeneuve, Zheng Sun, Pak Kin Wong, and Donna D. Zhang. 2008. "Dual Roles of Nrf2 in Cancer." *Pharmacological Research* 58: 262–70. doi:10.1016/j.phrs.2008.09.003.
- Li, Bing, Mei-Hua Gao, Xian-Ming Chu, Lei Teng, Cong-Yi Lv, Peng Yang, and Qi-Feng Yin. 2015. "The Synergistic Antitumor Effects of All-Trans Retinoic Acid and C-Phycocyanin on the Lung Cancer A549 Cells in Vitro and in Vivo." *European Journal of Pharmacology* 749. Elsevier: 107–14. doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.009.
- Liou, Jau-Cheng, Shih-Yin Ho, Meng-Ru Shen, Yi-Ping Liao, Wen-Tai Chiu, and Kai-

- Hsiang Kang. 2005. "A Rapid, Nongenomic Pathway Facilitates the Synaptic Transmission Induced by Retinoic Acid at the Developing Synapse." *Journal of Cell Science* 118: 4721–30. doi:10.1242/jcs.02603.
- Maden, Malcolm. 2002. "Retinoid Signalling in the Development of the Central Nervous System." *Nature Reviews. Neuroscience* 3 (November): 843–53. doi:10.1038/nrn963.
- Masiá, Susana, Susana Alvarez, Angel R de Lera, and Domingo Baretino. 2007. "Rapid, Nongenomic Actions of Retinoic Acid on Phosphatidylinositol-3-Kinase Signaling Pathway Mediated by the Retinoic Acid Receptor." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (10): 2391–2402. doi:10.1210/me.2007-0062.
- Matsuzawa, Atsushi. 2017. "Thioredoxin and Redox Signaling: Roles of the Thioredoxin System in Control of Cell Fate." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 617. Elsevier Inc: 101–5. doi:10.1016/j.abb.2016.09.011.
- Mitsuishi, Yoichiro, Keiko Taguchi, Yukie Kawatani, Tatsuhiko Shibata, Toshihiro Nukiwa, Hiroyuki Aburatani, Masayuki Yamamoto, and Hozumi Motohashi. 2012. "Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming." *Cancer Cell* 22 (1). Elsevier Inc.: 66–79. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.016.
- Moro, Massimo, Giulia Bertolini, Ugo Pastorino, Luca Roz, and Gabriella Sozzi. 2015. "Combination Treatment with All-Trans Retinoic Acid Tumor-Initiating Cells and Reveals Heterogeneity of Cancer Stem Cell Compartment in Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 1–10. doi:10.1097/JTO.0000000000000563.Copyright.
- Muñiz-Hernández, Saé, Sara Huerta-Yepez, Norma Hernández-Pedro, Laura-Alejandra Ramírez-Tirado, Alejandro Aviles-Salas, Altagracia Maldonado, Daniel Hernández-Cueto, Guillermina Baay-Guzmán, and Oscar Arrieta. 2016. "Association between Nuclear Expression of Retinoic Acid Receptor Alpha and Beta and Clinicopathological Features and Prognosis of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *International Journal of Clinical Oncology* 21 (6). Springer Japan: 1051–61. doi:10.1007/s10147-016-1002-0.
- Nagpal, Sunil. 2004. "Retinoids: Inducers of Tumor/growth Suppressors." *Journal of Investigative Dermatology* 123: 1–2. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23533.x.
- Niture, Suryakant K., Raju Khatri, and Anil K. Jaiswal. 2014. "Regulation of Nrf2 - An Update." *Free Radical Biology and Medicine* 66. Elsevier: 36–44. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008.
- Noy, Noa. 2010. "Between Death and Survival: Retinoic Acid in Regulation of Apoptosis." *Annual Review of Nutrition* 30: 201–17. doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155509.
- Pajares, Marta, Natalia Jiménez-Moreno, Ángel J. García-Yagüe, Maribel Escoll, María L. de Ceballos, Fred Van Leuven, Alberto Rábano, Masayuki Yamamoto, Ana I. Rojo, and Antonio Cuadrado. 2016. "Transcription Factor NFE2L2/NRF2 Is a Regulator of Macroautophagy Genes." *Autophagy* 12 (10). Taylor & Francis: 1902–

16. doi:10.1080/15548627.2016.1208889.

- Pasquali, Matheus A.B., Daniel P. Gelain, Alfeu Zanotto-Filho, Luiz F. de Souza, Ramatis B. de Oliveira, Fabio Klamt, and Jose C.F. Moreira. 2008. "Retinol and Retinoic Acid Modulate Catalase Activity in Sertoli Cells by Distinct and Gene Expression-Independent Mechanisms." *Toxicology in Vitro* 22 (5): 1177–83. doi:10.1016/j.tiv.2008.03.007.
- Reynolds, C. Patrick, Katherine K. Matthay, Judith G. Villablanca, and Barry J. Maurer. 2003. "Retinoid Therapy of High-Risk Neuroblastoma." *Cancer Letters* 197: 185–92. doi:10.1016/S0304-3835(03)00108-3.
- Schenk, T., S. Stengel, and A. Zelent. 2014. "Unlocking the Potential of Retinoic Acid in Anticancer Therapy." *British Journal of Cancer* 111 (11). Nature Publishing Group: 2039–45. doi:10.1038/bjc.2014.412.
- Shaloam, Dasari, and Paul Bernard Tchounwou. 2014. "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action." *European Journal of Pharmacology* 740: 364–78. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Shelly C. Lu, M.D. 2014. "Glutathione Synthesis." *Biochim Biophys Acta* 1830 (5): 3143–53. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- Stewart, L A. 1995. "Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis Using Updated Data on Individual Patients from 52 Randomised Clinical Trials." *BMJ* 311 (October): 899–909.
- Sutherland, Kate D., and Anton Berns. 2010. "Cell of Origin of Lung Cancer." *Molecular Oncology* 4 (5). Elsevier B.V: 397–403. doi:10.1016/j.molonc.2010.05.002.
- Tan, Kah Poh, Kazuhiro Kosuge, Mingdong Yang, and Shinya Ito. 2008. "NRF2 as a Determinant of Cellular Resistance in Retinoic Acid Cytotoxicity." *Free Radical Biology and Medicine* 45 (12). Elsevier Inc.: 1663–73. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.010.
- Tang, Xiao-Han, and Lorraine J Gudas. 2011. "Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer." *Annual Review of Pathology* 6: 345–64. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130303.
- Tanoury, Ziad Al, Aleksandr Piskunov, and Cécile Rochette-egly. 2013. "Vitamin A and Retinoid Signaling: Genomic and Nongenomic Effects" 54. doi:10.1194/jlr.R030833.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Andrew G. Nicholson, Yasushi Yatabe, John H.M. Austin, Mary Beth Beasley, Lucian R. Chirieac, et al. 2015. "The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification." *Journal of Thoracic Oncology* 10 (9). International Association for the Study of Lung Cancer: 1243–60. doi:10.1097/JTO.0000000000000630.
- Zanotto-Filho, Alfeu, Martin Cammarota, Daniel P. Gelain, Ramatis B. Oliveira, Andres Delgado-Cañedo, R. J S Dalmolin, M. a B Pasquali, and J. C F Moreira. 2008.

“Retinoic Acid Induces Apoptosis by a Non-Classical Mechanism of ERK1/2 Activation.” *Toxicology in Vitro* 22: 1205–12. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.001.

Zenkov, N K, E B Menshchikova, and V O Tkachev. 2013. “Keap1/Nrf2/ARE Redox-Sensitive Signaling System as a Pharmacological Target.” *Biochemistry. Biokhimiia* 78 (1): 19–36. doi:10.1134/S0006297913010033.

Zhang, Yang, Dong Xian Guan, Jie Shi, Hong Gao, Jing Jing Li, Jiang Sha Zhao, Lin Qiu, et al. 2013. “All-Trans Retinoic Acid Potentiates the Chemotherapeutic Effect of Cisplatin by Inducing Differentiation of Tumor Initiating Cells in Liver Cancer.” *Journal of Hepatology* 59 (6). European Association for the Study of the Liver: 1255–63. doi:10.1016/j.jhep.2013.07.009.

Zhao, Fei, Tongde Wu, Alexandria Lau, Tao Jiang, Zheping Huang, Xiao-Jun Wang, Weimin Chen, Pak Kin Wong, and Donna D Zhang. 2009. “Nrf2 Promotes Neuronal Cell Differentiation.” *Free Radical Biology & Medicine* 47 (6). Elsevier Inc.: 867–79. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.029.