

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

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DO METABOLISMO REDOX E A
AGRESSIVIDADE DE CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO PEQUENAS CÉLULAS.**

LEONARDO LISBÔA DA MOTTA

PORTO ALEGRE, JANEIRO DE 2011

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

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DO METABOLISMO REDOX E A
AGRESSIVIDADE DE CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO PEQUENAS CÉLULAS.**

ALUNO: LEONARDO LISBÔA DA MOTTA

ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO KLAMT

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

PORTO ALEGRE, JANEIRO DE 2011

Este trabalho foi realizado no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (laboratório 32), Departamento de Bioquímica Prof. Tuiskon Dick do Instituto de Ciência Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul em colaboração com o Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular do Instituto de Cardiologia IC/FUC de Porto Alegre. Foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

Dedico esta conquista aos meus pais, Sônia e Carlos. Eu jamais chegaria tão longe
sem o amor incondicional de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a meus pais e familiares. Pai e mãe, muito obrigada pela preocupação em me fornecer uma educação qualificada que permitiu que eu seguisse minha vocação. Admiro muito vocês pelo maravilhoso exemplo de pessoa honesta, trabalhadora e íntegra que são e agradeço também pelo apoio, mesmo que não concordando integralmente com minhas decisões. A cima de tudo, muito obrigado pelos ensinamentos éticos e morais que não se aprende fora de casa. Lucas, a relação entre irmãos tem muito mais do que qualquer pessoa de fora é capaz de enxergar. Eu sempre vou te amar, contar contigo pros momentos bons ou ruins e estar lá pra ti quando precisares. Vó Linda e vó Eli, muito obrigado por todo o amor e conforto sempre que precisei. Zuleica, Sílvia e Edmundo, toda viagem a São Paulo é maravilhosa por causa de vocês, agradeço sempre por existirem na minha vida. Maurício, Victor e Nathy, gostaria que morássemos mais próximo para nos divertirmos mais! Agradeço a todos vocês pelas contribuições em valores muito mais importantes do que qualquer conhecimento técnico-científico, sem os quais eu jamais teria a alegria e a paz necessária para realizar qualquer trabalho.

Agradeço muito também às pessoas que se tornaram minha família quando optei por voltar sozinho a Porto Alegre. Margô, eu sempre lembrarei com carinho de ti e dos anos que moramos juntos. Obrigado pela atenção, amor e cuidado que tu sempre me dedicaste. Cristina e Joaquim, a amizade de vocês não tem preço. Mesmo distantes eu sei que posso contar com vocês e que a nossa próxima conversa fará parecer que nunca perdemos o contato. Artur, obrigado por toda ajuda, apoio e diversão. Tu não és meu irmão por capricho do acaso!

Hoje eu sei que sempre fui fascinado por bioquímica. Mas talvez nunca tivesse enxergado isso se não fosse me dada a oportunidade, e por esta oportunidade eu

sempre serei grato ao Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira, um dos melhores professores que já tive. Agradeço ainda a ti, por ter me apresentado ao meu “pai científico”, Guilherme. “Irmão”, muito obrigado pela parceria ao longo destes 4 anos. Contigo aprendi demais, na bancada e fora dela. Não tenho dúvida que serás bem sucedido, pois és íntegro e sincero, e isso não se aprende “lendo paper”. Muito obrigado também por ter me apresentado ao meu “avô científico”, que se tornou um grande amigo. Evandro “Hollyfield”, valeu pela força sempre e por me mostrar que o mundo é maior que o Depto. de Bioquímica da UFRGS. Ainda, agradeço aos maus e péssimos professores e pesquisadores pelo exemplo de “como não ser”.

Na conclusão desta etapa da minha vida e profissão, agradeço demais ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Klamt. Obrigado por me aceitar no teu grupo, por me direcionar quando foi preciso e pela troca de conhecimento. Agradeço também pelos momentos descontraídos, os quais julgo fundamentais. Tu és o melhor cientista que conheço, na totalidade da palavra, e crescer profissionalmente ao teu lado é uma honra pra mim. E por último, não poderia me esquecer de te agradecer ainda por me aproximar da Ju.

Juliane, obrigado por toda ajuda, apoio e amor em todos os momentos, desde a execução do trabalho. Além de uma ruiva inteligentíssima, muito capaz e comprometida, tu tens sido uma namorada ainda melhor, compreensiva, companheira, confidente, parceira e divertida. Espero retribuir toda a parceria e dedicação que me propiciaste. Eu te amo demais e não tenho dúvida que seremos muito felizes juntos!

Agradeço ainda aos colegas de laboratório: Michael e Alfeu pelas intermináveis conversas que “nunca nos levaram a nada”; Matheus Becker que tem sido um baita amigo e sem dúvida manteremos essa amizade independente do caminho que seguiremos. Valeska pela parceria e excelente trabalho em equipe; Fê e Carol pela

diversão e auxílio nos bons e maus momentos. Chaca, Marcelinho, Cabecinha, Giovana, Rochê, Marinho, Marquito e Lorenzi por transformarem o “tédio em melodia”.

Sou muito grato também à Lisiâne Porciúncula por ter aceitado ser relatora dessa dissertação. Suas contribuições foram muito úteis para o aprimoramento e qualificação do conteúdo aqui apresentado.

Por fim, gostaria de agradecer a todos simplesmente por desejarem o meu bem estar e sucesso!

“It has become almost a cliche to remark that nobody boasts of ignorance of literature, but it is socially acceptable to boast ignorance of science and proudly claim incompetence in mathematics.”

Richard Dawkins

ÍNDICE

Parte I:

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Câncer de Pulmão	6
1.2. Radicais Livres e Espécies Reativas	7
1.3. Estresse Oxidativo e Metabolismo Redox	9
1.4. Câncer de Pulmão e Metabolismo Redox	10
1.5. Fenótipo Tumoral e Metabolismo Redox	12
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos Gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18

Parte II:

3. RESULTADOS	20
3.1. Manuscrito submetido para publicação	21
3.2. Resultados Suplementares	60

Parte III:

4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Parte I

RESUMO

O câncer de pulmão é a neoplasia maligna mais letal em todo o mundo. As terapias disponíveis são pouco eficazes e a alta mortalidade não têm se alterado ao longo dos anos. O câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC do inglês *non small cell lung cancer*) representa 80% dos casos e pode ser dividido em três subtipos histológicos: adenocarcinoma (AdC), carcinoma de células grandes (LCC do inglês *large cell carcinoma*) e carcinoma escamoso.

Células tumorais possuem maior capacidade de proliferação, migração e invasão. São também incapazes de responder a sinais que inibam proliferação ou ativem morte celular programada e ainda estimulam a formação de novos vasos sanguíneos. Todos estes aspectos são afetados pelo metabolismo redox, cuja homeostase intracelular é mantida pelo equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes.

A homeostase redox das células pulmonares é afetado pela exposição à grande pressão de O₂ e oxidantes ambientais, devido à fisiologia deste órgão. Além disso, todo tumor sólido se desenvolve num microambiente de inflamação crônica com alta produção de espécies reativas (ER). Portanto, a tumorigênese selecionará células adaptadas para sobrepujar este ambiente oxidativo em seu favor. Discute-se que a elevação de defesas antioxidantes contribua para esta adaptação. Porém, apesar de níveis elevados de ER poderem causar morte celular por estresse oxidativo, hoje se sabe que um aumento moderado nestes níveis modula processos fisiológicos relevantes à agressividade tumoral, como os citados a cima.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a relação entre o metabolismo redox intracelular e a agressividade tumoral em NSCLC. Foram utilizadas 4 linhagens humanas de NSCLC de dois tipos histológicos: AdC (A549 e EKX) e LCC (H-460 e HOP-92). Foram avaliados dois parâmetros de agressividade tumoral (invasividade e quimioresistência), obtendo-se uma linhagem claramente mais agressiva em cada subtipo histológico. Após, foi analisado o perfil redox intracelular em função da agressividade. Concluiu-se que as linhagens mais agressivas possuem um desbalanço enzimático sugerindo uma elevação no *steady-state* da produção de ER, confirmada posteriormente pelo ensaio de DCF. Estas linhagens apresentaram ainda potencial antioxidant total e o nível de tióis reduzidos (-SH) diminuídos e índice de lipoperoxidação aumentado. Esses dados corroboram os resultados anteriores e juntos caracterizam o ambiente redox intracelular das linhagens mais agressivas como mais pró-oxidante. Caso houvesse aumento nas defesas antioxidantes durante a progressão tumoral, esperaríamos um estado redox mais redutor, porém, o presente trabalho demonstra o contrário.

Posteriormente, foi avaliada a influência da espécie reativa peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em dois parâmetros de malignidade tumoral. Na proliferação celular, o H₂O₂ se mostrou um mediador necessário, uma vez que sua remoção inibe este processo. Ainda, sua adição estimulou maior proliferação nas linhagens mais agressivas. O H₂O₂ também foi capaz de aumentar a taxa de migração celular, enquanto sua remoção a inibiu parcialmente.

Desta forma, pode-se concluir que o desbalanço redox favorecendo ambiente intracelular pro-oxidante acompanha a progressão tumoral em NSCLC. Além disso, ela é fundamental à malignidade das células tumorais de NSCLC. Assim, o uso de antioxidantes como terapia adjuvante possivelmente é uma alternativa viável para melhorar o prognóstico de câncer de pulmão de não pequenas células.

ABSTRACT

Lung cancer is the most lethal malignant neoplasia worldwide. The available therapies have little efficacy and the high death rate has not been changed in the last decade. Non small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80% of the cases and can be sub-classified in three histological subtypes: adenocarcinoma (AdC), large cell carcinoma (LCC) and squamous cell carcinoma.

Cancer cells have elevated capacity to proliferate, migrate and invade. Also, they stimulate the growth of new blood vessels and are insensitive to signals that inhibit proliferation or activate programmed cell death. All of these aspects are influenced by redox metabolism, which homeostasis is maintained by the equilibrium between oxidants and antioxidants.

The redox homeostasis of pulmonary cells is affected by the exposure to elevated O₂ pressure and environmental oxidants, due to the physiology of the lungs. Besides, every solid tumor develops in a chronic inflammatory microenvironment with elevated production of reactive species (RS). Thus, the occurrence of a tumor must select those cells necessarily capable of dealing with this oxidative environment. It is believed that this success could be achieved with an increased antioxidant capacity. Although elevated levels of RS can cause oxidative stress-mediated cell death, nowadays it is known that mild increase in RS levels can influence the physiology of the cell, including the aspects mentioned earlier.

This way, the present study aimed to investigate the association between intracellular redox metabolism and tumor aggressiveness in NSCLC. Four human NSCLC cell lines were used divided in two histological subtypes: AdC (A549 and EKX) and LCC (H-460 and HOP-92). In first place, it was evaluated two aggressiveness parameters (invasiveness and chemoresistance), obtaining one cell line clearly most aggressive within each histological subtype. Then, the intracellular redox profile was evaluated and analyzed in light of aggressiveness. We found that the most aggressive cell lines have an enzymatic imbalance suggesting an elevation of *steady-state* RS production, further confirmed by DCF assay. These cell lines also showed lower reduced thiol (-SH) levels and total antioxidant potential, and higher lipoperoxidation index. This data corroborates previous conclusion and collectively characterize the intracellular redox environment of the most aggressive cell lines as more pro-oxidant. If tumor progression were followed by elevation in antioxidant defenses, one would expect a reducer intracellular environment, however this work demonstrates the opposite.

Hence, the influence of the RS hydrogen peroxide (H₂O₂) in malignant parameters was evaluated. In proliferation, H₂O₂ could be defined as a necessary mediator, once its removal inhibited this process. Moreover, addition of H₂O₂ stimulated higher proliferation in the most aggressive cell lines. Hydrogen peroxide was also capable of enhance the migratory rate, while its removal partially inhibited it.

Concluding, the redox imbalance favoring pro-oxidative intracellular environment might follows NSCLC tumor progression. Furthermore, it is essential to tumor malignancy in NSCLC. This way, the use of antioxidants as adjuvant therapy could be a viable alternative to improve the prognostic of non small cell lung cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

AdC – adenocarcinoma;

CAT – catalase;

EAO – enzimas antioxidantes;

GPx – glutationa peroxidase;

GSH – glutationa;

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio;

LCC – carcinoma de células grandes;

MMP – metaloproteinases de matriz

NSCLC – câncer de pulmão de não pequenas células

ER – espécies reativas;

SOD – superóxido dismutase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE PULMÃO

Atualmente, o câncer de pulmão é a neoplasia mais comum e letal no mundo com mais de 1,2 milhões de novos casos (Ferlay et al., 2010) e com mortalidade em cinco anos entre 87 % a 90 % (Zamboni and Carvalho, 2005). No Brasil, o câncer de pulmão chega a ser principal causa de óbito com média de 20 mil óbitos/ano, e o terceiro mais comum com 28 mil novos casos sendo esperados pro ano de 2010, válido também para 2011 (Instituto Nacional do Câncer - INCA).

Uma vez que os estágios iniciais são assintomáticos (McWilliams et al., 2002), aproximadamente 80% dos casos são diagnosticados em estágios avançados. Quando o tumor pode ser operado e removido, a sobrevida em cinco anos chega 50%. Por outro lado, quando a doença é diagnosticada em estágios avançados é utilizada quimioterapia associada ou não à radioterapia (INCA, 2011) com eficácia reduzida (Beasley et al., 2005). Para câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC do inglês *non small cell lung cancer*) a quimioterapia baseada em agentes platinados, como a cisplatina e carboplatina, é considerada o “padrão-ouro” (Buzaid et al., 2010). A detecção precoce é dificultada também pela limitação das dos métodos de detecção disponíveis: exames radiológicos, a citologia do escarro, a broncofibroscopia, a punção aspirativa transtorácica e a toracoscopia, entre outros (McWilliams et al., 2002; Zamboni and Carvalho, 2005).

Apenas 15% dos pacientes têm sobrevida superior a 5 anos após o diagnóstico apesar do grande acúmulo de informações sobre sua biologia molecular no decorrer da última década (Beasley et al., 2005). A busca por genes ou produtos gênicos como biomarcadores preditivos, diagnósticos e/ou prognósticos para câncer de pulmão tem sido notável (Coate et al., 2009; Lantuéjoul and Brambilla, 2006; Mao,

2002), mas nenhum deles ainda se mostrou verdadeiramente efetivo (Muller et al., 2011). Apesar disso, novos candidatos continuam surgindo na literatura (Bankovic et al., 2010; Castro et al., 2010).

Esta patologia é normalmente dividida em cancer de pulmão de pequenas células (SCLC do inglês *small cell lung cancer*) e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC). O NSCLC representa aproximadamente 80% dos casos de câncer de pulmão e pode ser dividido em pelo menos três grandes subtipos histológicos: adenocarcinoma (AdC), carcinoma de células grandes (LCC do inglês *large cell carcinoma*) e carcinoma epidermóide (Beadsmoore and Screamton, 2003; Beasley et al., 2005) (Fig. 1).

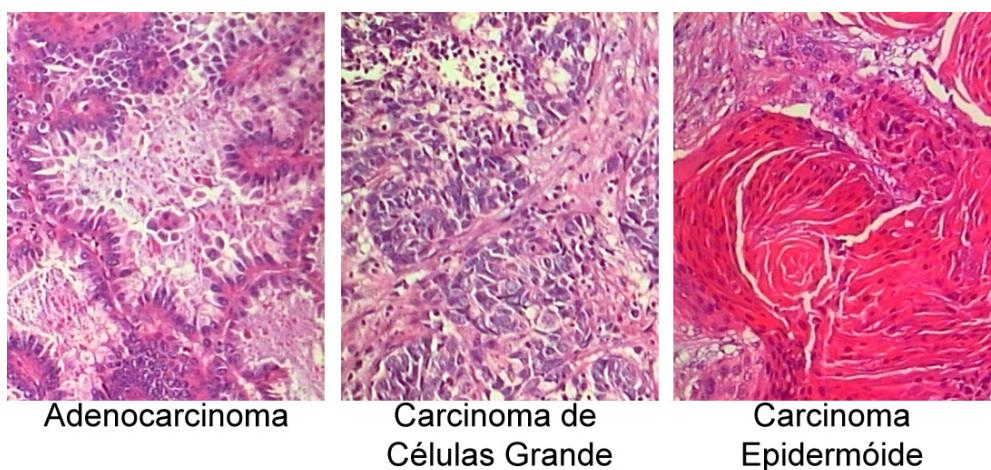


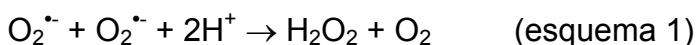
Figura 1. Tipos histológicos de NSCLC. Microfotografia representativa dos três principais subtipos histológicos de câncer de pulmão de não pequenas células: adenocarcinoma, carcinoma de células grande e carcinoma epidermóide. Imagens de lâminas histológicas de biópsias coradas com hematoxilina-eosina (HE) em lente objetiva de 20x. Fotomicrografias gentilmente cedidas por Carolina B. Muller.

1.2. RADICAIS LIVRES e ESPÉCIES REATIVAS

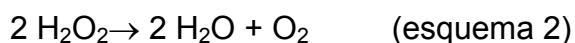
Radical livre (RL) é uma espécie química com um ou mais elétrons desemparelhados (radical) e capaz de existir independentemente (livre). Espécie reativa (ER) denomina intermediários no metabolismo de RL que não são

necessariamente radicalares, ou seja, não possuam elétron desemparelhado. Mesmo assim, as ER possuem alta capacidade oxidante. Assim, todo radical livre é uma espécie reativa, mas a recíproca não é verdadeira (Halliwell, 2006).

Espécies reativas (ER) são geradas fisiologicamente em todas as células e a sua homeostase é mantida por sistemas antioxidantes. As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. Entre as defesas não-enzimáticas podemos citar o tripeptídeo glutationa (GSH, na forma reduzida) e vitaminas como o ácido ascórbico (vitamina C) e o alfa-tocoferol (vitamina E). Na maioria das células, a respiração mitocondrial é a principal fonte endógena de espécies reativas (Kowaltowski et al., 2009) pela redução parcial do O₂ gerando ânion superóxido O₂^{•-}. Este pode causar dano *per se* ou ser metabolizado a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1):



Além da SOD, as defesas antioxidantes enzimáticas mais conhecidas são a catalase (CAT) (E.C. 1.11.1.6) e a glutationa peroxidase (GPx) (E.C. 1.11.1.9). A catalase decompõe o H₂O₂, produzindo água e oxigênio:



A enzima GPx também decompõe o peróxido, porém fazendo uso de um mecanismo diferente. Ela utiliza a GSH para reduzir o H₂O₂ a água. A glutationa oxidada (GSSG) nessa reação é reduzida novamente pela ação da enzima glutationa redutase, consumindo NADPH (Boveris, 1998).

Se o H₂O₂ formado reagir com metais de transição (como o Fe⁺² e o Cu⁺¹), irá gerar o radical extremamente reativo hidroxil (•OH), em uma reação denominada reação de Fenton – em homenagem ao químico britânico Henry John Horstman Fenton que descobriu esta reação ao final do século XIX. Outro destino do superóxido é a reação com óxido nítrico (NO[•]), formando peroxinitrito (ONOO[•]) que,

por sua vez, pode gerar o nitrosil (HONOO), que sofrendo decomposição também forma o radical hidroxil.

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO e METABOLISMO REDOX

Quando ocorre um desbalanço em favor das ER, estas podem oxidar biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas, entre outras). O acúmulo de dano oxidativo é denominado estresse oxidativo e pode levar à morte celular (Halliwell, 2007a). Há muito se associa o estresse oxidativo com envelhecimento, dano por fumaça de cigarro, aterosclerose, diabetes, fibrose cística, artrite reumatóide, mal de Parkinson e Alzheimer e carcinogênese (Cross et al., 1987; Halliwell et al., 1992).

Entretanto, quando há um aumento moderado nos níveis de ER (especialmente as não-radicalares como o H_2O_2), estas atuam como importantes sinalizadores em fenômenos biológicos (Fig. 2) (Finkel, 2003; Giorgio et al., 2007), como: proliferação e sobrevivência celular, comunicação entre células, organogênese e reparo tecidual (Thannickal and Fanburg, 2000; Trachootham et al., 2008).

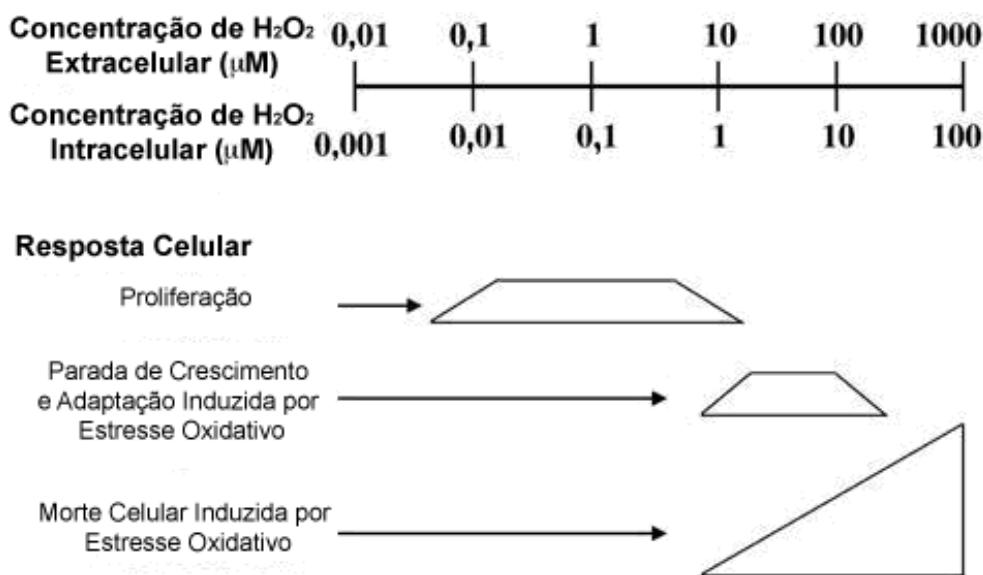


Figura 2. Resposta celular à exposição a H_2O_2 . Exposição de células em cultura a baixas concentrações (0,1-7 μM) de H_2O_2 resulta em níveis intracelulares em torno de 0,01-0,07 μM e estimula diretamente a proliferação

celular. Níveis mais elevados de H_2O_2 (20-200 μM) inicialmente estimulam parada de crescimento, o qual pode ser seguido por adaptação ou estresse oxidativo. Quantidade crescente de morte celular ocorre em concentrações superiores a 10 μM . O ponto de transição preciso para estas respostas celulares pode variar dependendo do tipo celular e das condições de cultura. Adaptado de (Stone and Yang, 2006).

De fato, já se sabe que a função de diversas proteínas é regulada por oxidação reversível (à semelhança da fosforilação) (Fig. 3) (Finkel, 2003). Assim, de subprodutos tóxicos, as ER passaram a ser consideradas segundos mensageiros.

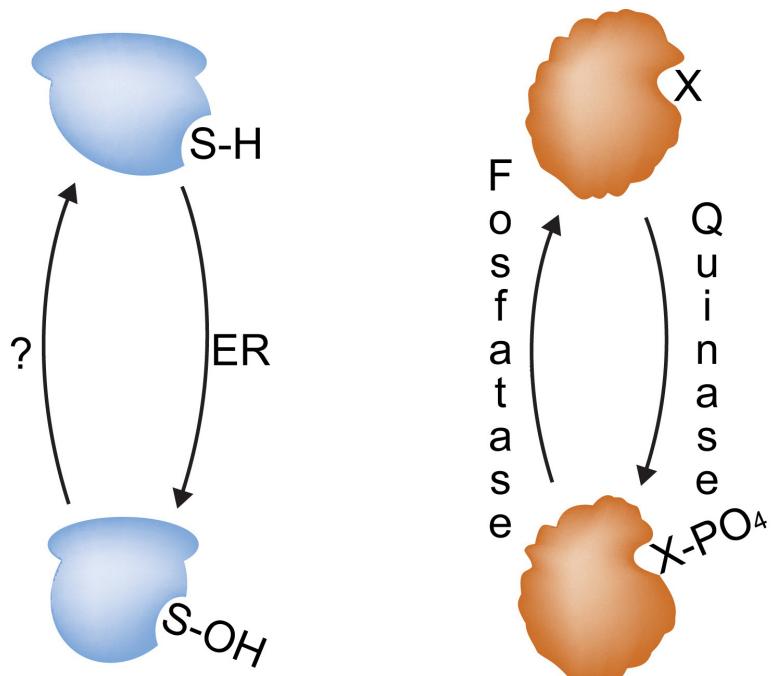


Figura 3. Modulação da atividade protéica por oxidação. Evidências sugerem que ER (especialmente H_2O_2) modificam diretamente resíduos de cisteína específicos em proteínas. A exposição a oxidantes pode converter tais resíduos a derivados sulfênicos ($S-OH$), com alteração na função da proteína. Tal alteração assemelha-se com a regulação da atividade protéica por modificações covalentes de diversos resíduos (X – serina, treonina ou tirosina) por fosforilação reversível. Adaptado de (Finkel, 2003).

1.4. CÂNCER DE PULMÃO e METABOLISMO REDOX

O pulmão possui particularidade como exposição a oxidantes ambientais, contato com oxigênio atmosférico (Biswas and Rahman, 2009) e fumaça de cigarro

(Church and Pryor, 1985) e alta quantidade de células inflamatórias na circulação pulmonar (Ilonen et al., 2009) que predispõe suas células a um ambiente pro-oxidante (Fig. 4). Além disso, todo tumor sólido se desenvolve em um microambiente de inflamação crônica com células pró-inflamatórias atuando como outra importante fonte geradora de ER (Grivennikov et al., 2010) (Fig. 5).

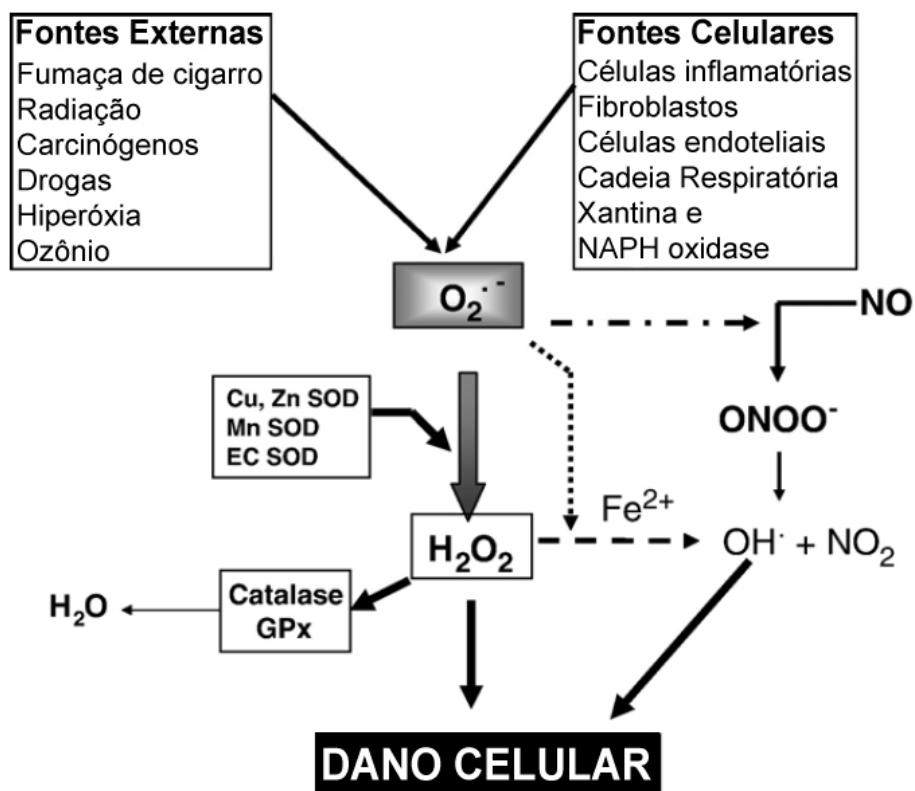


Figura 4. Equilíbrio redox de células pulmonares. Fontes de espécies celulares incluem mecanismos intracelulares e células do microambiente adjacente. O desbalanço entre os níveis de oxidantes e antioxidantes pode levar ao dano por estresse oxidativo ou o acúmulo de algum intermediário específico. Adaptado de (Rahman et al., 2006)

O tabagismo associado ao baixo consumo de antioxidantes é fator de risco para câncer de pulmão (Brennan et al., 2000). Por outro lado, o consumo adequado de alimentos ricos em antioxidantes correlaciona-se com menor incidência da patologia (Mahabir et al., 2008; van Zandwijk and Hirsch, 2003). Pacientes com NSCLC apresentam aumento de estresse oxidativo na circulação periférica (Esme et al., 2008), em eritrócitos (Ho et al., 2007; Kaynar et al., 2005), no fluido do epitélio

pulmonar (ELF do inglês *epithelial lining fluid*) (Melloni et al., 1996), no condensado de ar exalado (EBC do inglês *exhaled breath condensate*) (Chan et al., 2009) e biópsias (Blair et al., 1997; Coursin et al., 1996; Guner et al., 1996; Jaruga et al., 1994; Saydam et al., 1997). Portanto, possivelmente há um desbalanço no metabolismo redox que acompanha esta patologia.

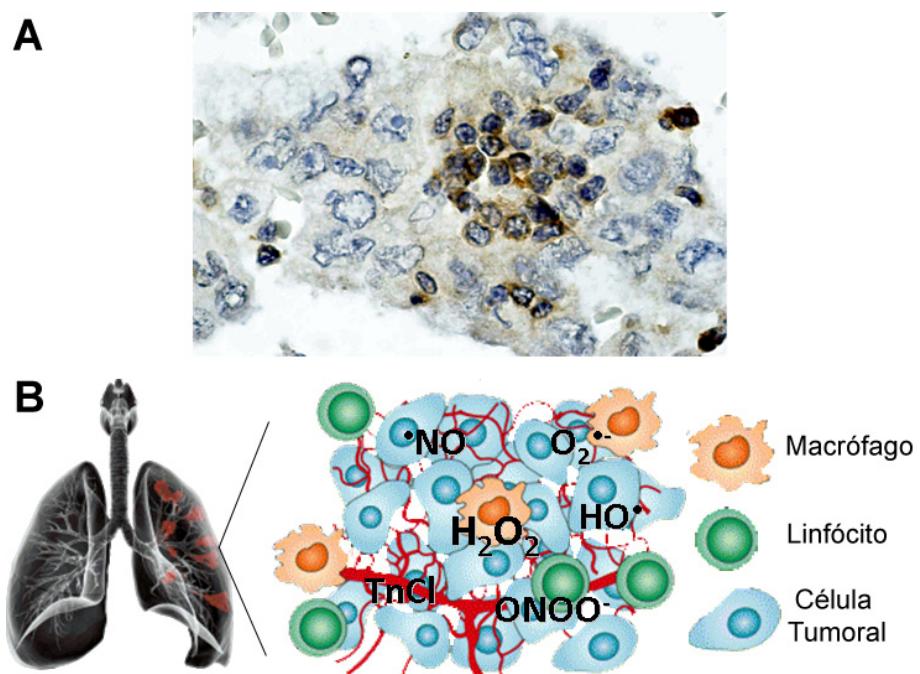


Figura 5. Infiltração pro-inflamatória em tumores sólidos. (A) Lâmina histológica de câncer de pulmão de não pequenas células evidenciando a infiltração de células do sistema imune (marcação marrom para proteína cofilina-1 envolvida com dinâmica do citoesqueleto e muito expressa em células do sistema imune). (B) Esquema do microambiente tumoral demonstrando a presença de células do sistema imune que contribuem para produção de espécies reativas. H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; O_2^- – superóxido; HO^- – hidroxil; TnCl – taurina cloramina; NO^\cdot – óxido nítrico; $ONOO^-$ – peroxinitrito. Fotomicrografia gentilmente cedidas por Carolina B. Muller.

1.5. FENÓTIPO TUMORAL e METABOLISMO REDOX

As células tumorais no curso da sua transformação adquirem alterações, conhecidas como “The Hallmarks of Cancer” (Fig. 4). Cada alteração confere uma vantagem de maneira análoga à evolução Darwiniana (Hanahan and Weinberg,

2000). São elas: **1. AUTO-SUFICIÊNCIA EM SINAIS DE CRESCIMENTO:** a maioria das células aguarda um sinal externo antes de se dividirem. Contrariamente, células tumorais frequentemente produzem seus próprios sinais proliferativos. **2. INSENSIBILIDADE A INIBIDORES DE CRESCIMENTO:** conforme um tumor cresce, ele comprime tecidos adjacentes e, portanto, recebe mensagens que normalmente fariam a divisão celular parar. Células malignas ignoram estes sinais. **3. INVASÃO DE TECIDO E METÁSTASE:** o câncer normalmente leva à morte somente após superar o seu confinamento ao órgão no qual se desenvolveu. Células tumorais precisam escapar do tumor primário, invadir a matriz de diferentes órgãos, encontrarem um nicho metastático adequado e então crescer neste sítio secundário. **4. POTENCIAL REPLICATIVO ILIMITADO:** células saudáveis não se dividem mais do que 70 vezes, mas células malignas necessitam mais do que 70 ciclos para produzir um tumor. Portanto, tumores necessitam aumentar o limite reprodutivo da célula. **5. ANGIOGÊNESE CONTÍNUA:** tumores necessitam dos nutrientes do sangue para sobreviver e secretam fatores que recrutam novos ramos que atravessam a massa crescente de células. **6. EVASÃO DE APOPTOSE:** em células saudáveis, diversas condições (incluindo dano genético ou ausência de aderência à matriz extracelular) ativam rotas de suicídio, mas células tumorais sobrepujam tais mecanismo, assim sendo capazes de sobreviver à mensagens de morte. Cada uma destas alterações pode ser influenciada pelo equilíbrio redox (Pani et al., 2010) (Fig. 4) e algumas das relações bem conhecidas serão aqui exploradas.

Durante o ciclo celular ocorrem oscilações no estado redox (Burhans and Heintz, 2009; Shackelford et al., 2000). A espécie reativa peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um estímulo para a transição G1/S e a superexpressão da enzima catalase é capaz de inibir a proliferação celular (Policastro et al., 2004). O H_2O_2 é um segundo mensageiro na rota proliferativa estimulada por fatores de crescimento

(EGF, PDGF) via MAP quinases (Fig. 5). O H₂O₂ pode ainda inibir fosfatases, intensificando o sinal das quinases (Burhans and Heintz, 2009). Uma vez que muitas das proteínas da rota das MAP quinases são oncogenes, a superexpressão destas e o aumento na produção de H₂O₂ podem atuar em sinergismo contribuindo para o perfil proliferativo de tumores. Ainda, H₂O₂ exógeno é capaz de reverter parcialmente a inibição da proliferação por contato celular (Pani et al., 2010).

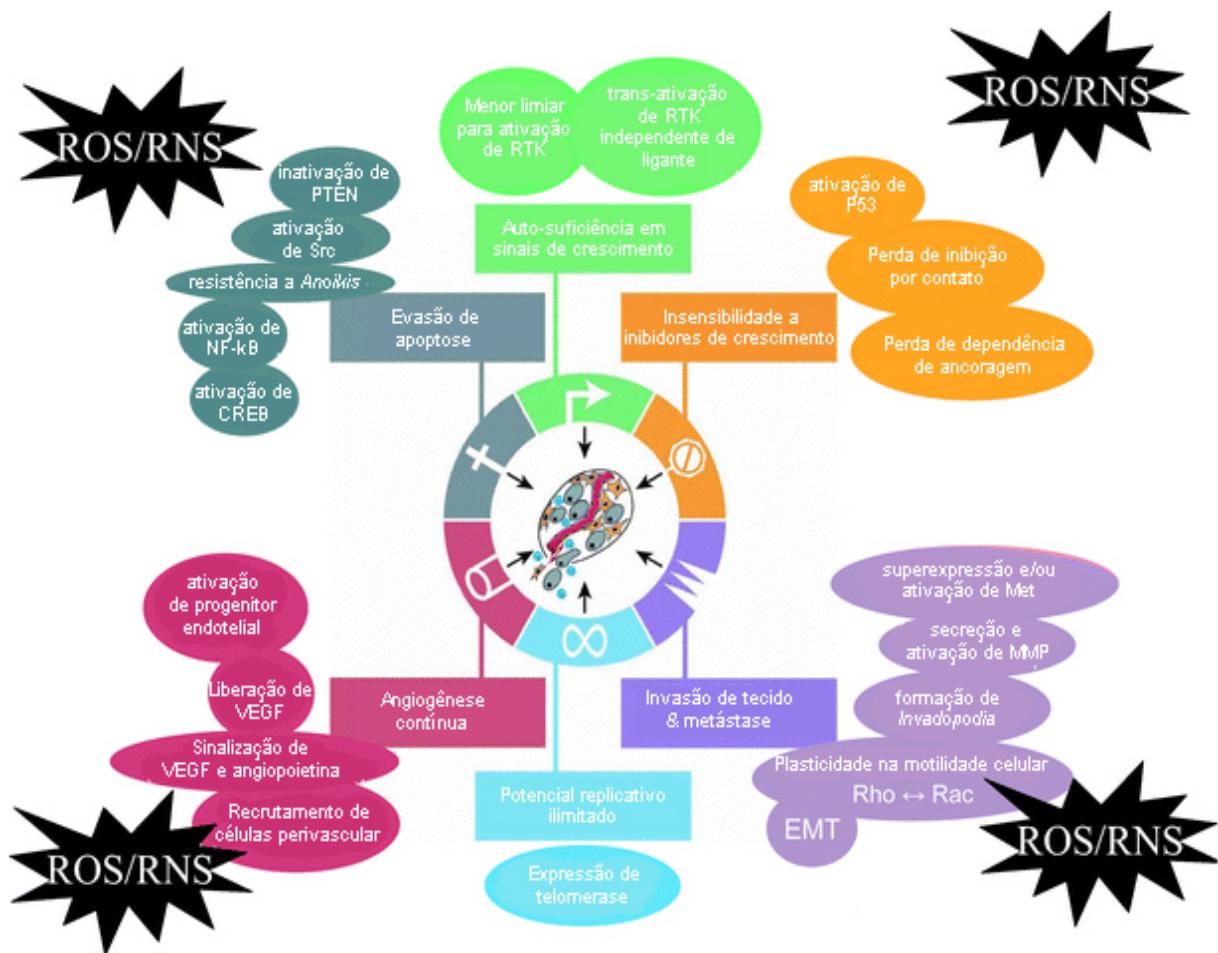


Figura 6. Hallmarks of cancer e metabolismo redox. Espécies reativas do oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) e no nitrogênio (RNS do inglês *reactive nitrogen species*) influenciam cada um dos seis “*hallmarks*”. Baseado no modelo de Hanahan and Weinberg, os mecanismos celulares e moleculares para os quais um papel para ROS/RNS já foi demonstrado estão indicados para cada *hallmark*. Anoikis - morte celular programada induzida por perda de ancoragem; CREB – fator de transcrição “elemento-ligante responsivo a cAMP”; EMT – transição epitelial-mesenquimal, processo associado à perda de adesão, repressão de E-caderina e aumento de motilidade; MMP – metaloproteinase de matriz extracelular; PTEN – fosfatase que atua como gene supressor de tumor controlando a velocidade de proliferação via inibição de ciclo

celular; RTK – receptor tirosina-quinase; Rho – família de GTPases envolvidas em fenômenos como proliferação e apoptose; Rac – subfamília das GTPases Rho envolvida com dinâmica de filamento de actina do citoesqueleto; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular. Adaptado de (Pani et al., 2010).

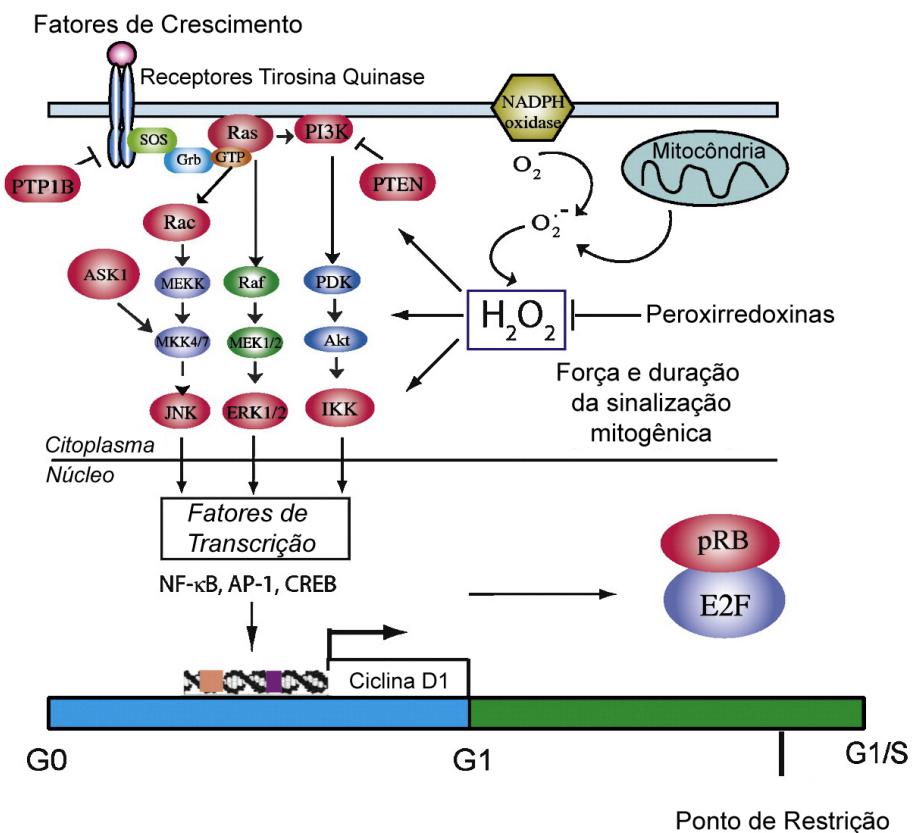


Figura 7. Rotas de sinalização mitogênica redox-dependentes convergem para reguladores centrais da célula. Ativação de Rac1 induz a produção de superóxido, o qual é convertido a H₂O₂. Ambos influenciam o estado de oxidação e a atividade de quinases e fosfatases, e, em níveis fisiológicos, promovem progressão no ciclo celular via regulação transcripcional de reguladores centrais como ciclina D1. Antioxidantes prejudicam a divisão celular por impedir a expressão de ciclina D1 e a fosforilação de pRB. Níveis elevados de oxidantes bloqueiam a progressão no ciclo celular por interromper o tráfego subcelular e controle temporário de diversos fatores de regulação dependentes do metabolismo redox. Proteínas em vermelho são sensíveis ao estado redox intracelular. Adaptado de (Burhans and Heintz, 2009).

Para adquirir fenótipo metastático, uma célula deve ser capaz de migrar e invadir tecidos adjacentes a partir da degradação da matriz extracelular (Connor et al., 2007), e neste contexto a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) é fundamental (Nelson et al., 2006). A migração celular é influenciada por H₂O₂,

estando relacionada com a atividade de MnSOD (Connor et al., 2007). A expressão de MMP também está associada a aumento da atividade de MnSOD (Nelson et al., 2003), via ativação de ERK 1/2 dependente de H₂O₂ (Ranganathan et al., 2001) e JNK (Nelson et al., 2006). Desta forma, assim como na proliferação, o aumento nos níveis de ER pode favorecer o fenótipo tumoral.

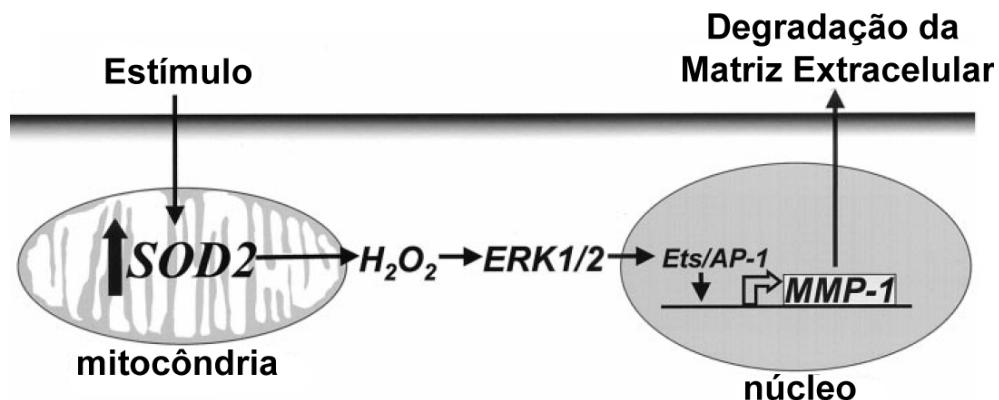


Figura 8. SOD2 regula transcrição de MMP-1 ativando ERK1/2. SOD2 é ativada por diversos estímulos, levando à um aumento no *steady-state* da produção de H₂O₂. O H₂O₂ ativa ERK 1/2, levando à ativação transcrecional do promotor de MMP-1 e subsequente degradação de matriz extracelular. Adaptado de (Ranganathan et al., 2001).

A quimioresistência também é um aspecto que contribui para a agressividade do tumoral, embora não seja exatamente uma alteração necessária à formação de um novo tumor. Neste contexto, o H₂O₂ também pode favorecer a agressividade tumoral por influenciar a resposta da célula à cisplatina, o padrão ouro para a quimioterapia em NSCLC. O H₂O₂ pode induzir aumento na expressão da proteína APE-1 (Yoo et al., 2008) que se correlaciona com mau prognóstico em NSCLC, possivelmente por conferir resistência à cisplatina (Wang et al., 2009a). Outro mecanismo redox que pode conferir quimioresistência é o aumento dos níveis de GSH encontrado em células de diversos tipos de câncer, incluindo carcinomas pulmonares (Cook et al., 1991; Hao et al., 1994; Kigawa et al., 1998; Saydam et al.,

1997). De fato, a inibição da síntese de GSH aumenta a sensibilidade à cisplatina (Soini et al., 2001) e a resposta à radioterapia (Biaglow et al., 1986) em células A549.

Quanto aos “hallmarks” remanescentes, a relação com o metabolismo redox será brevemente citada a seguir. A insensibilidade a apoptose relaciona-se com aumento de MnSOD (Circu and Aw, 2010). A produção de VEGF promovendo angiogênese pode ser estimulada por aumento moderado no nível de H₂O₂, mas não de outras ER testadas (O₂[•] e ·OH) ou aumento excessivo de H₂O₂, e inibida por CAT (Huang and Zheng, 2006). A inibição de CuZnSOD (isoforma citosólica de SOD) também pode reduzir angiogênese (Marikovsky et al., 2002) e o tratamento com CAT causa menor vascularização e diminui os níveis de VEGF *in vivo* (Dra. Hebe Durán, comunicação pessoal). A imortalização celular é favorecida pela indução de telomerase por hipóxia, enquanto vitamina E (um forte antioxidante) inibe a expressão desta proteína (Pani et al., 2010). Assim, a modulação do estado redox talvez seja um importante “hallmark” subjacente a todos os outros.

Desta forma, parece claro que no surgimento de um tumor são selecionadas aquelas células necessariamente capazes de suportar o ambiente oxidativo no qual ele se desenvolve. Discute-se que a estratégia para obter tal êxito seja evitar o estresse oxidativo e processos associados (apoptose, parada de ciclo celular e dano por quimio e radioterapia) desenvolvendo uma maior capacidade antioxidante, conforme apresentado. De fato, há muitas evidências que células tumorais possuem quantidades elevadas de GSH. Entretanto, os dados apresentados demonstram que aumento nos níveis de ER também é compatível com o favorecimento do fenótipo tumoral.

Em vista do apresentado, o único consenso obtido é que o fenótipo tumoral é influenciado pelo estado redox, e que este está alterado de alguma forma a beneficiar as células malignas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Assim, este trabalho objetivou investigar a relação entre o perfil redox intracelular e a agressividade tumoral em NSCLC. Posteriormente, buscou-se validar a influência do ambiente redox na proliferação e migração celular. A possibilidade de reversão destes parâmetros com antioxidantes em linhagens de células humanas de NSCLC norteia a discussão em termos do uso de antioxidantes como terapia adjuvante em intervenções terapêuticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a agressividade de quatro linhagens humanas de NSCLC quanto a:
 - Capacidade de Invasão;
 - Resistência a 7 drogas quimioterápicas;
- Determinar o perfil redox das linhagens;
 - Atividade de três enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx);
 - Potencial antioxidant não enzimático (TRAP);
 - Nível de grupamento tióis reduzidos (SH);
 - Nível de lipoperoxidação (TBARS);
 - Produção endógena de espécies reativas (DCF);
- Investigar o efeito do H₂O₂ na proliferação e migração celular;
 - Adição exógena de H₂O₂ e comparação com proliferação e migração basal;
 - Diminuição do H₂O₂ endógeno via tratamento com CAT exógena e comparação com proliferação e migração basal;

Parte II

3. RESULTADOS

Os principais resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de manuscrito submetido para publicação (Seção 3.1).

Resultados suplementares que não integram o manuscrito, mas contribuirão para a melhor compreensão da discussão deste trabalho estão apresentados como “Resultados Suplementares” (Seção 3.2).

3.1. Manuscrito submetido ao periódico *Free Radical Biology and Medicine*.

**“Intracellular Redox Imbalance Correlates with Tumor Aggressiveness in Non
small cell lung cancer”**

Intracellular Redox Imbalance Correlates with Tumor Aggressiveness in Non-small Cell Lung Cancer

Leonardo L. Motta ^{a,b}, Juliane B. Minotto ^{a,b}, Matheus B. Freitas ^{a,b}, Guilherme A. Behr ^a,
Alfeu Zanotto-Filho ^a, Melissa M. Markoski ^c, José C. F. Moreira ^a, Fábio Klamt ^{a,b,*}

^a Center of Oxidative Stress Research, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil;

^b National Institutes for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre/RS, Brazil;

^c Molecular and Cellular Cardiology Laboratory, IC/FUC, Porto Alegre/RS, Brazil.

*Corresponding author: Prof. Fábio Klamt, Ph.D. Departamento de Bioquímica, ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre/RS, 90035-003, Brasil. Phone: +55 51 3308-5577; Fax: +55 51 3308-5535; e-mail: 00025267@ufrgs.br

Abstract

Lung cancer is the most lethal cancer with great metastatic capacity. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80% of the cases. Since several malignant features are influenced by redox modulations, the present study investigates a possible correlation between the intracellular redox status and the aggressiveness of four human NSCLC cell lines from two different histological types (Adenocarcinomas: A549 and EKVX; Large Cell Carcinoma: H-460 and HOP-92). The activity of three first line antioxidant enzymes (Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase), the lipoperoxidation index, the non-enzymatic antioxidant potential, the reduced thiol group levels and the endogenous production of reactive species were evaluated. Our results demonstrate that the most aggressive NSCLC cell lines have higher intracellular oxidative stress and elevated production of reactive species. Thus, H_2O_2 influence in cellular aggressiveness was assessed. H_2O_2 scavenging completely inhibited NSCLC cell lines growth, while sub-lethal doses of H_2O_2 stimulated proliferation, but only in the most aggressive cell lines. H_2O_2 addition also enhances cell migration, while H_2O_2 scavenging attenuated it. Collectively, these data demonstrate that redox impairment favoring intracellular oxidative stress may follows NSCLC tumor progression. Furthermore, H_2O_2 -scavenging could revert NSCLC aggressiveness, and suggests the use of catalase in adjuvant therapeutic interventions.

Keywords

Non-small cell lung cancer, oxidative stress, redox imbalance, tumor aggressiveness, reactive species, hydrogen peroxide, growth inhibition.

1. Introduction

Lung cancer accounts for more than 1.1 million deaths annually worldwide. It is the most lethal cancer-related pathology [1], with a dismal patient prognosis despite impressive cumulative information of its molecular biology [2]. Long-term survival is most likely when disease is early diagnosed, but this is extremely rare, due to inaccurate diagnostic methods [3] and its capacity to generate early metastasis within the lungs and then to distant organs [4]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 80% of the lung cancer cases and is divided in three major histological subtypes: adenocarcinoma (AdC), large cell carcinoma (LCC) and squamous cell carcinoma [5]. The search for good predictive, diagnostic and prognostic lung cancer biomarkers has been remarkable [6-8], but none of them has been demonstrated effective [9]. However, novel candidates are always coming up [10].

The events involved in the malignant transformation of a healthy tissue follows three major steps: initiation, promotion and progression. All of them have been correlated with some imbalance in cellular redox metabolism [11-14]. Even though the mitochondria is the main source of RS in most cells [12, 15], in the lungs, the exposure to higher O₂ pressure (pO₂), tobacco smoke and others environmental oxidants [16-18] predispose cells to an pro-oxidant milieus [15]. Regarding to lung cancer cells, another important source of RS is the chronic inflammatory microenvironment in which every solid tumor develop [19]. If there is a redox imbalance favoring excess of RS, oxidative stress occurs, oxidizing biomolecules and ultimately leading to cell death [11-13].

Although previous studies generally found elevated oxidative stress in NSCLC in peripheral blood, erythrocytes, epithelial lining fluid, breath condensate [20, 21] and biopsies [22-31], they contain elements of the whole body. Regarding specifically to the

intracellular alterations in malignancies, cells lines suits better as model of study since NSCLC cell lines retain the properties of their parental tumours, being representative of the original tumour [32].

It has been proposed that high antioxidants defenses is a major malignant features in transformed cells, allowing them to avoid oxidative stress-triggered apoptosis, cell cycle arrest and achieve radio/chemotherapy resistance [30, 33]. However, several physiological processes has been implicated with mild increase in RS production, especially nonradical oxidants as hydrogen peroxide (H_2O_2) [34]. These findings have changed the classical view of RS as simply byproduct of cellular metabolism to important intracellular secondary messengers. Nowadays, it is becoming clear the role of redox control in cellular processes, such as proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis, which are highly relevant to tumor malignancy [12-14, 35].

Thus, the present study investigated the potential correlation between an imbalance of intracellular redox parameters (*i.e.*: antioxidant enzymes activities; level of reduced sulphhydryl groups; lipoperoxidation index; the total non-enzymatic antioxidant potential; and the endogenous generation of reactive species) with the basal aggressiveness of four human NSCLC cell lines from two different histological subtypes (AdC and LCC). Cellular aggressiveness was determined based on the evaluation of the invasiveness potential and resistance to common chemotherapeutic drugs clinically used. Our results demonstrate that the most aggressive cell lines have an intracellular redox impairment favoring higher oxidative stress due to elevated rates of reactive species generation. Follow-up experiments were designed to investigate the effect of exogenous H_2O_2 addition and scavenging in two major malignant features: cellular proliferation and migration. H_2O_2 -scavenging reduced and H_2O_2 addition stimulated both processes. The hypothesis here

discussed, supports the use of adjuvant catalase or catalase mimetic in therapeutic interventions.

2. Material and Methods

2.1. Reagents and Equipments

Chemical were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), except where indicated. Spectrophotometric experiments were assayed in a 96-well microplate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices).

2.2. Cell Lines

Four human NSCLC cell lines, derived from adenocarcinomas (AdC: A549 and EKVX); and large-cell carcinomas (LCC: H460 and HOP-92), were obtained from NCI-Frederick Cancer DCTD cell line repository. Exponentially growing cells were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1 µg/mL of amphotericine B and 50 µg/L g of garamycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO₂.

2.3. Evaluation of Cellular Aggressiveness

The invasion index was assessed using the BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber System (BD Bioscience®) following manufacturer's instructions. Data is expressed as the percent invasion/migration and named invasion index. Drugs cytotoxicity (GI₅₀ value) were determined as a dose-response curve with the Sulforhodamine B (SRB) test [36] after drugs treatment, following NCI60 protocol. Briefly, cells (4×10^3) were seeded in a 96 well plate and treated with the drugs after adherence (24h). Three days (72h) later, cells were fixed with cold 10% TCA for 1h at 4°C, washed with distilled water and dried at room temperature. Then, cells were stained with 0.2% SRB (w/v) in 1% acetic acid (v/v) (100 µL.well⁻¹) at room temperature for 20 min followed of five times washing with 1% acetic

acid, before air-drying. Bound dye was solubilized with 10 mM Tris-base solution (pH 10.5) and plates were left on a plate shaker for 10 min. Absorbance was measured at 490 nm.

2.4. Redox Profile Parameters

2.4.1. Sample Preparation and Protein Quantification

Cells (1.5×10^5) were cultivated in 6-well plates for 48 h, washed with PBS and frozen in 10 mM PBS overnight. Then it was freeze-and-thawed twice prior to harvesting and finally centrifuged (1,000 g/5 min). The supernatant protein concentration was determined by Lowry's [37] for data normalization.

2.4.2. Antioxidant Enzymes (AOE) Activities

SOD (E.C. 1.15.1.1) activity was measured by inhibition of superoxide-dependent epinephrine auto-oxidation at 480 nm [38]. One SOD unit was defined as the sample amount that inhibits 50% of epinephrine auto-oxidation. CAT (E.C. 1.11.1.6) activity was measured by H_2O_2 consumption at 240 nm [39]. GPx (E.C. 1.11.1.9) activity was measured by NADPH oxidation at 340 nm in a system containing glutathione, glutathione reductase and *tert*-butyl hydroperoxide as substrate [40]. One GPx unit was defined as nmol NADPH oxidized/min. Results are expressed as enzyme units (U)/mg protein.

2.4.3. Non-Enzymatic Redox Parameters

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) assay is based on luminol-chemiluminescence measurement induced by AAPH (2, 20- azobis 2-amidinopropane) in glycine buffer (pH 8.6) [41]. After system stabilization, sample was added (10 µg of protein) and the chemiluminescence decreases proportionally to the amount of non-enzymatic antioxidants monitored in (Wallace 1450 MicroBeta TriLux Liquid Scintillation

Counter & Luminometer, Perkin Elmer). A time per chemiluminescence curve was obtained and the relative “area under the curve” (AUC) in the recovery phase used to analysis, as previously demonstrated by our group as the most reliable quantification method for “antiradicals that show different kinetic behaviors” [42]. Since higher AUC represents lower antioxidant potential, the result is presented as “1 – AUC”.

Elman's sulphydryl groups (–SH) level was also measured [43]. Samples (50 µg) were diluted in PBS 10 mM and buffer (10 mM boric acid, 0.2 mM EDTA pH 8.5). DTNB 10 mM (5, 5'-dithionitrobis 2-nitrobenzoic acid) was added and, after 60 min, it was read at 412 nm. Results are expressed as nmol SH/mg protein.

As lipoperoxidation index we used the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction [44]. Sample protein (150 µg) was precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and the supernatant incubated with 0.67% TBA, and heated for 25 min at 100°C. After it was read at 532 nm and expressed as MDA nmol equivalents/mg protein.

2.5. Reactive Species (RS) Generation

The probe DCF-DA (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) was used to determine intracellular generation of RS [45, 46]. Cells (2×10^4) were seeded in 96-well plates and grown for 48 h, the culture medium was removed and 10 µM DCF-DA was added in serum-free medium, once FBS reacts with the probe [46]. After cellular incorporation (60 min), wells were washed and cells rinsed with sterile PBS at 37°C. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm.

2.6. Proliferation and Growth Inhibition Assays

The intracellular levels of H₂O₂ can be reduced with exogenous addition of CAT once H₂O₂ diffuses through membranes [47]. In order to test H₂O₂-scavenging and antioxidants supplementation in NSCLC cells proliferation, cells were seeded (4x10³) and, after adherence, treated with purified active or heat-inactivated catalase (125 – 1000 U/mL), Trolox® (25 – 500 µM) and N-acetylcysteine (NAC) (0.5 – 5 mM). Cell number was evaluated every 24 h for 72 h with SRB assay. Data is expressed as “cell number” with a standard curve (cell number X SRB_{abs}) for each cell line. To investigate if catalase growth inhibition was reversible, the assay was repeated removing the catalase after 48 and monitoring cell proliferation for 96 h. The effect of H₂O₂ addition on NSCLC cell lines was evaluated in the same pattern of “Drugs GI₅₀” (see 2.3.).

2.7. Wound Healing Assay

To evaluate cell migration, a wound-healing assay was performed in A549 cell line, the most representative NSCLC cell line in the literature, under H₂O₂-scavenging and addition. Cells (10⁵) were grown to confluence (72 h) in 24-well plates. The monolayers were wounded dragging a 200 µL pipette tip, washed twice with PBS, and then allowed to migrate in medium with 1% FBS plus treatments (catalase or H₂O₂). Images were taken at 0, 6 and 22 h with a inverted light microscope (Nikon Eclipse TE 300), equipped with a digital imaging system. To exclude proliferation effect on the wound healing, the assay was performed in less than one doubling-time with reduced FBS. The wound area (WA) was colored in Photoshop® and quantified in Paint Shop Pro®. The analysis used the formula “1 – (WA / WA_{initial})”.

2.8. Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm S.E.M. (standard error of mean) of at least 3 independent experiments in triplicate. Student's t-test was used to analyze difference between each histological pair of NSCLC cell lines (except where described), with significance level considered $p < 0.05$. Statistical analysis and graphs were obtained with GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA version 5.0.

3. Results

3.1. Aggressiveness of human NSCLC cell lines

To establish the aggressiveness profile of the NSCLC cell lines, we first evaluated their invasion index. Comparing cells within their histological subtype, HOP-92 demonstrated to have a 5.8-fold higher invasive potential than H-460, and EKVX has 5.2-fold higher invasive potential than A549 (Table 1). Regarding to drug resistance, we found that the most invasive cell lines were also more resistant (higher GI₅₀ value) to all drugs tested (Table 1). Thus, for each histological subtype tested there is clearly one most aggressive (most invasive and chemoresistant) cell line: HOP-92 for LCC; and EKVX for AdC. All the upcoming cellular redox parameters evaluated were analyzed comparing the most and less aggressive cell line of each histological subtype.

3.2. Redox Parameters of human NSCLC cell lines

3.2.1. Antioxidant Enzymes (AOE) Activities

The determination of three first line enzymatic antioxidant defense showed that SOD activity was higher in both the most aggressive cell lines regardless of histological subtype (83% for LCC and 20% for AdC) (Table 2). The peroxidases activities, in turn, diverged between histological subtypes. While CAT and GPx activities were 2 fold higher in the most aggressive LCC cell line, it was almost 2-fold decreased in the most aggressive AdC cell line (Table 2). The AOE imbalance in the AdC most aggressive cell line suggest H₂O₂ accumulation. However, both AOE activities imbalances observed suggest a potentially higher generation of RS and cellular oxidative stress in the most aggressive NSCLC cell lines.

3.2.2. Non-enzymatic Redox Parameters

To further explore the correlation between NSCLC cell line aggressiveness and the intracellular redox profile, three additional parameters were evaluated, named lipoperoxidation (TBARS), sulfhydryl levels (-SH) and total non-enzymatic antioxidant potential (TRAP) (Table 2).

Both histological subtypes presented the same pattern: lipoperoxidation was 2-fold higher, while TRAP and sulfhydryl levels were significantly lower in the most aggressive cell lines (Table 2). Taking into account, these data indicate that the most aggressive phenotype of NSCLC cell lines (HOP-92 and EKVX) are associated with higher intracellular oxidative stress possibly due to a higher *steady-state* generation of reactive species.

3.2.3. Endogenous Production of Reactive Species (RS)

Real-time DCF-DA assay was used to evaluate intracellular RS production, showing that the most aggressive cell lines had a significant higher basal fluorescence values and rate of cellular RS production/min (Fig. 1A-B). Altogether, these data suggest that the aggressive behavior of NSCLC cell lines is associated with an intracellular redox impairment favoring higher RS production and intracellular oxidative stress.

3.3. H₂O₂ Influence in Aggressiveness of Human NSCLC Cell Lines

To confirm the previous established association, two major malignant features were evaluated under antioxidant treatments: cell proliferation (Fig. 2-3) and migration (Fig. 4). H₂O₂-scavenging showed attenuation of malignant features, while NAC and Trolox® had no effect (data not shown). Thus, H₂O₂ may be mediating NSCLC tumor aggressiveness and its influence will be further investigated here.

3.3.1. H₂O₂ and Cellular Proliferation

H_2O_2 -scavenging caused a dose-dependent inhibition on cellular proliferation after 72h in all NSCLC cell lines tested (Fig. 2A). Moreover, the higher doses (500 or 1000 U/mL) reflected a complete growth inhibition in all tumor cell lines (already measurable in 48 h). This inhibition was related to a citostatic, not cytotoxic, effect of intracellular H_2O_2 consumption, since *i*) there was no increase in trypan blue positive/unviable cells (data not shown), and *ii*) CAT removal (CAT washout group) readily restored cellular proliferative rate in all NSCLC cell line tested (Fig. 2B). This phenomena seems to be specifically related to H_2O_2 -scavenging, and not a major antioxidant effect, once broader antioxidant such as Trolox[®] (synthetic analog of vitamin E – a lipophilic antioxidant) and NAC (GSH precursor – a hydrophilic antioxidant) treatments did not inhibited NSCLC cell line growth (data not shown). A dose-response curve was assayed to evaluate H_2O_2 toxicity in NSCLC cell lines. Sub-lethal doses (< 40 μM) were proliferative in both most aggressive cell lines, and EKVX, the most aggressive AdC, is more resistant to H_2O_2 (higher GI_{50} value) (Fig. 3). Collectively, our results indicate H_2O_2 as a necessary mediator in NSCLC cell lines proliferation.

3.3.2. H_2O_2 and Cell Migration

H_2O_2 dramatically influenced cell migration 22h post-wound: H_2O_2 scavenging reduced 40%, while the addition of the sub-lethal dose 10 μM enhanced 40% the migrated distance compared to control (Fig. 4). This result suggests that H_2O_2 enhances cell migration. But it cannot be considered a necessary mediator, once its scavenging did not extinguish this behavior.

4. Discussion

Cancer treatment based on DNA mutations and genetic personalized therapy is reaching its limits, once enormous data have been obtained without a correlation in death avoidance [48, 49]. Besides genetic, aberrant glucose and O₂ metabolism are major feature that differ malignant from normal cells [50] and is not subjected to such individual heterogeneities [48]. This energetic metabolic change is intimately linked to redox metabolism, once it can alter reactive species (RS) production rate by mitochondria. Thus, redox impairment is expected to occur in malignant cells and might constitute a possible target for anticancer therapies [51].

Within the lungs, the effect of RS is especially important because pulmonary cells, normal or aberrant, are directly exposed to environmental oxidants, infiltrated pro-inflammatory cells and higher pO₂. Systemic oxidative stress and lower antioxidants are frequently found in lung cancer patients with the progression of disease [20, 31, 52]. This indicate that redox impairment occurs in this pathology, however it is difficult to distinguish whether impaired antioxidant status is a primary disturbance or a consequence of any neoplastic changes [28].

So, the major finding presented here is the association of an intracellular pro-oxidant redox imbalance within the most aggressive NSCLC cell lines evaluated, regardless of their histological subtype (adenocarcinomas or squamous cell carcinomas). To our knowledge, this is the first work to compare the intracellular redox profile of NSCLC cells in light of tumor aggressiveness. Taken all together, we suggest that this redox impairment follows NSCLC tumor progression. Furthermore, the most aggressive cell lines rather than being more sensitive to a pro-oxidant treatment, as previously proposed [48], enhanced their proliferation rate when exposed to H₂O₂ (in sub-lethal doses) and H₂O₂ is proposed as an important mediator on two major malignant hallmarks: cell proliferation

and migration. We also found that elevated SOD activity correlated with invasive and drug resistant phenotype in the NSCLC cell lines tested, regardless of histological type. These results will be discussed further below.

Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxide (GPx) are called first line antioxidant enzymes because they deal directly with RS. Seminal studies found lower antioxidant enzymes (AOE) in NSCLC and correlated the consequent RS elevation with DNA damage and tumor initiation [22, 53]. However, GPx is sometimes found higher [27], lower [23], or unaltered [29] in lung tumor samples, as well as others AOE. MnSOD is usually found altered in human malignancies and because it is the mitochondrial SOD isoform, is long thought to underlie redox cancer impairment [54]. Oberley and Buettner in 1979 predicted that MnSOD activity normalization could revert in part cancer cells phenotype, since numerous studies have shown both *in vitro* and *in vivo* cell growth inhibition with MnSOD overexpression [55]. Although decreased MnSOD activity has been associated with tumorigenesis, a genetic polymorphism conferring higher MnSOD activity correlates with risk of breast, prostate and ovarian cancer [56, 57], even so lung cancer data is controversial [58-60]. This apparent paradox can be explained by the occurrence of sequential mutations in the promoter of *SOD2* gene (encoding MnSOD), shifting MnSOD expression during tumor progression from decreased activity that contributes to DNA mutations in transformed cells to elevated MnSOD expression that sustains tumor progression [61]. Higher MnSOD activity enhances H₂O₂ levels, as well as decreased CAT and GPx activities. CAT is usually found lower in NSCLC tissue [22-24, 26, 29] and a polymorphism conferring lower GPx activity might enhances lung cancer risk [62]. Besides DNA damage [63], H₂O₂ can contribute to tumor progression in a variety of ways: apoptosis evasion; up-regulation of invasive and proliferative phenotype [60]; and

radio and chemoresistance [57]. Despite the conflicting data presented in the literature, the malignant cells must unequivocally overcome the highly oxidizing tumor environment.

Previously, higher SOD and lower CAT/GPx in NSCLC biopsies have been found and attributed to the chronic inflammatory microenvironment, once pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ and IL-1 β) induced this AOE imbalance in A549 cell line [29]. Besides these exogenous sources, here we demonstrated that this imbalance is intrinsic to the malignant cells. Policastro et. al were the very first group to demonstrate that tumor aggressiveness might be supported by this intrinsic imbalance [64]. Higher intracellular oxidative stress was also correlated with cell line aggressiveness in prostate carcinoma [65]. Other enzymes contribute to redox profile and some recent studies are addressing these (e.g.: NADPH Oxidase; myeloperoxidase) [31].

The most prominent data supporting an elevated detoxifying capacity of cancer cells is elevated GSH levels, which are usually found in malignancies [31]. Once the redox status is the sum of pro and antioxidants molecules, the intracellular environment of cancerous cells must be highly reduced for this “higher detoxifying” theory to be true. However, our results clearly demonstrate that the cell lines with higher intracellular oxidative stress are the most aggressive ones, indicating a pro-oxidant intracellular environment that does not match with elevated antioxidant defenses. Thus, our results support that a higher RS steady-state follows tumor progression and, presumptively, must somehow confer a selective advantage, as well as any cancer phenotypic property [50].

Since the discovery that RS are involved in signal pathways (especially non-radical RS, such as H₂O₂), redox impairment in tumorigenesis can be discussed in light of apoptosis, proliferative and migratory capacities. SOD activity is correlated to H₂O₂ levels and elevated in the most aggressive NSCLC cell lines. Elevated H₂O₂ production in several malignant cell lines was already known since 1991 [66], although underestimated

at the time, and some works of the 90's indicates elevation of H₂O₂ in NSCLC , [23, 26, 27]. Furthermore, the exhaled breath condensate of lung cancer patients, proposed as an early diagnostic method [67], also posses significant high H₂O₂ and low antioxidants, suggesting that oxidative stress may be an early marker and is implicated in the development of the disease [68]. With these previous data, a possible role for hydrogen peroxide (H₂O₂) as a mediator in malignant features was assessed.

Redox oscillations occur during the cell cycle with H₂O₂ being a G1/S transition stimulus [69, 70]. Therefore, H₂O₂-scavenging would cause cell cycle arrest. In fact, stable CAT overexpression cause proliferation inhibition in several cell lines [64], in accordance with our results. H₂O₂ is a second messenger in EGF/PDGF derived proliferation via the pathway of MAPK proteins [69], which are largely described oncogenes. Here, H₂O₂-scavenging growth inhibition was no different in light of aggressiveness, demonstrating that all NSCLC cell lines need this mediator. However, only most aggressive NSCLC cell lines enhanced proliferation when H₂O₂ was added. So, maybe higher RS production might be a coupled mechanism together with oncogenes up-regulation that potentiates proliferation and follows tumor progression.

MnSOD activity and H₂O₂ can also stimulate cell migration [71, 72], in accordance with our results. Despite migration, tumor cells must be capable of degradate extracellular matrix to invade adjacent tissues and acquire metastatic phenotype. MnSOD activity also enhances matrix metalloproteinase (MMP) expression [72] via H₂O₂-dependent ERK 1/2 activation [73] and JNK [74]. All together, these data indicates that elevated levels of intracellular H₂O₂ contributes to metastatic features and consequently may be correlated with tumor aggressiveness.

Additionally, H₂O₂ may influence cellular response to cisplatin and another alkylating agents, the gold standard treatment for NSCLC. In NSCLC cell lines, H₂O₂ can

up-regulates APE-1 (a key enzyme in DNA repair) expression [75], which can confer cisplatin resistance [76]. Also, high level of APE-1 is usually found in NSCLC patients with a redox impairment similar to that described here and correlates with poor prognosis [75]. Thus, redox imbalance favoring intracellular oxidative stress and higher RS production can influence cisplatin resistance (as well as others alkylating agents), contributing to tumor aggressiveness. In this way, H₂O₂-scavenging maybe enhances cisplatin treatment effectiveness. Another chemoresistant redox mechanism long discussed is elevated GSH [27, 77, 78] and the inhibition of GSH synthesis in A549 cells increases cisplatin sensitivity [79]. Furthermore, the drug resistance to all the seven drugs tested is unequivocally higher in the intracellular pro-oxidant redox imbalanced NSCLC cell lines and future investigations are made necessary to clarify this strong correlation.

This way, we propose the use of adjuvant antioxidant treatment to decrease intrinsic RS production in malignant cells to enhance the effectiveness of conventional treatments. Pro-oxidant treatments have been proposed to reach toxic RS levels in transformed cells [48, 80], based on the proposed intrinsic higher detoxifying capacity. RS elevation can be harmful to normal tissues and cause undesired side-effects, despite some success already demonstrated [51]. On the other hand, antioxidant approaches have also been effective: inhibition of G1/S transition potentiates cell death in colon cancer cell induced by platinum alkylating agents [81], and CAT mimetic prevented *in vivo* tumor growth [82], peritoneal dissemination of tumor cells [83], pulmonary metastasis [84] and metastatic tumor growth in mouse lung [85].

Once tumor microenvironment has many RS sources, especially in the lungs as discussed previously, it is conceivable that only cells capable of overcome this redox barrier are selected and later will be capable of initiate a tumor and eventually turn into a cancer. Exposure to RS can cause many different cellular responses, depending on the

dose [51]. In light of all the above mentioned, we suggest that tumor progression follows a change in RS threshold for several different processes as proliferation and toxicity, instead of a higher detoxifying capacity, which can be exemplified by EKVX cells. It not only enhances proliferation with H₂O₂ exposure but also is more resistant to H₂O₂ toxicity when compared to the less aggressive AdC cell line A549. Hence, the ability to deal with a pro-oxidant environment does not seem to come from a higher detoxifying capacity, but from a higher H₂O₂ threshold acquisition for toxicity and proliferation. Then, the most aggressive a NSCLC is, more it senses RS as beneficial rather than harmful. Hence, redox metabolism is pivotal to tumor progression.

Hanahan and Weinberg defined the widely accepted hallmarks of cancer as being: *i*) self-sufficiency in growth signals; *ii*) tissue invasion & metastasis; *iii*) evading apoptosis; *iv*) sustained angiogenesis; *v*) limitless replicative potential; and *vi*) insensitivity to anti-growth signals [86]. Our results provide a strong basis supporting redox involvement in at least two of them: proliferative rate and migration potential and were discussed above. The other hallmarks also have been associated with redox impairments and will be here shortly addressed: apoptosis insensitivity is correlated with elevated MnSOD due to superoxide anion consumption [87]; RS can increase cellular production of VEGF, promoting angiogenesis [51] while inhibition of CuZnSOD (cytosolic isoform of SOD) can reduce tumor angiogenesis [88] and H₂O₂-scavenging treatment cause less vascularization and decreased VEGF levels *in vivo*¹; cell immortalization is favored by hypoxia induction of telomerase, while vitamin E (a strong antioxidant molecule) inhibits telomerase expression [89]; and proliferation of contact-inhibited can be partially restored with exogenous H₂O₂ [89]. Furthermore, our data point a role for redox impairment in chemotherapeutic drugs resistance. Thus, redox impairment perhaps is a major hallmark underlying tumorigenesis.

Given the several sources of RS in lung cancer and its known involvement in several cellular processes impaired in malignancies, a better comprehension of NSCLC redox imbalances could possibly benefit these patients. A better comprehension of this impairment in the metabolism of cancer cells such as: redox sensitive-pathways and the relative influence of each specific imbalance could contribute to development of more effective treatment and benefit NSCLC patients.

5. Acknowledgments

We acknowledge the Brazilians funds MCT/CNPq Universal (476114/2008-0), FINEP/IBN-Net (01060842-00) and MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7). F.K. received a fellowship from MCT/CNPq (303613/2008-4).

6. List of Abbreviations

AdC – adenocarcinoma; AOE – antioxidant enzymes; CAT – catalase; GPx – glutathione peroxidase; GSH – glutathione; H₂O₂ – hydrogen peroxide; LCC – large cell carcinoma; RS – reactive species; SOD – superoxide dismutase.

7. References

- [1] Ferlay, J.; Shin, H. R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*; 2010.
- [2] Beasley, M. B.; Brambilla, E.; Travis, W. D. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* **40**:90-97; 2005.
- [3] McWilliams, A.; MacAulay, C.; Gazdar, A. F.; Lam, S. Innovative molecular and imaging approaches for the detection of lung cancer and its precursor lesions. *Oncogene* **21**:6949-6959; 2002.
- [4] Castro, M. A.; Dal-Pizzol, F.; Zdanov, S.; Soares, M.; Muller, C. B.; Lopes, F. M.; Zanotto-Filho, A.; da Cruz Fernandes, M.; Moreira, J. C.; Shacter, E.; Klamt, F. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **116**:3645-3655; 2010.
- [5] Beadsmoore, C. J.; Screamton, N. J. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol* **45**:8-17; 2003.
- [6] Mao, L. Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer. *Oncogene* **21**:6960-6969; 2002.
- [7] Lantuéjoul, S.; Brambilla, E. Prognostic biomarkers in non-small-cell lung carcinoma. *Current Diagnostic Pathology* **12**:418-428; 2006.
- [8] Coate, L. E.; John, T.; Tsao, M. S.; Shepherd, F. A. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* **10**:1001-1010; 2009.
- [9] Muller, C. B.; Barros, R., L.S.; Moreira, J. C. F.; Klamt, F. Bioinformatics approach for the clinical validation of potential non-small cell lung cancer prognostic biomarkers. *Frontiers In Bioscience*; 2010.

- [10] Bankovic, J.; Stojsic, J.; Jovanovic, D.; Andjelkovic, T.; Milinkovic, V.; Ruzdijic, S.; Tanic, N. Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer* **67**:151-159; 2010.
- [11] Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**:1-40; 2006.
- [12] Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:722-728; 2007.
- [13] Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15**:247-254; 2003.
- [14] Visconti, R.; Grieco, D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**:240-245; 2009.
- [15] Kowaltowski, A. J.; de Souza-Pinto, N. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **47**:333-343; 2009.
- [16] Rahman, I.; Biswas, S. K.; Kode, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* **533**:222-239; 2006.
- [17] Biswas, S. K.; Rahman, I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med* **30**:60-76; 2009.
- [18] Rahman, I.; Yang, S. R.; Biswas, S. K. Current concepts of redox signaling in the lungs. *Antioxid Redox Signal* **8**:681-689; 2006.
- [19] Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**:883-899; 2010.
- [20] Esme, H.; Cemek, M.; Sezer, M.; Saglam, H.; Demir, A.; Melek, H.; Unlu, M. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology* **13**:112-116; 2008.

- [21] Ho, J. C.; Chan-Yeung, M.; Ho, S. P.; Mak, J. C.; Ip, M. S.; Ooi, G. C.; Wong, M. P.; Tsang, K. W.; Lam, W. K. Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur Respir J* **29**:273-278; 2007.
- [22] Jaruga, P.; Zastawny, T. H.; Skokowski, J.; Dizdaroglu, M.; Olinski, R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* **341**:59-64; 1994.
- [23] Coursin, D. B.; Cihla, H. P.; Sempf, J.; Oberley, T. D.; Oberley, L. W. An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol Histopathol* **11**:851-860; 1996.
- [24] Guner, G.; Islekel, H.; Oto, O.; Hazan, E.; Acikel, U. Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Lett* **103**:233-239; 1996.
- [25] Blair, S. L.; Heerdt, P.; Sachar, S.; Abolhoda, A.; Hochwald, S.; Cheng, H.; Burt, M. Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **57**:152-155; 1997.
- [26] Oberley, T. D.; Oberley, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* **12**:525-535; 1997.
- [27] Saydam, N.; Kirb, A.; Demir, O.; Hazan, E.; Oto, O.; Saydam, O.; Guner, G. Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Lett* **119**:13-19; 1997.
- [28] Zachara, B. A.; Marchaluk-Wisniewska, E.; Maciag, A.; Peplinski, J.; Skokowski, J.; Lambrecht, W. Decreased selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood and increase of these parameters in malignant tissue of lung cancer patients. *Lung* **175**:321-332; 1997.

- [29] Chung-man Ho, J.; Zheng, S.; Comhair, S. A.; Farver, C.; Erzurum, S. C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* **61**:8578-8585; 2001.
- [30] Kinnula, V. L.; Paakko, P.; Soini, Y. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Lett* **569**:1-6; 2004.
- [31] Ilonen, I. K.; Rasanen, J. V.; Sihvo, E. I.; Knuutila, A.; Salmenkivi, K. M.; Ahotupa, M. O.; Kinnula, V. L.; Salo, J. A. Oxidative stress in non-small cell lung cancer: role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and glutathione. *Acta Oncol* **48**:1054-1061; 2009.
- [32] Wistuba, II; Bryant, D.; Behrens, C.; Milchgrub, S.; Virmani, A. K.; Ashfaq, R.; Minna, J. D.; Gazdar, A. F. Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res* **5**:991-1000; 1999.
- [33] Allen, R. G.; Balin, A. K. Effects of oxygen on the antioxidant responses of normal and transformed cells. *Exp Cell Res* **289**:307-316; 2003.
- [34] Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**:C849-868; 2008.
- [35] Weinberg, F.; Chandel, N. S. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell Mol Life Sci* **66**:3663-3673; 2009.
- [36] Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* **1**:1112-1116; 2006.
- [37] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275; 1951.
- [38] Misra, H. P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **247**:3170-3175; 1972.

- [39] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**:121-126; 1984.
- [40] Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **77**:325-333; 1981.
- [41] Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; del Castillo, M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* **18**:153-158; 1995.
- [42] Dresch, M. T.; Rossato, S. B.; Kappel, V. D.; Biegelmeyer, R.; Hoff, M. L.; Mayorga, P.; Zuanazzi, J. A.; Henriques, A. T.; Moreira, J. C. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* **385**:107-114; 2009.
- [43] Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**:70-77; 1959.
- [44] Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **186**:421-431; 1990.
- [45] Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**:612-616; 1999.
- [46] Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**:231-255; 2004.
- [47] Fisher, A. B. Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal* **11**:1349-1356; 2009.
- [48] Lopez-Lazaro, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* **16**:144-153; 2010.
- [49] Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**:277-300; 2010.
- [50] Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**:891-899; 2004.

- [51] Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* **401**:1-11; 2007.
- [52] Kaynar, H.; Meral, M.; Turhan, H.; Keles, M.; Celik, G.; Akcay, F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* **227**:133-139; 2005.
- [53] Melloni, B.; Lefebvre, M. A.; Bonnaud, F.; Vergnenegre, A.; Grossin, L.; Rigaud, M.; Cantin, A. Antioxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:1706-1711; 1996.
- [54] Oberley, T. D. Mitochondria, manganese superoxide dismutase, and cancer. *Antioxid Redox Signal* **6**:483-487; 2004.
- [55] Oberley, L. W.; Buettner, G. R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* **39**:1141-1149; 1979.
- [56] Bag, A.; Bag, N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**:3298-3305; 2008.
- [57] Wang, S.; Wang, F.; Shi, X.; Dai, J.; Peng, Y.; Guo, X.; Wang, X.; Shen, H.; Hu, Z. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer* **45**:2874-2881; 2009.
- [58] Wang, L. I.; Miller, D. P.; Sai, Y.; Liu, G.; Su, L.; Wain, J. C.; Lynch, T. J.; Christiani, D. C. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **93**:1818-1821; 2001.

- [59] Zejnilovic, J.; Akev, N.; Yilmaz, H.; Isbir, T. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **189**:1-4; 2009.
- [60] Lin, P.; Hsueh, Y. M.; Ko, J. L.; Liang, Y. F.; Tsai, K. J.; Chen, C. Y. Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan. *Lung Cancer* **40**:123-129; 2003.
- [61] Xu, Y.; Fang, F.; Dhar, S. K.; Bosch, A.; St Clair, W. H.; Kasarskis, E. J.; St Clair, D. K. Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res* **6**:1881-1893; 2008.
- [62] Ratnasinghe, D.; Tangrea, J. A.; Andersen, M. R.; Barrett, M. J.; Virtamo, J.; Taylor, P. R.; Albanes, D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* **60**:6381-6383; 2000.
- [63] Brigelius-Flohe, R.; Kipp, A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1790**:1555-1568; 2009.
- [64] Policastro, L.; Molinari, B.; Larcher, F.; Blanco, P.; Podhajcer, O. L.; Costa, C. S.; Rojas, P.; Duran, H. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Mol Carcinog* **39**:103-113; 2004.
- [65] Chaiswing, L.; Bourdeau-Heller, J. M.; Zhong, W.; Oberley, T. D. Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free Radic Biol Med* **43**:202-215; 2007.
- [66] Szatrowski, T. P.; Nathan, C. F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* **51**:794-798; 1991.

- [67] Chan, H. P.; Lewis, C.; Thomas, P. S. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer. *Lung Cancer* **63**:164-168; 2009.
- [68] Chan, H. P.; Tran, V.; Lewis, C.; Thomas, P. S. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol* **4**:172-178; 2009.
- [69] Burhans, W. C.; Heintz, N. H. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* **47**:1282-1293; 2009.
- [70] Shackelford, R. E.; Kaufmann, W. K.; Paules, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* **28**:1387-1404; 2000.
- [71] Polytarchou, C.; Hatziapostolou, M.; Papadimitriou, E. Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affin regulatory peptide gene. *J Biol Chem* **280**:40428-40435; 2005.
- [72] Connor, K. M.; Hempel, N.; Nelson, K. K.; Dabiri, G.; Gamarra, A.; Belarmino, J.; Van De Water, L.; Mian, B. M.; Melendez, J. A. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res* **67**:10260-10267; 2007.
- [73] Ranganathan, A. C.; Nelson, K. K.; Rodriguez, A. M.; Kim, K. H.; Tower, G. B.; Rutter, J. L.; Brinckerhoff, C. E.; Huang, T. T.; Epstein, C. J.; Jeffrey, J. J.; Melendez, J. A. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **276**:14264-14270; 2001.
- [74] Nelson, K. K.; Subbaram, S.; Connor, K. M.; Dasgupta, J.; Ha, X. F.; Meng, T. C.; Tonks, N. K.; Melendez, J. A. Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J Biol Chem* **281**:14100-14110; 2006.

- [75] Yoo, D. G.; Song, Y. J.; Cho, E. J.; Lee, S. K.; Park, J. B.; Yu, J. H.; Lim, S. P.; Kim, J. M.; Jeon, B. H. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer* **60**:277-284; 2008.
- [76] Wang, D.; Xiang, D. B.; Yang, X. Q.; Chen, L. S.; Li, M. X.; Zhong, Z. Y.; Zhang, Y. S. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer* **66**:298-304; 2009.
- [77] Hao, X. Y.; Bergh, J.; Brodin, O.; Hellman, U.; Mannervik, B. Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small cell lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes. *Carcinogenesis* **15**:1167-1173; 1994.
- [78] Kigawa, J.; Minagawa, Y.; Cheng, X.; Terakawa, N. Gamma-glutamyl cysteine synthetase up-regulates glutathione and multidrug resistance-associated protein in patients with chemoresistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **4**:1737-1741; 1998.
- [79] Soini, Y.; Napankangas, U.; Jarvinen, K.; Kaarteenaho-Wiik, R.; Paakkko, P.; Kinnula, V. L. Expression of gamma-glutamyl cysteine synthetase in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **92**:2911-2919; 2001.
- [80] Schumacker, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **10**:175-176; 2006.
- [81] Rakitina, T. V.; Vasilevskaya, I. A.; O'Dwyer, P. J. Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* **73**:1715-1726; 2007.

- [82] Hyoudou, K.; Nishikawa, M.; Kobayashi, Y.; Umeyama, Y.; Yamashita, F.; Hashida, M. PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Free Radic Biol Med* **41**:1449-1458; 2006.
- [83] Hyoudou, K.; Nishikawa, M.; Kobayashi, Y.; Mukai, S.; Ikemura, M.; Kuramoto, Y.; Yamashita, F.; Hashida, M. Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by cationized catalase in mice. *J Control Release* **119**:121-127; 2007.
- [84] Hyoudou, K.; Nishikawa, M.; Ikemura, M.; Kobayashi, Y.; Mendelsohn, A.; Miyazaki, N.; Tabata, Y.; Yamashita, F.; Hashida, M. Prevention of pulmonary metastasis from subcutaneous tumors by binary system-based sustained delivery of catalase. *J Control Release* **137**:110-115; 2009.
- [85] Hyoudou, K.; Nishikawa, M.; Umeyama, Y.; Kobayashi, Y.; Yamashita, F.; Hashida, M. Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin Cancer Res* **10**:7685-7691; 2004.
- [86] Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70; 2000.
- [87] Circu, M. L.; Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**:749-762; 2010.
- [88] Marikovsky, M.; Nevo, N.; Vadai, E.; Harris-Cerruti, C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer* **97**:34-41; 2002.
- [89] Pani, G.; Galeotti, T.; Chiarugi, P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* **29**:351-378; 2010.

1 – page 15 – Personal communication with Hebe Durán and Irene Ibañez in “VI Meeting of SFRBM South American Group – Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009”.

Figure Legends

1. Steady-state of reactive species (RS) production in human NSCLC cell lines. Real-time DCF-DA assay was performed to assess the production of reactive species (RS). Kinetics (left) and rate/min (right) of RS production is shown for large cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B) cell lines. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=3). *P < 0.05 compared within the same histological type using t-test.

2. H₂O₂-scavenging causes growth inhibition in human NSCLC cell lines. Addition of the enzyme catalase causes cell growth inhibition in a dose-dependent fashion with no observable difference in all the four human NSCLC cell lines tested (A). Growth inhibition is reverted in all NSCLC cell lines (B-C) with the washout of catalase 48h after its addition. The cells return to its usual proliferation rate as depicted by curve angle. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=4). *P < 0.05 compared with control using t-test.

3. Dose-response curve of human NSCLC cell lines to H₂O₂ exposure. Doses higher than 40 μ M is toxic to the human NSCLC cell lines. The sub-lethal doses were proliferative for both the most aggressive cell lines, HOP-92 for large cell carcinoma (A) and EKVX for adenocarcinoma (B). Also, EKVX was more resistant H₂O₂ toxicity (higher GI₅₀ value). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=5). *P < 0.05 compared with control using t-test.

4. Migratory behavior of A549 cells with H₂O₂ addition and scavenging. (A) Quantification of A549 cells migration 6h and 22h post-treatments. H₂O₂-scavenging reduces A549 cells migration in the growth inhibition dose of 1000 U/mL CAT, while it is enhanced with the proliferative dose of 10 μ M H₂O₂. (B) Representative micrographs (10x magnification) of A549 cells migration. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=3). *P < 0.05 compared with control within each post-treatment time using t-test.

Table 1. Aggressiveness Parameters (invasion index and drug resistance) of the Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines

Large-Cell Carcinoma (LCC)			Adenocarcinoma (AdC)			
	H-460	HOP-92	P	A549	EKVX	P
Invasiveness (invasive/migratory cells)						
Invasion Index	2.15 ± 0.3	12.48 ± 2.6**	0.007	3.70 ± 1.2	19.22 ± 1.8***	0.0004
Drug Resistance ($\mu\text{M GI}_{50}$ value)						
Cisplatin	0.90 ± 0.11	2.51 ± 0.5*	0.0197	3.04 ± 0.1	4.94 ± 0.13***	0.0001
Carboplatin	23.9 ± 4.9	75.4 ± 18.3*	0.0348	81.9 ± 9.1	152.8 ± 16.5**	0.0093
Daunorubicin	0.027 ± 0.007	0.109 ± 0.03*	0.0311	0.052 ± 0.004	0.408 ± 0.06**	0.0012
Doxorubicin	0.029 ± 0.01	0.123 ± 0.03*	0.0185	0.078 ± 0.007	0.64 ± 0.04***	0.0001
5-fluorouracil	4.41 ± 1.35	176.9 ± 65.4*	0.0387	5.2 ± 1.1	355.7 ± 35***	0.0001
Hydroxyurea	315.9 ± 11.1	713.4 ± 98**	0.0068	366.5 ± 53.6	2425 ± 435**	0.0034
Taxol	0.0262 ± 0.021	0.095 ± 0.02*	0.0418	0.019 ± 0.013	0.203 ± 0.06*	0.0256

Data are presented as mean ± S.E.M. (n=4). Bold letters indicates the higher value within the histological type. Invasion Index is defined as “invading cells/migrating cells” as described in material and methods. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared within the same histological type using t-test.

Table 2. Redox Profile of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines

	Large-Cell Carcinoma (LCC)			Adenocarcinoma (AdC)		
	H-460	HOP-92	P	A549	EKVX	P
Antioxidant Enzyme Activities						
SOD (U SOD/mg)	26.6 ± 3.4	48.8 ± 4.8**	0.009	27.7 ± 1.3	33.2 ± 0.7*	0.020
CAT (U CAT/mg)	0.25 ± 0.03	1.19 ± 0.2**	0.007	1.05 ± 0.10	0.62 ± 0.04**	0.007
GPx (U GPx/mg)	0.30 ± 0.05	0.63 ± 0.06*	0.013	1.73 ± 0.21	0.89 ± 0.16*	0.013
Non-Enzymatic Parameters						
Sulfhydryl groups (μmol SH/mg)	211 ± 21	135 ± 5.3**	0.007	250 ± 4.7	194 ± 11.4**	0.001
TBARS (nmol eq. MDA/mg)	0.46 ± 0.08	1.04 ± 0.22*	0.024	0.43 ± 0.09	1.05 ± 0.08**	0.002
Total Antioxidant Potential (TRAP)	0.79 ± 0.02	0.49 ± 0.03**	0.001	0.73 ± 0.04	0.46 ± 0.07*	0.023

Data are presented as mean ± S.E.M (n=4). Bold letters indicates the higher value within the histological type. TRAP unit is “1 - AUC” and higher value corresponds to higher antioxidant potential as described in material and methods. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 when compared the most aggressive to the less aggressive of the same histological type.

Figure 1

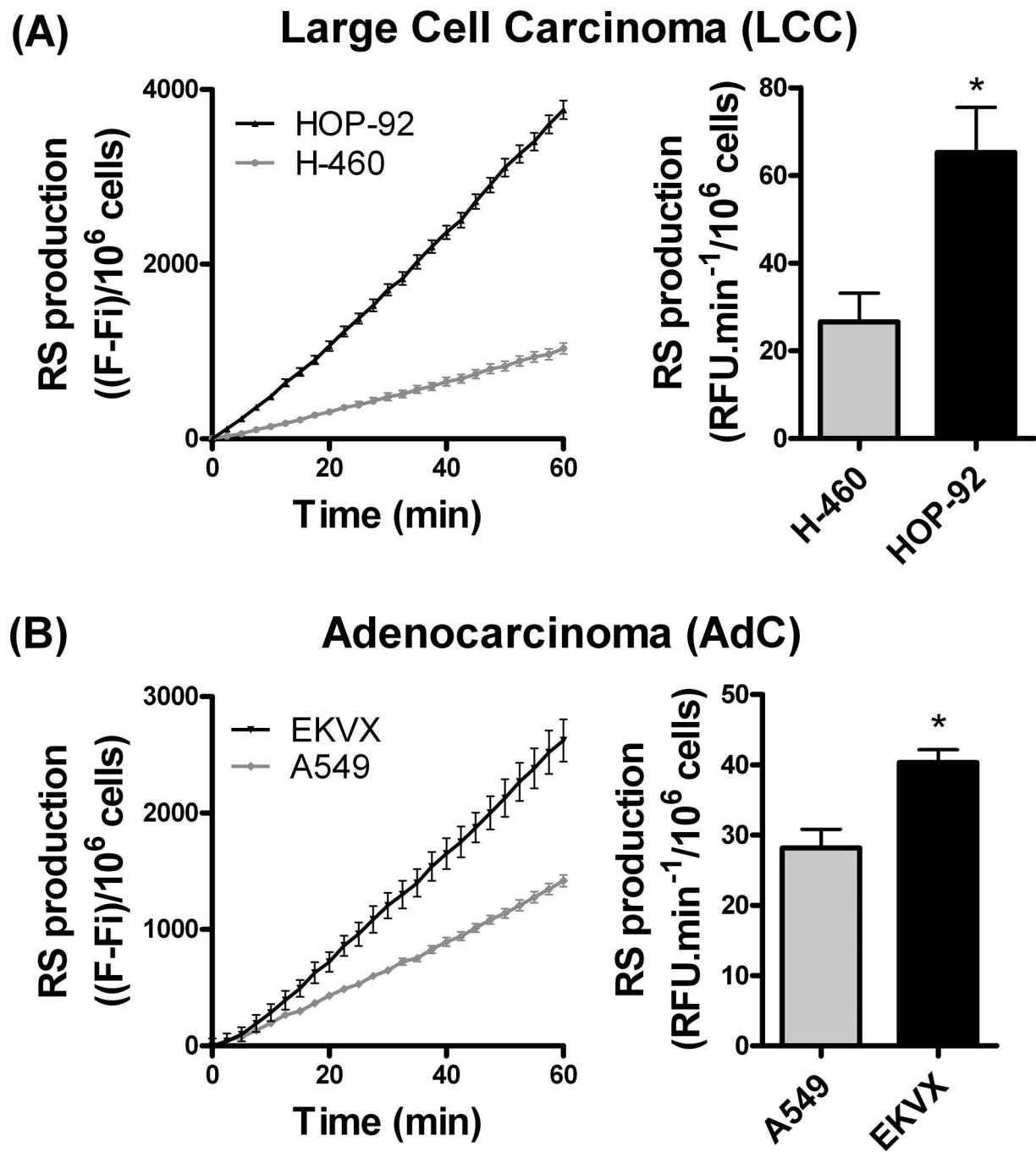
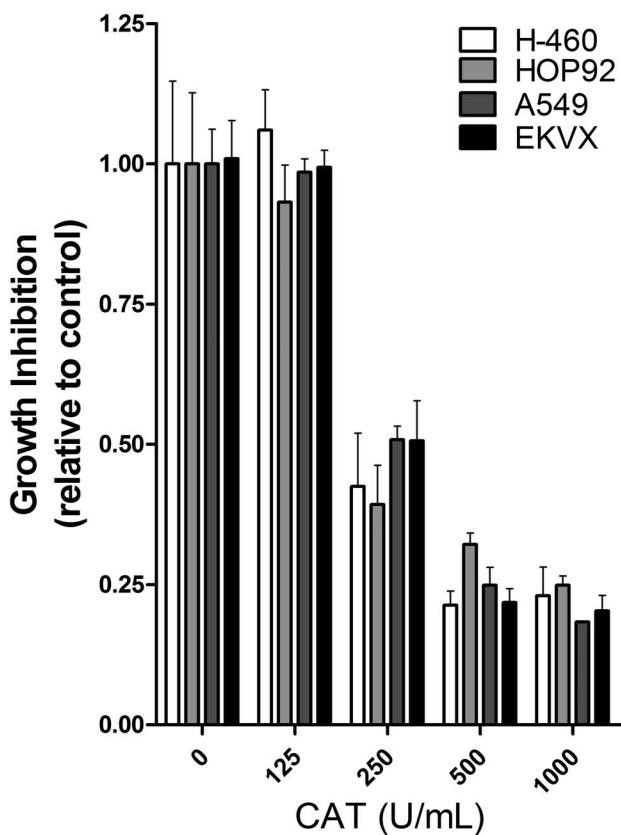


Figure 2

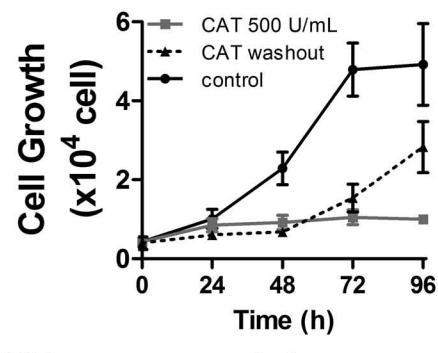
(A)



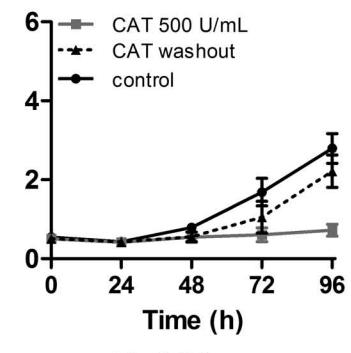
(B)

Large Cell Carcinoma (LCC)

H-460



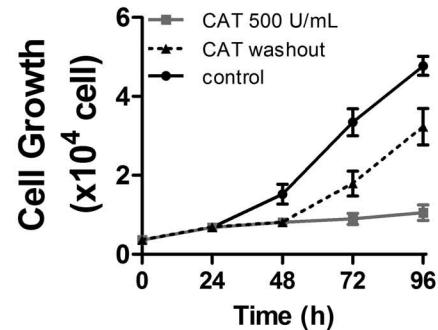
HOP-92



(C)

Adenocarcinoma (AdC)

A549



EKX

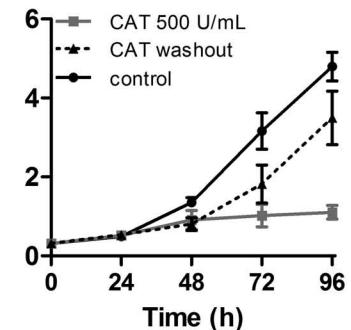


Figure 3

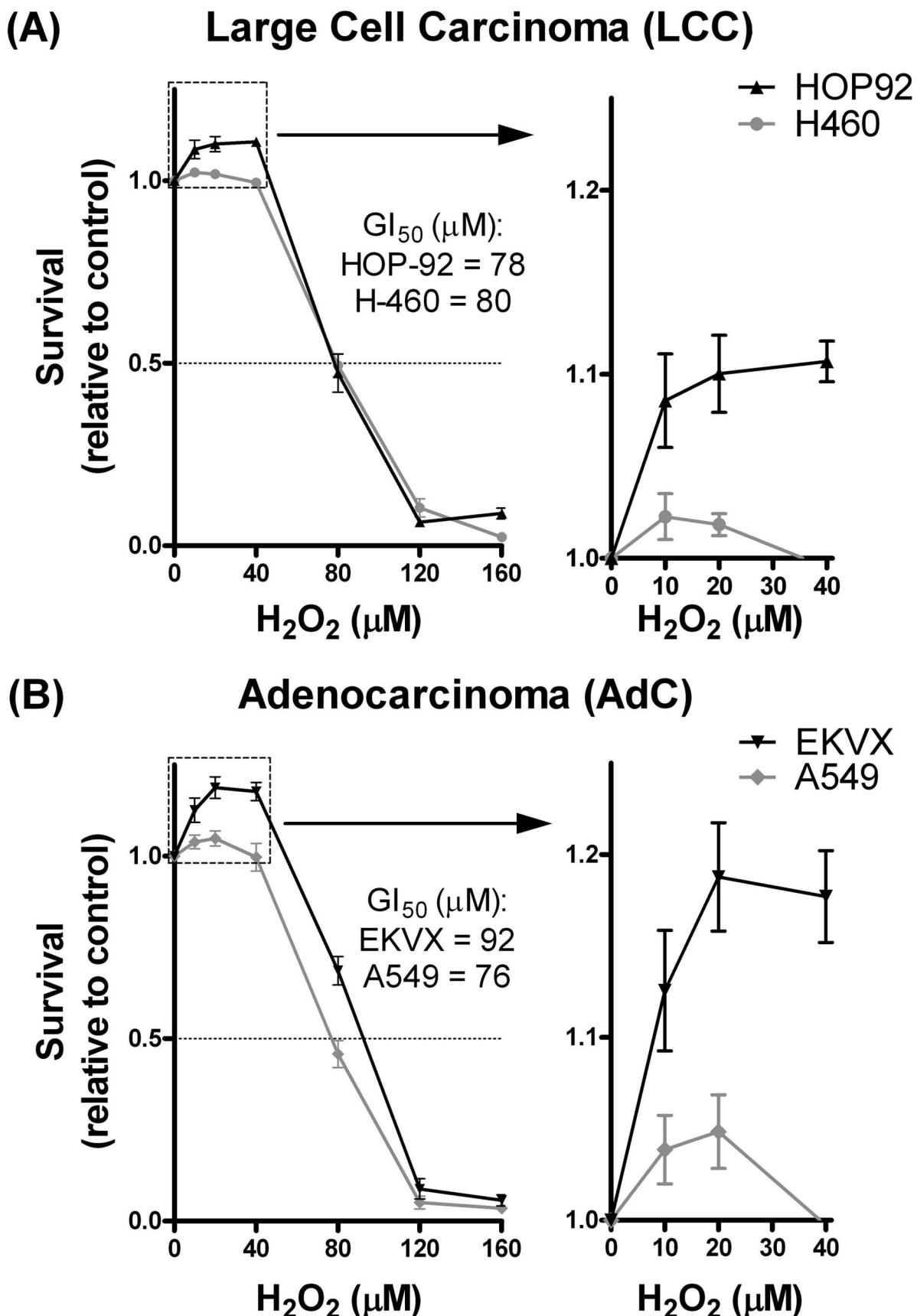
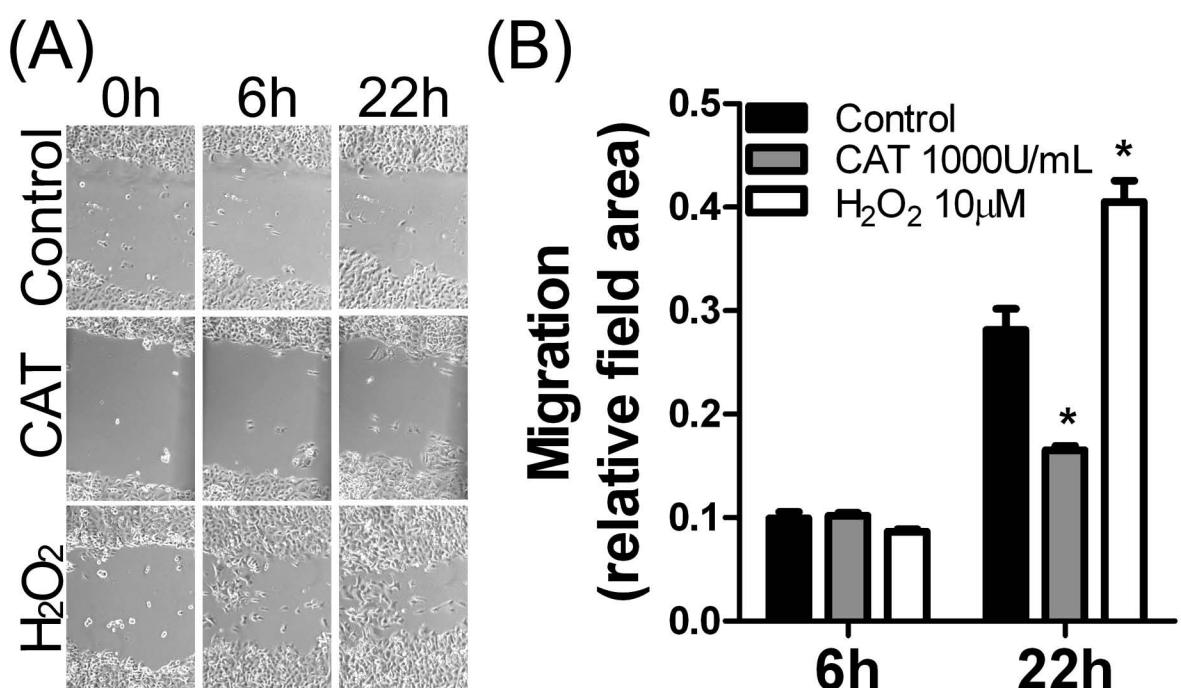


Figure 4



3.2. Resultados Suplementares. (blotting!!)

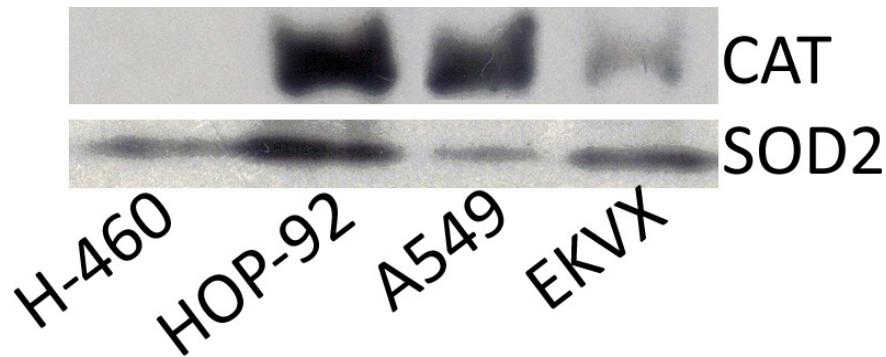


Figura S1. Imunoconteúdo de catalase e SOD2 das quatro linhagens

humanas de NSCLC. Foto representativa de Western blot evidecniando o imunoconteúdo relativo de catalase e SOD2 para cada linhagem. O resultado apresentado confirma as análises de atividade enzimática.

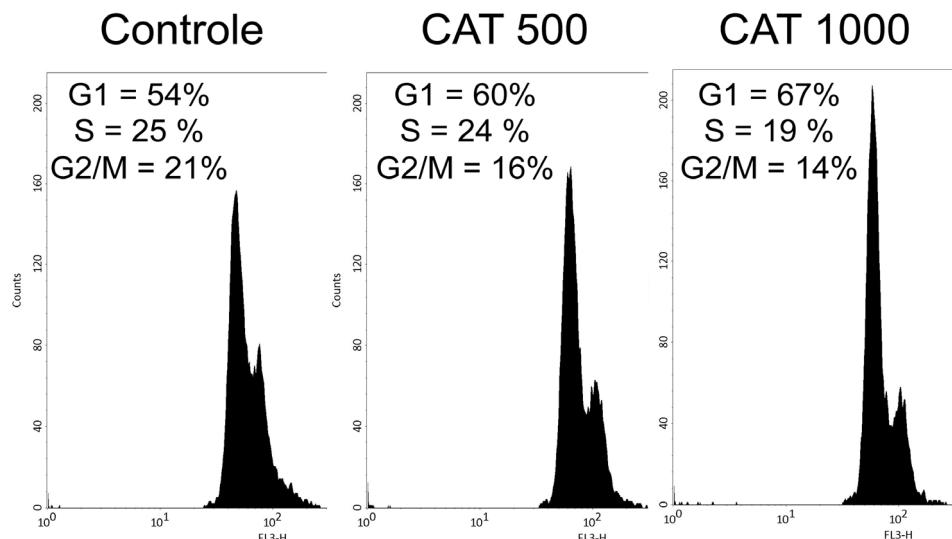


Figura S2. Catalase exógena causa parada de ciclo em G1. Células A549 em fase de crescimento exponencial foram tratadas com catalase exógena, para diminuir os níveis de H_2O_2 endógeno, permeabilizadas e incubadas com iodeto de propídio para quantificar conteúdo de DNA por célula. O tratamento induziu parada de ciclo celular, conforme analisado em citometria de fluxo.

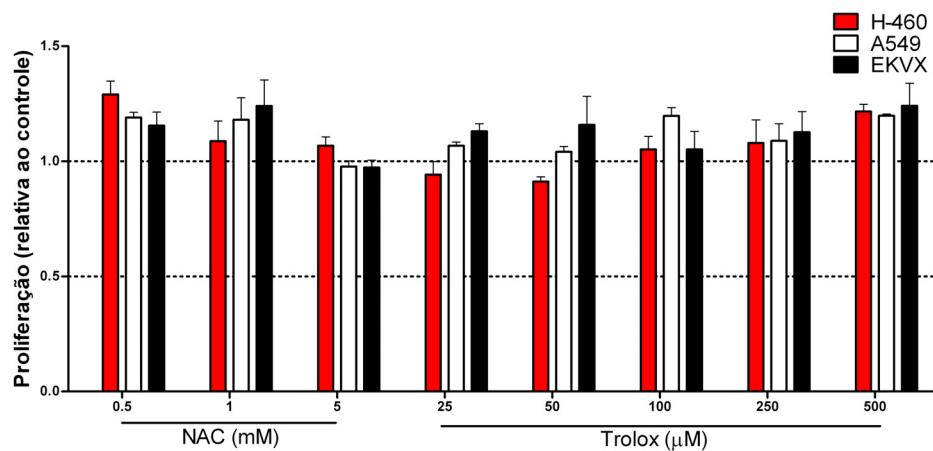


Figura S3. Antioxidantes NAC e Trolox não afetam a taxa proliferativa em linhagens celulares de NSCLC. Células em fase de crescimento exponencial foram tratadas com dois diferentes antioxidantes, N-acetil cisteína e Trolox[®], em doses crescentes por 72h. O número de células foi quantificado pela técnica de SRB e relativizado pelo controle correspondente.

Parte III

4. DISCUSSÃO

Há muito tempo o câncer foi descrito como uma doença genética e sua terapêutica é baseada em reverter alterações no DNA mutado (Lopez-Lazaro, 2010). Para câncer de pulmão não é diferente, e a busca por tratamentos focando em genes, ou produtos gênicos, evoluiu muito conforme apresentado na sessão introdutória desta dissertação. Entretanto, apesar do prestígio desta abordagem, a taxa de mortalidade desta patologia não tem reduzido numa escala apreciável (Jemal, Siegel et al. 2010).

Recentemente, uma alternativa sugerida é a intervenção no metabolismo das células tumorais, uma vez que estas possuem consumo de glicose e oxigênio aberrante (Gatenby and Gillies, 2004; Vander Heiden et al., 2009). Favorável a esta proposta há também o fato de tal aberração ser constante em diferentes neoplasias, diferentemente das mutações que muitas vezes são particulares do paciente (Lopez-Lazaro, 2010). Este fenômeno é conhecido há quase um século (Warburg et al., 1927) e serve de base teórica para diagnóstico de diversas neoplasias malignas, incluindo NSCLC, a partir da utilização da técnica de escaneamento por tomografia por emissão de pósitrons (PET scan do inglês *positron emission tomography*) capaz de identificar incorporação de glicose radioativa (Marom et al., 2000). Com esta tecnologia, é possível até mesmo deduzir o estadiamento da doença de maneira não invasiva (Li et al., 2010; Vansteenkiste, 2003). Apesar disto, a relevância desta aberração metabólica como alvo para intervenção clínica ainda é muito pouco investigada em NSCLC. O metabolismo energético e redox são interconectados, como na cadeia transportadora de elétrons. Portanto, a melhor compreensão do metabolismo redox em células tumorais também constitui um importante alvo de estudo para desenvolvimento de novas terapias (Halliwell, 2007b).

A célula tumoral deve ser capaz de sobrepujar o ambiente oxidativo no qual se desenvolve, conforme apresentado anteriormente. Como o estado redox é a soma de pró e antioxidantes, se tal êxito fosse obtido por elevadas defesas antioxidantes capazes de evitar o dano por estresse oxidativo o equilíbrio intracelular das células tumorais deveria ser fortemente redutor. Entretanto, nossos resultados vão de encontro a esta afirmação, pois as linhagens celulares mais agressivas apresentaram intrinsecamente um equilíbrio redox mais pró-oxidativo, evidenciado por maiores níveis de lipoperoxidação, menor capacidade antioxidant e menos grupamentos tióis reduzidos. Desta forma suportando a tese de que com a progressão tumoral há uma elevação no *steady-state* da produção de ER, que de alguma maneira confere uma vantagem seletiva ao fenótipo cancerígeno.

Pacientes com NSCLC apresentam redução no nível de antioxidantes e aumento do estresse oxidativo sistêmico (Esme et al., 2008). Entretanto, é difícil determinar se este desbalanço redox é causa ou consequências das alterações neoplásicas (Zachara et al., 1997).

Estudos na década de 90 encontraram uma redução de enzimas antioxidantes (EAO) em biópsias de NSCLC e relacionaram este dado com um consequente aumento nos níveis de ER e dano ao DNA (mutações), o que levaria à iniciação tumoral (Coursin et al., 1996; Guner et al., 1996; Jaruga et al., 1994). Entretanto estes dados muitas vezes não eram consistentes, tendo a mesma enzima (neste caso a GPx) sido descrita aumentada (Saydam et al., 1997), reduzida (Coursin et al., 1996) ou inalterada (Chung-man Ho et al., 2001) em diferentes trabalhos.

A enzima mais controversa neste tópico talvez seja a MnSOD (isoforma mitocondrial da enzima SOD que utiliza Mn^{+2} como cofator). Essa proteína normalmente está alterada em diversas neoplasias e por ser a principal EAO mitocondrial, dedicou-se muita pesquisa sobre o seu papel como mediador redox da

malignidade (Oberley et al., 2004). Desde os anos 70 acredita-se que a redução da sua atividade contribuiria para a tumorigênese, uma vez que estudos da época demonstraram que superexpressão da MnSOD causa inibição de crescimento tumoral, e foi proposto que a normalização da atividade desta enzima poderia reverter parâmetros do fenótipo tumoral (Oberley and Buettner, 1979). Entretanto, um polimorfismo associado com aumento da atividade de MnSOD relaciona-se com maior risco de câncer de mama, próstata e ovário (Bag and Bag, 2008; Wang et al., 2009b). Apesar dos dados para cancer de pulmão não serem conclusivos quanto à este polimorfismo (Lin et al., 2003; Wang et al., 2001; Zejnilovic et al., 2009), a relação com outros tipos de câncer sugere que não somente a diminuição de EAO pode contribuir para o fenótipo tumoral. Aparentemente, o que ocorre é uma alteração no padrão de atividade dessa enzima ao longo da progressão tumoral. Mutações sequenciais no promotor do gene SOD2 (que codifica a MnSOD), justificam uma atividade de MnSOD diminuída no início da tumorigênese (contribuindo para maior taxa de mutações) e aumentada posteriormente (sustentando altos níveis de H₂O₂, importante para a progressão tumoral (Xu et al., 2008). É sabido que a isoforma mitocondrial de SOD é mais modulável e foi demonstrado que as linhagens com maior atividade de SOD possuem maior imunoconteúdo de SOD2 (Fig. S1), de forma que as diferenças encontradas podem ser atribuídas à esta enzima. Assim, o aumento de atividade SOD, e especialmente a SOD2, parece estar relacionado com maior agressividade tumoral, corroborando nossos dados.

A enzima CAT está normalmente reduzida em amostras de NSCLC (Chungman Ho et al., 2001; Coursin et al., 1996; Guner et al., 1996; Jaruga et al., 1994; Oberley and Oberley, 1997) e um polimorfismo associado à menor atividade de GPx

pode estar associado com maior risco de câncer de pulmão (Ratnasinghe et al., 2000).

Outras enzimas além das aqui avaliadas e discutidas contribuem para o balanço redox intracelular e alguns trabalhos em NSCLC estão começando a estudá-las, por exemplo NADPH Oxidase e mieloperoxidase (Ilonen et al., 2009) e enzimas moduladoras de grupamentos tióis como tiorredoxinas e peroxirredoxinas (Kinnula et al., 2004).

Os dados até aqui apresentados demonstram que indubitavelmente há um desbalanço redox em NSCLC, embora não exista consenso no sentido desta alteração. Alguns deles corroboram as conclusões do presente estudo, entretanto nenhum deles pode ser extrapolado para o ambiente intracelular. Para avaliar possíveis alterações no metabolismo redox e a influência deste no comportamento da célula tumoral, estudos com e sangue periférico biópsias não são as mais adequadas, pois são evidências de alteração sistêmicas ou do ambiente adjacente e podem conter resultados de diversos tipos celulares além do tumoral (Halliwell, 2007b). Para avaliar alterações no estado redox da célula tumoral linhagens celulares oriundas de amostras de NSCLC constituem um modelo de estudo mais adequado, pois são representativas de seu tumor parental por reterem suas propriedades (Wistuba et al., 1999).

Assim, o principal resultado deste trabalho é a relação encontrada entre agressividade tumoral em NSCLC e um desbalanço redox favorecendo um ambiente intracelular pro-oxidativo. Apesar da abordagem definida previamente baseando as conclusões em comparações entre linhagens do mesmo tipo histológico, a maioria dos parâmetros avaliados confirma a relação entre agressividade e desbalanço pro-oxidativo independentemente do tipo histológico. Ao conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho a comparar o perfil redox de linhagens de NSCLC em termos

de agressividade tumoral. Coletivamente, os resultados apresentados sugerem que essas alterações redox ocorrem ao longo da progressão tumoral e não necessariamente desde o início do processo de tumorigênese. Assim, tumores mais agressivos não são mais sensíveis a tratamentos pro-oxidativos, como proposto (Lopez-Lazaro, 2010; Schumacker, 2006). Na realidade, as linhagens mais agressivas se beneficiaram mais de tratamentos com doses sub-letais de H₂O₂ do que as menos agressivas.

O desbalanço enzimático com aumento de SOD e diminuição de CAT e GPx pode ser induzido na linhagem de NSCLC A549 com citocinas pró-inflamatórias que são secretadas no microambiente tumoral pelas células infiltradas do sistema imune (TNF- α , IFN- γ and IL-1 β). Porém, neste trabalho este desbalanço no metabolismo redox foi atribuído ao ambiente de inflamação crônica (Chung-man Ho et al., 2001), enquanto nossos resultados demonstram se tratar de uma característica intrínseca da célula tumoral. Previamente, Policastro *et. al* 2004 demonstrou pela primeira vez em diferentes tipos de linhagens que a agressividade tumoral pode ser sustentada por este desbalanço intracelular intrínseco e revertido pela superexpressão de CAT (Policastro et al., 2004). A relação entre aumento de estresse oxidativo intracelular e agressividade tumoral também foi evidenciada em carcinoma de próstata (Chaiswing et al., 2007).

Esse desbalanço enzimático (aumento de SOD e diminuição de CAT/GPx) contribui para aumento nos níveis da espécie reativa H₂O₂ (esquema 1 e 2), em acordo com estudos prévios onde foi sugerido que o tumor teria uma “incapacidade de detoxificar” adequadamente o H₂O₂ (Coursin et al., 1996; Oberley and Oberley, 1997). Entretanto, estes autores sugeriram que o acúmulo desta ER levaria ao aumento de dano ao DNA, porém os dados apresentados aqui, em associação com a literatura recente (Chaiswing et al., 2007; Lopez-Lazaro, 2010; Pani et al., 2010;

Policastro et al., 2004), sugere que este fenômeno seja uma alteração que favoreça o fenótipo maligno ao longo de toda a progressão tumoral.

É sabido que células tumorais produzem grandes quantidades de H₂O₂ desde o início dos anos 90 (Szatrowski and Nathan, 1991). Trabalhos posteriores sugeriram que haveria elevação nos níveis de H₂O₂ em NSCLC (Coursin et al., 1996; Oberley and Oberley, 1997; Saydam et al., 1997), porém este assunto foi pouco explorado na época. Além disso, o condensado do ar exalado (EBL) de pacientes de câncer de pulmão (um marcador diagnóstico), também possui níveis elevados de H₂O₂ além de quantidades menores de antioxidantes (Chan et al., 2009). A partir da recente elucidação do papel de ER em rotas de sinalização (Finkel, 2003), e especialmente ER não-radicalares como o H₂O₂, a discussão sobre o desbalanço redox em câncer aumentou seu espectro. Além de poder causar dano ao DNA, o aumento nos níveis de H₂O₂ pode contribuir para progressão tumoral de diversas outras formas: evasão de apoptose, aumento do fenótipo invasivo e proliferativo e resistência a radio e quimioterapia (Pani et al., 2010). Assim, um possível papel do H₂O₂ como mediador de parâmetros de malignidade também foi testado.

A remoção (*scavenging*) do H₂O₂ levou a parada de ciclo celular da linhagem de células de NSCLC em fase G1, conforme esperado (Fig. S2). De fato, superexpressão de CAT causa inibição de proliferação em diversas linhagens (Policastro et al., 2004). Quando a remoção do H₂O₂ é revertida, as células voltam a proliferar normalmente. Outros antioxidantes também foram testados, mas não apresentaram o mesmo efeito (Fig. S3). Assim conclui-se que o estímulo à proliferação é garantido pelo H₂O₂ e não se trata de um efeito pro-oxidante global. Em termos de agressividade não foi observado diferença uma vez que todas as linhagens foram igualmente suscetíveis à inibição de proliferação pela remoção do H₂O₂. Então esta espécie reativa pode ser considerada um mediador necessário à

proliferação celular em linhagens de NSCLC. Por outro lado, somente as linhagens mais agressivas tiveram um aumento na sua proliferação quando era adicionado H₂O₂ (doses sub-letras).

A migração celular também foi influenciada por H₂O₂, corroborando os dados da literatura apresentados na sessão introdutória desta dissertação. De fato, já foi demonstrado inibição de migração celular em linhagem de NSCLC por tratamento com antioxidantes contidos em sementes de uva (Punathil and Katiyar, 2009).

Ainda, nossos dados apontam a relação entre maior atividade da SOD com o perfil invasivo e a quimioresistência. A atividade desta enzima pode determinar aumento nos níveis de H₂O₂, o qual já foi demonstrado ser um importante mediador de ambos os fenômenos. Ainda, biópsias de pacientes de NSCLC com um desbalanço redox semelhante ao encontrado aqui apresentam altos níveis de APE-1, o qual se relaciona com mau prognóstico e quimioresistência a cisplatina (Wang et al., 2009a). Portanto, o desbalanço redox favorecendo um ambiente intracelular pro-oxidante pode contribuir para quimioresistência tumoral e é possível que a remoção do H₂O₂ intracelular potencialize a eficácia de tratamentos com cisplatina (Yoo et al., 2008). Outro mecanismo que pode conferir quimioresistência às células tumorais muito conhecido seria o alto conteúdo de GSH destas células (Blair et al., 1997; Hao et al., 1994; Kigawa et al., 1998; Kinnula et al., 2004). De fato, a inibição da síntese de GSH aumenta a sensibilidade à cisplatina (Soini et al., 2001) e à radiação (Biaglow et al., 1986) em células A549.

Além dos agentes a base de platina, a resistência a todos os sete fármacos testados é maior nas linhagens com o desbalanço redox aqui descrito, embora não exista na literatura muitos estudos nessa base. Assim, essa associação aqui evidenciada encoraja estudos que busquem uma associação entre metabolismo

redox e outros fármacos, bem como mecanismo de atuação para uma possível intervenção clínica.

Desta forma, propomos aqui a avaliação do uso de antioxidantes como terapia adjuvante à NSCLC. O tratamento antioxidant primeiramente serie responsável por diminuir a produção de ER das células tumorais, comprometendo assim a sua homeostase. Assim, os tratamentos convencionais poderão ser mais eficientes contra células já comprometidas. O tratamento com pró-oxidantes foi proposto baseando-se na hipótese do “aumento das defesas antioxidantas”, segundo este, devido à elevada produção de ER, seria mais fácil atingir níveis tóxicos nas células tumorais (Lopez-Lazaro, 2010; Schumacker, 2006). Entretanto, apesar de ter demonstrado algum sucesso, o aumento de ER pode ser tóxico a tecidos sadios causando efeitos colaterais indesejados (Halliwell, 2007b). Por outro lado, diversas abordagens com uso de antioxidantes também obtiveram sucesso e serão brevemente mencionadas a seguir. Antioxidantes contidos em sementes de uva (mistura de polifenóis e flavonóides contendo proantocianidinas) são capazes de inibir migração e proliferação celular *in vitro* em linhagens de células de NSCLC, mas não em linhagens de células epiteliais bronco-alveolares não-malignas, e também inibiram crescimento de NSCLC em modelo *in vivo* (Akhtar et al., 2009; Punathil and Katiyar, 2009). A inibição da transição G1/S potencializou a morte celular induzida por agentes alquilantes a base de platina em células de cancer de cólon (Rakitina et al., 2007). Miméticos de CAT preveniram crescimento tumoral *in vivo*, disseminação peritoneal de células tumorais, metástase pulmonar e crescimento tumoral metastático em pulmão de camundongos (Hyoudou et al., 2009; Hyoudou et al., 2007; Hyoudou et al., 2006; Hyoudou et al., 2004). Até mesmo catalase administrada subcutaneamente foi eficaz em reduzir crescimento tumoral em modelo *in vivo* (Policastro et al., 2009).

Coletivamente, esses dados indicam que o aumento nos níveis intracelulares de H₂O₂ favorece o fenótipo tumoral podendo estar relacionado com maior agressividade em NSCLC.

O efeito desencadeado por ER depende do tipo celular e da dose, como mostrado anteriormente (Fig. 1). Assim, em vista do apresentado, este trabalho sugere que a progressão tumoral é acompanhado de uma alteração no limiar de dose que desencadeia diferentes respostas. Isto pode ser exemplificado pela linhagem mais agressiva de AdC, EKVX: ela não só prolifera mais quando exposta a doses sub-letais de H₂O₂, como também é mais resistente à morte induzida por esta ER, quando comparada a A549, a outra linhagem de AdC. Portanto, a célula tumoral pode sobrepujar o ambiente oxidativo por ser capaz de resistir a doses normalmente tóxicas por uma alteração no limiar de sensibilidade ao estresse oxidativo, e não por possuir defesas antioxidantes elevadíssimas. E desta forma, pode se adaptar de maneira a utilizar o estímulo oxidativo – proliferativo ou migratório, entre outros – em seu benefício. Não se pode esquecer que as linhagens mais agressivas possuem maior dano oxidativo e menor potencial antioxidant, e mesmo assim são as mais agressivas. Aparentemente, quando mais agressivo é um câncer de pulmão de não pequenas células, maior a sua sensibilidade ao aumento de ER como algo benéfico ao invés de danoso. Concluindo, nossos achados reforçam o papel de disfunções no metabolismo redox com a progressão tumoral. Uma melhor compreensão deste certamente pode levar a maior eficácia de tratamento.

5. CONCLUSÃO

A célula pulmonar no curso da malignidade enfrenta um ambiente oxidativo e deve ser capaz de superá-lo. Toda alteração fenotípica tumoral confere vantagem seletiva e na tumorigênese as células melhores adaptadas ao ambiente são selecionadas. Os resultados aqui apresentados mostram que linhagens mais agressivas de câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) possuem estado redox intracelular mais pro-oxidativo, em comparação com linhagens menos agressivas. Assim, é possível que células tumorais de NSCLC entre outras alterações adquiridas, sofram um rearranjo no seu metabolismo redox de maneira a favorecer uma maior produção de ER intrinsecamente. Assim, nossos resultados, coletivamente com a literatura, corrobora que aumento de ER pode favorecer a agressividade tumoral em NSCLC.

Este desbalanço se mostrou fundamental para os parâmetros de malignidade tumoral testados, portanto sendo um possível alvo terapêutico. Dadas as diversas fontes de ER que podem alterar a homeostase redox nas células de câncer de pulmão e o conhecido envolvimento do metabolismo redox em diversos processos celulares relevantes à patofisiologia tumoral, uma melhor compreensão do desbalanço redox nas células tumorais de paciente NSCLC pode possivelmente beneficiar estes pacientes. A identificação e compreensão de rotas redox-sensíveis e a influência relativa de cada uma ao desenvolvimento da patologia poderão contribuir para a melhor eficácia de tratamentos e elaboração de novas abordagens terapêuticas para câncer de pulmão de não pequenas células.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar, S., Meeran, S.M., Katiyar, N., and Katiyar, S.K. (2009). Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human non-small cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors. *Clin Cancer Res* 15, 821-831.
- Bag, A., and Bag, N. (2008). Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 3298-3305.
- Bankovic, J., Stojsic, J., Jovanovic, D., Andjelkovic, T., Milinkovic, V., Ruzdijic, S., and Tanic, N. (2010). Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer* 67, 151-159.
- Beadsmoore, C.J., and Screamton, N.J. (2003). Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol* 45, 8-17.
- Beasley, M.B., Brambilla, E., and Travis, W.D. (2005). The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 40, 90-97.
- Biaglow, J.E., Varnes, M.E., Tuttle, S.W., Oleinick, N.L., Glazier, K., Clark, E.P., Epp, E.R., and Dethlefsen, L.A. (1986). The effect of L-buthionine sulfoximine on the aerobic radiation response of A549 human lung carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12, 1139-1142.
- Biswas, S.K., and Rahman, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med* 30, 60-76.
- Blair, S.L., Heerdt, P., Sachar, S., Abolhoda, A., Hochwald, S., Cheng, H., and Burt, M. (1997). Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 57, 152-155.
- Boveris, A. (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58, 350-356.
- Brennan, P., Fortes, C., Butler, J., Agudo, A., Benhamou, S., Darby, S., Gerken, M., Jokel, K.H., Kreuzer, M., Mallone, S., et al. (2000). A multicenter case-control study of diet and lung cancer among non-smokers. *Cancer Causes Control* 11, 49-58.
- Burhans, W.C., and Heintz, N.H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* 47, 1282-1293.
- Buzaid, A.C., Maluf, F.C., and Lima, C.M.R. (2010). Manual de Oncologia Clínica do Brasil, 4 edn (Ernesto Reichmann).
- Castro, M.A., Dal-Pizzol, F., Zdanov, S., Soares, M., Muller, C.B., Lopes, F.M., Zanotto-Filho, A., da Cruz Fernandes, M., Moreira, J.C., Shacter, E., et al. (2010). CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 116, 3645-3655.

Chaiswing, L., Bourdeau-Heller, J.M., Zhong, W., and Oberley, T.D. (2007). Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free Radic Biol Med* 43, 202-215.

Chan, H.P., Tran, V., Lewis, C., and Thomas, P.S. (2009). Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol* 4, 172-178.

Chung-man Ho, J., Zheng, S., Comhair, S.A., Farver, C., and Erzurum, S.C. (2001). Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 61, 8578-8585.

Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 64, 111-126.

Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48, 749-762.

Coate, L.E., John, T., Tsao, M.S., and Shepherd, F.A. (2009). Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 10, 1001-1010.

Connor, K.M., Hempel, N., Nelson, K.K., Dabiri, G., Gamarra, A., Belarmino, J., Van De Water, L., Mian, B.M., and Melendez, J.A. (2007). Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res* 67, 10260-10267.

Cook, J.A., Pass, H.I., Iype, S.N., Friedman, N., DeGraff, W., Russo, A., and Mitchell, J.B. (1991). Cellular glutathione and thiol measurements from surgically resected human lung tumor and normal lung tissue. *Cancer Res* 51, 4287-4294.

Coursin, D.B., Cihla, H.P., Sempf, J., Oberley, T.D., and Oberley, L.W. (1996). An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol Histopathol* 11, 851-860.

Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., and Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107, 526-545.

Esme, H., Cemek, M., Sezer, M., Saglam, H., Demir, A., Melek, H., and Unlu, M. (2008). High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology* 13, 112-116.

Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.

Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15, 247-254.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899.

Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 722-728.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.

Guner, G., Islekel, H., Oto, O., Hazan, E., and Acikel, U. (1996). Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Lett* 103, 233-239.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312-322.

Halliwell, B. (2007a). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35, 1147-1150.

Halliwell, B. (2007b). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401, 1-11.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., and Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119, 598-620.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hao, X.Y., Bergh, J., Brodin, O., Hellman, U., and Mannervik, B. (1994). Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small cell lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 15, 1167-1173.

Ho, J.C., Chan-Yeung, M., Ho, S.P., Mak, J.C., Ip, M.S., Ooi, G.C., Wong, M.P., Tsang, K.W., and Lam, W.K. (2007). Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 29, 273-278.

Huang, S.S., and Zheng, R.L. (2006). Biphasic regulation of angiogenesis by reactive oxygen species. *Pharmazie* 61, 223-229.

Hyoudou, K., Nishikawa, M., Ikemura, M., Kobayashi, Y., Mendelsohn, A., Miyazaki, N., Tabata, Y., Yamashita, F., and Hashida, M. (2009). Prevention of pulmonary metastasis from subcutaneous tumors by binary system-based sustained delivery of catalase. *J Control Release* 137, 110-115.

Hyoudou, K., Nishikawa, M., Kobayashi, Y., Mukai, S., Ikemura, M., Kuramoto, Y., Yamashita, F., and Hashida, M. (2007). Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by cationized catalase in mice. *J Control Release* 119, 121-127.

Hyoudou, K., Nishikawa, M., Kobayashi, Y., Umeyama, Y., Yamashita, F., and Hashida, M. (2006). PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Free Radic Biol Med* 41, 1449-1458.

Hyoudou, K., Nishikawa, M., Umeyama, Y., Kobayashi, Y., Yamashita, F., and Hashida, M. (2004). Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin Cancer Res* 10, 7685-7691.

Ilonen, I.K., Rasanen, J.V., Sihvo, E.I., Knuutila, A., Salmenkivi, K.M., Ahotupa, M.O., Kinnula, V.L., and Salo, J.A. (2009). Oxidative stress in non-small cell lung cancer: role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and glutathione. *Acta Oncol* 48, 1054-1061.

Jaruga, P., Zastawny, T.H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M., and Olinski, R. (1994). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 341, 59-64.

Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G., and Akcay, F. (2005). Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 227, 133-139.

Kigawa, J., Minagawa, Y., Cheng, X., and Terakawa, N. (1998). Gamma-glutamyl cysteine synthetase up-regulates glutathione and multidrug resistance-associated protein in patients with chemoresistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 4, 1737-1741.

Kinnula, V.L., Paakko, P., and Soini, Y. (2004). Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Lett* 569, 1-6.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47, 333-343.

Lantuéjoul, S., and Brambilla, E. (2006). Prognostic biomarkers in non-small-cell lung carcinoma. *Current Diagnostic Pathology* 12, 418-428.

Li, M., Sun, Y., Liu, Y., Han, A., Zhao, S., Ma, L., Zheng, J., and Yu, J. (2010). Relationship between primary lesion FDG uptake and clinical stage at PET-CT for non-small cell lung cancer patients: An observation. *Lung Cancer* 68, 394-397.

Lin, P., Hsueh, Y.M., Ko, J.L., Liang, Y.F., Tsai, K.J., and Chen, C.Y. (2003). Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan. *Lung Cancer* 40, 123-129.

Lopez-Lazaro, M. (2010). A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* 16, 144-153.

Mahabir, S., Schendel, K., Dong, Y.Q., Barrera, S.L., Spitz, M.R., and Forman, M.R. (2008). Dietary alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherols in lung cancer risk. *Int J Cancer* 123, 1173-1180.

Mao, L. (2002). Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer. *Oncogene* 21, 6960-6969.

Marikovsky, M., Nevo, N., Vadai, E., and Harris-Cerruti, C. (2002). Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer* 97, 34-41.

Marom, E.M., Erasmus, J.J., and Patz, E.F. (2000). Lung cancer and positron emission tomography with fluorodeoxyglucose. *Lung Cancer* 28, 187-202.

McWilliams, A., MacAulay, C., Gazdar, A.F., and Lam, S. (2002). Innovative molecular and imaging approaches for the detection of lung cancer and its precursor lesions. *Oncogene* 21, 6949-6959.

Melloni, B., Lefebvre, M.A., Bonnaud, F., Vergnenegre, A., Grossin, L., Rigaud, M., and Cantin, A. (1996). Antioxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1706-1711.

Muller, C.B., Barros, R.L., Moreira, J.C., and Klamt, F. (2011). Bioinformatics approach for the validation of non-small cell lung cancer biomarkers. *Front Biosci (Elite Ed)* 3, 46-50.

Nelson, K.K., Ranganathan, A.C., Mansouri, J., Rodriguez, A.M., Providence, K.M., Rutter, J.L., Pumiglia, K., Bennett, J.A., and Melendez, J.A. (2003). Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin Cancer Res* 9, 424-432.

Nelson, K.K., Subbaram, S., Connor, K.M., Dasgupta, J., Ha, X.F., Meng, T.C., Tonks, N.K., and Melendez, J.A. (2006). Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J Biol Chem* 281, 14100-14110.

Oberley, L.W., and Buettner, G.R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 39, 1141-1149.

Oberley, T.D., and Oberley, L.W. (1997). Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 12, 525-535.

Oberley, T.D., Xue, Y., Zhao, Y., Kiningham, K., Szwedra, L.I., and St Clair, D.K. (2004). In situ reduction of oxidative damage, increased cell turnover, and delay of mitochondrial injury by overexpression of manganese superoxide dismutase in a multistage skin carcinogenesis model. *Antioxid Redox Signal* 6, 537-548.

Pani, G., Galeotti, T., and Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* 29, 351-378.

Policastro, L., Ibañez, I.L., Palmieri, M.A., Molinari, B., and Durán, H. (2009). Modulation of tumor cell proliferation and angiogenesis by catalase treatment inhibits *in vivo* tumor growth (abstract), V.M.o.S.S.A. Group, ed. (Santiago, Chile), pp. 148.

Policastro, L., Molinari, B., Larcher, F., Blanco, P., Podhajcer, O.L., Costa, C.S., Rojas, P., and Duran, H. (2004). Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Mol Carcinog* 39, 103-113.

Punathil, T., and Katiyar, S.K. (2009). Inhibition of non-small cell lung cancer cell migration by grape seed proanthocyanidins is mediated through the inhibition of nitric oxide, guanylate cyclase, and ERK1/2. *Mol Carcinog* 48, 232-242.

Rahman, I., Biswas, S.K., and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 222-239.

Rakitina, T.V., Vasilevskaya, I.A., and O'Dwyer, P.J. (2007). Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 73, 1715-1726.

Ranganathan, A.C., Nelson, K.K., Rodriguez, A.M., Kim, K.H., Tower, G.B., Rutter, J.L., Brinckerhoff, C.E., Huang, T.T., Epstein, C.J., Jeffrey, J.J., et al. (2001). Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 276, 14264-14270.

Ratnasinghe, D., Tangrea, J.A., Andersen, M.R., Barrett, M.J., Virtamo, J., Taylor, P.R., and Albanes, D. (2000). Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 60, 6381-6383.

Saydam, N., Kirb, A., Demir, O., Hazan, E., Oto, O., Saydam, O., and Guner, G. (1997). Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Lett* 119, 13-19.

Schumacker, P.T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 10, 175-176.

Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., and Paules, R.S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28, 1387-1404.

Soini, Y., Napankangas, U., Jarvinen, K., Kaarteenaho-Wiik, R., Paakko, P., and Kinnula, V.L. (2001). Expression of gamma-glutamyl cysteine synthetase in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 92, 2911-2919.

Stone, J.R., and Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8, 243-270.

Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51, 794-798.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D., and Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10, 1343-1374.

van Zandwijk, N., and Hirsch, F.R. (2003). Chemoprevention of lung cancer: current status and future prospects. *Lung Cancer* 42 Suppl 1, S71-79.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Vansteenkiste, J.F. (2003). PET scan in the staging of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 42 Suppl 1, S27-37.

Wang, D., Xiang, D.B., Yang, X.Q., Chen, L.S., Li, M.X., Zhong, Z.Y., and Zhang, Y.S. (2009a). APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer* 66, 298-304.

Wang, L.I., Miller, D.P., Sai, Y., Liu, G., Su, L., Wain, J.C., Lynch, T.J., and Christiani, D.C. (2001). Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 93, 1818-1821.

Wang, S., Wang, F., Shi, X., Dai, J., Peng, Y., Guo, X., Wang, X., Shen, H., and Hu, Z. (2009b). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer* 45, 2874-2881.

Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8, 519-530.

Wistuba, II, Bryant, D., Behrens, C., Milchgrub, S., Virmani, A.K., Ashfaq, R., Minna, J.D., and Gazdar, A.F. (1999). Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res* 5, 991-1000.

Xu, Y., Fang, F., Dhar, S.K., Bosch, A., St Clair, W.H., Kasarskis, E.J., and St Clair, D.K. (2008). Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res* 6, 1881-1893.

Yoo, D.G., Song, Y.J., Cho, E.J., Lee, S.K., Park, J.B., Yu, J.H., Lim, S.P., Kim, J.M., and Jeon, B.H. (2008). Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer* 60, 277-284.

Zachara, B.A., Marchaluk-Wisniewska, E., Maciąg, A., Peplinski, J., Skokowski, J., and Lambrecht, W. (1997). Decreased selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood and increase of these parameters in malignant tissue of lung cancer patients. *Lung* 175, 321-332.

Zamboni, M., and Carvalho, W.R.d. (2005). *Câncer de Pulmão*, 1° edn (São Paulo, Editora Atheneu).

Zejnilovic, J., Akev, N., Yilmaz, H., and Isbir, T. (2009). Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 189, 1-4.

