

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

**PAPEL DA PROTEÍNA COFILINA-1 NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA EM  
CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS**

**Matheus Becker Freitas**



Porto Alegre

2010

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**BIOQUÍMICA**

**PAPEL DA PROTEÍNA COFILINA-1 NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA EM  
CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS**

Matheus Becker Freitas

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica

Porto Alegre

2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, por todo o carinho e investimento que sempre fez em mim, me passando toda a confiança necessária para seguir em frente.

À minha família por todo o apoio, principalmente meus tios Pedro e Joice.

Ao meu avô, que não está mais conosco na Terra, mas tenho certeza que ainda acompanha meus passos me mostrando o melhor caminho a ser seguido.

Ao meu amigo e colega de trabalho José Eduardo Vargas pela amizade e conselhos na parte de biologia molecular.

Ao Daniel Garcia dos Santos pelos ensinamentos durante a minha Iniciação Científica os quais foram de suma importância para seguir no mestrado; além da grande amizade.

À Melissa Markoski pelo grande carinho e pela confiança em aceitar a parceria com o nosso laboratório.

Ao Leonardo Lisbôa da Motta pela amizade, conselhos, futebol e rotinas de laboratórios desgastantes compartilhadas.

Ao Marco Antônio De Bastiani por toda ajuda e conselhos dados durante o mestrado, não poderia ter tido um iniciação científica melhor do que ele.

À Fernanda Martins Lopes cuja alegria nos ajuda e muito a seguir em frente, além da ajuda nos western blots.

À Carolina Müller pela amizade e carinho.

Ao Ricardo Fagundes da Rocha pelos almoços no Giardino, pelas enormes besteiras faladas no laboratório e ajuda em outros momentos de dificuldades.

Ao Steven (Tivinho) pela grande amizade que surgiu durante o intercâmbio dele, além das correções em inglês.

À Andréia Vargas, pela ajuda na cultura celular no instituto de Cardiologia e pela amizade dispensada durante mais de 3 anos.

À Secretaria do Departamento, em especial à Cléia por ter aturado todos os meus pedidos e choradeiras durante esse período!

A todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho, principalmente o pessoal do laboratório 32, seja pelas palavras de conforto, seja pela enorme quantidade de bobagens ditas ao longo desses 2 anos.

E por último, mas não menos importante, ao meu orientador e amigo Fábio Klamt pela oportunidade dada, confiando em mim e no meu trabalho. Tenho ele como um exemplo de profissional e de pessoa. Muito obrigado mesmo professor por ter me aceito nesse grupo tão especial e qualificado que tu tens.

Este trabalho foi realizado no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, 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).

## **ÍNDICE**

Prefácio.....03

### **Parte I**

Resumo.....05

Abstract.....06

Lista de Abreviaturas.....07

1. Introdução.....08

1.1 Câncer de Pulmão.....08

1.2 Cisplatina e mecanismos de resistência.....13

1.3 Cofilina-1.....22

2. Objetivos.....27

2.1 Objetivo geral.....27

2.2 Objetivos específicos.....27

### **Parte II**

Artigo Científico para revista Clinical Cancer Research.....29

### **Parte III**

3. Discussão.....45

4. Conclusão.....49

**Referências Bibliográficas.....51**

**Anexos.....59**

## **Prefácio**

Esta dissertação de mestrado, intitulada “Papel da proteína Cofilina-1 na resistência a agentes alquilantes em câncer de pulmão de não-pequenas células” será apresentada em três partes.

A primeira parte traz um resumo da dissertação, um resumo em inglês, uma introdução sobre o assunto e os objetivos da dissertação. A segunda parte apresenta os materiais e métodos e resultados sob a forma de artigo submetido na revista *Clinical Cancer Research*. A terceira parte da dissertação contém a discussão e a conclusão a respeito dos resultados apresentados nos dois capítulos anteriores.

## **Parte I**

## Resumo

Câncer de pulmão é o tipo de câncer mais comum e letal em todo o mundo, contabilizando 1.3 milhões de mortes anualmente. Sozinho, ele é responsável por mais mortes que os outros três mais letais (mama, cólon e próstata) somados. Há registro de 160.000 mortes/ano nos Estados Unidos e 20.000 mortes/ano no Brasil devido a carcinoma de pulmão. O câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC – do inglês *nonsmall cell lung cancer*) representa aproximadamente 85% dos casos. Apesar do conhecimento da biologia molecular destes tumores ter aumentado muito, o prognóstico de NSCLC continua desfavorável, com uma sobrevida média de 10 meses. Um dos motivos deste mau prognóstico é a dificuldade relacionada a detecção precoce, de modo que a maioria dos pacientes diagnosticados com a doença apresenta estádios avançados, necessitando de tratamentos paliativos como a quimioterapia. A falta de avanço clínico se dá muitas vezes pela inabilidade de aplicação de conhecimentos moleculares ao tratamento. A agressividade tumoral está relacionada, entre outros fatores, à capacidade metastática e a resistência à quimioterapia. Carcinomas de pulmão são de difícil cura devido à sua grande capacidade metastática, fenômeno que requer alta mobilidade celular. Uma das principais proteínas encarregadas deste fenômeno é a cofilina-1. Esta proteína atua aumentando a taxa de despolimerização dos filamentos de actina (F-actina). A alta atividade dessa proteína foi correlacionada *in vitro* com maior invasividade em câncer de mama. A quimioterapia com uso de cisplatina (em combinação ou não com outras drogas) – e análogos com menos efeitos colaterais, como a carboplatina – tem se mostrado a escolha mais eficaz para pacientes com NSCLC avançado. Estes agentes alquilantes são, portanto, as drogas de escolha para o tratamento clínico de NSCLC, justificando a escolha dessa drogas para o estudo. A ação antitumoral dos agentes alquilantes se dá por dano ao DNA, promovendo apoptose; entretanto, após algumas sessões é comum que este tratamento perca eficácia em alguns pacientes. Diversos fenômenos moleculares podem ser atribuídos à essa resistência: maior inativação da droga, menor influxo da droga, insensibilidade das rotas apoptóticas e maiores níveis de reparo de DNA. Estudos prévios do nosso grupo correlacionaram altos níveis de expressão de cofilina-1 a uma maior resistência a agentes alquilantes em linhagens humanas de NSCLC. Por isso, com este trabalho objetivamos corroborar e reforçar o papel da proteína cofilina-1 na resistência a agentes alquilantes, onde células A549 foram submetidas a 2 abordagens: uma seleção de células intrinsecamente resistentes a cisplatina, e outra usando biologia molecular para super-expressar a cofilina-1 e posteriormente verificar um aumento na resistência. Nossos resultados mostraram que um aumento na resistência possivelmente está relacionado a um aumento no imunoconteúdo de cofilina-1, e que aumento no imunoconteúdo dessa proteína está associado a um aumento na resistência à cisplatina. Por essa razão, a cofilina-1 surge como uma possível e forte candidata para ser um biomarcador em câncer de pulmão de não pequenas células, não somente ditando o prognóstico, como também o melhor tratamento a ser escolhido para o paciente.

## ABSTRACT

Lung cancer is the most common and lethal type of cancer in the world, and is responsible for 1.3 million deaths annually. Alone, it is responsible for more deaths than the other three most lethal cancers (breast, colon and prostate) together. There are 160,000 registered deaths/year in the United States and 20,000 deaths/year in Brazil from lung carcinoma. Cancer represents approximately 85% of the cases. Even though the knowledge of the molecular biology of these tumors is well known, the prognosis of NSCLC continues to be unfavorable, with an average of 9-11 months. One of the motives of this bad prognosis is the related difficulty of initial detection, because the symptoms of the majority of patients with the disease do not present until advanced stages, where palliative treatment is necessary like chemotherapy. The lack of clinical advance itself can be given to the non-application of molecular knowledge to the treatment chosen. Tumoral aggression is related to the metastatic capacity and resistance to chemotherapy. Lung carcinomas are difficult to cure due to their great metastatic capacity, a phenomenon that requires highly cellular mobility. One of the principal proteins responsible for this phenomenon is cofilin-1. This protein acts by changing the cost of depolymerization of the actin filaments (F-actin). The high activity of this protein was correlated *in vitro* with more invasiveness in breast cancer. Chemotherapy with the use of cisplatin (in combination or not with other drugs)—and analogs with less collateral effects, like carboplatin—it has shown itself to be a more efficient choice for patients with advanced NSCLC. These alkylating agents are, therefore, the drugs of choice for the clinical treatment of NSCLC, justifying the choice of these drugs for the study. The anti-tumoral action of alkylating agents themselves causes DNA damage, promoting apoptosis; however, after some sessions it is common that this treatment lost efficacy in some patients. Diverse molecular phenomena can be attributed to that resistance: the more inactivation of the drug, the more drug efflux, insensibility to the apoptotic cycle and larger levels of DNA repair. Previous studies from our research group correlated high levels of expression of cofilin to a higher resistance to alkylating agents in human NSCLC cell lines. For this, with this work we try to corroborate and reinforce the role of the protein cofilin-1 on the resistance to alkylating agents. A549 cells were submitted via 2 approaches: the first was for the selection of cells intrinsically resistant to cisplatin, and the other used molecular biology to detect the overexpression of cofilin-1 and after an increase in resistance was verified. Our data shows that the increase in resistance is possible correlated with an increase in the immunoccontent of cofilin-1. A rise in the immunoccontent of this protein was associated with an increase in resistance to cisplatin. Therefore, cofilin-1 becomes a possibly strong candidate as a biomarker in nonsmall cell lung cancer, not only predicting prognosis, but also helping to choose a better treatment for the patient.

## LISTA DE ABREVIATURAS

*CFL1*: nomenclatura referente ao gene da cofilina-1 humana.

DMSO: dimetil sulfóxido

HBSS: Hank's balanced salt solution

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NCI: National Cancer Institute

NSCLC: nonsmall cell lung cancer

SFB: Soro Fetal Bovino

ADF: actin-depolymerizing factor

MMR: mismatch repair

NER: nucleotide excision repair

*ATP7A*: gene do transportador P de cobre ATPase tipo A

*ATP7B*: gene do transportador P de cobre ATPase tipo B

## 1. Introdução

### 1.1 Câncer de Pulmão

Nos idos de 1800, o câncer de pulmão era uma doença rara, representando somente 1% de todos os cânceres vistos em autópsias. Pelo começo de 1900, a incidência de tumores malignos de pulmão começou a aumentar, e embora muitos cânceres de pulmão ocorriam em homens, um crescimento constante fora observado nas mulheres na década de 1960. Embora a associação entre o cigarro e o câncer de pulmão era suspeitada pelos médicos na década de 1930, a causa do aumento dramático não fora bem estabelecida até estudos epidemiológicos na década de 1950 mostrarem uma forte associação entre o fumo e o câncer de pulmão (Sun *et al.*, 2007)

Atualmente, o câncer de pulmão é uma doença altamente letal. O percentual de pacientes que apresentam sobrevida superior a cinco anos varia entre 13 a 21% em países desenvolvidos e entre 7 a 10% em países em desenvolvimento. O principal fator de risco para o seu desenvolvimento é o tabagismo. Tabagistas têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver carcinoma de pulmão quando comparados aos não-fumantes (Jamnik, 2008). Segundo dados do INCA, o câncer de pulmão/brônquios/traquéia foi o câncer com maior taxa de mortalidade no período de 1985 a 2007 para homens, e o segundo para mulheres no período de 1997 a 2007. É o câncer que, em Porto Alegre, apresenta a maior incidência no período de 1993 a 1997 tanto para homens quanto para mulheres (INCA, 2010).

O câncer de pulmão é geralmente classificado em dois tipos histológicos: câncer de pulmão de pequenas células (SCLC – do inglês *small cell lung cancer*), e câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC – do inglês *nonsmall cell lung cancer*). O de

não-pequenas células é responsável por aproximadamente 85% de todos os casos de câncer de pulmão.

O estadiamento patológico (TNM, ver anexo, tabela 1) dessa enfermidade é de extrema importância para determinar o prognóstico e o tratamento a ser desenvolvido. O tipo de estágio da doença envolve uma combinação de fatores do paciente classificados de acordo com a descrição TNM dentro de categorias e estágios, cada um tendo opções de tratamento geralmente similares e expectativas de vidas diferenciadas (Mountain *et al.*, 1997).

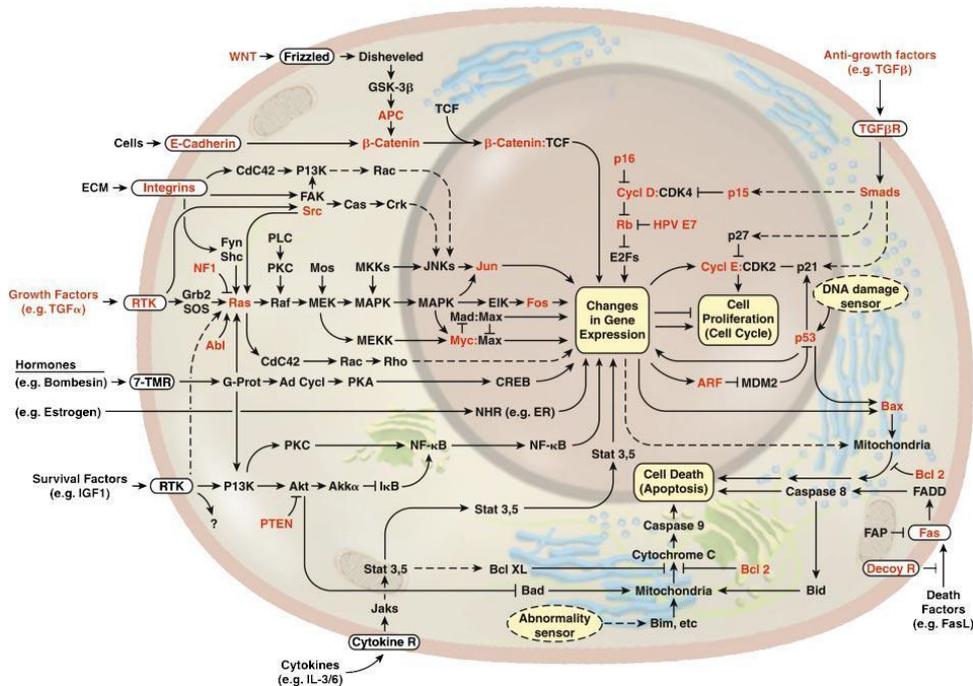
O tratamento para o NSCLC é determinado pelo estadiamento da doença. O procedimento cirúrgico continua sendo a principal forma de tratamento para os estágios iniciais e doenças localizadas. Terapias multimodais se tornaram um modelo para doenças regionalmente avançadas, e pacientes com doença avançada e metastática são candidatos a tratamentos quimioterápicos paliativos, os quais apresentam evidências de melhoras na sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes (Ramalingam e Belani, 2010). Quimioterapia sistêmica também beneficia pacientes com estágios iniciais da doença, e agora tem sido parte das estratégias terapêuticas multimodais para os estágios I e III de NSCLC (Dillman *et al.*, 1990; Arriagada *et al.*, 2004). Aproximadamente 40% dos pacientes com NSCLC apresentam o estágio avançado, incluindo pacientes com doença metastática e aqueles com doença avançada localmente com malignidade pleural ou efusão pericárdica. A opção de tratamento para estes subgrupos são escolhidos baseados no estado de desempenho do paciente (*Performance Status*, sigla em inglês), porque isso é um importante determinador do desfecho (Albain *et al.*, 1991). A quimioterapia combinada é considerada o tratamento padrão para pacientes com NSCLC avançado e um valor de *PS* de 0 a 1 (Ramalingam e Belani, 2010).

Os benefícios da quimioterapia baseada em agentes alquilantes (a base de platina) como um tratamento de primeira escolha para pacientes com NSCLC avançado foi reportado pela primeira vez em um ensaio clínico randomizado publicado em 1988. Evidências mostrando a eficácia da quimioterapia usando agentes alquilantes foram demonstradas por uma meta-análise de todos os ensaios clínicos randomizados. Esta análise demonstrou que a quimioterapia baseada em cisplatina foi associada com uma taxa de sobrevivência de 1 ano (Ramalingam e Belani, 2010). Devido a isso, agentes alquilantes foram combinados com outros medicamentos no intuito de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida do paciente. A tabela 1 mostra a combinação da cisplatina com outros fármacos realizados por diferentes estudos.

Estudo	Regime	Taxa de Resposta	Média de Sobrevivência (meses)	Sobrevivência de 1 ano
<b>Belani et al., n= 369</b>	Cisplatina + Etoposide	15%	9.0	37%
	Carboplatina + Paclitaxel	23%	7.8	32%
<b>Schiller et al., n= 1.155</b>	Cisplatina + Paclitaxel	21%	7.8	31%
	Cisplatina + Gemcitabine	21%	8.1	36%
	Cisplatina + Docetaxel	17%	7.4	31%
	Carboplatina + Paclitaxel	16%	8.1	34%
<b>Fosella et al., n= 1.218</b>	Cisplatina + Vinorelbine	25%	10.1	41%
	Cisplatina + Docetaxel	32%	11.3	46%
	Carboplatina + Docetaxel	24%	9.4	38%
<b>Kelly et al., n= 408</b>	Cisplatina + Vinorelbine	28%	8.1	36%
	Carboplatina + Paclitaxel	24%	8.6	38%

**Tabela 1:** Comparação da associação de 2 drogas utilizadas na clínica. Adaptado de *Suresh Ramalingam and Chandra Belani, 2010.*

Com o passar dos anos, a ciência evolui muito e o conhecimento sobre a biologia dos cânceres também aumentou muito. Com a inovação das técnicas e o conhecimento do genoma e da proteômica, muitos alvos moleculares passaram a ser estudados nesse âmbito, com a finalidade de se buscar biomarcadores para essa patologia e, também, possíveis alvos moleculares que melhorassem ou até eliminassem o câncer de pulmão. Esses estudos na biologia molecular e celular do câncer de pulmão revelaram um circuito de vias e moléculas essenciais na biologia tumoral. Esses estudos incluem identificação de mudanças genéticas e epigenéticas de moléculas específicas resultando na ativação de vias de sinalização importante na carcinogênese como mostrado na figura 1 (Sun *et al.*, 2007). Algumas dessas alterações envolvem oncogenes e genes supressores de tumor já conhecidos anteriormente (Sun *et al.*, 2007). A tabela 2 mostra diversos alvos moleculares e as drogas utilizadas visando auxiliar a qualidade de vida e a sobrevida do paciente.



**Figura 1:** Circuito integrado da célula mostrando diversas rotas de sinalização. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000.

Alvo	Droga	Nome Comercial	Estágio de desenvolvimento no câncer de pulmão
<b>Inibidores da via do EGFR</b>			
EGFR	Gefitinibe	Iressa	Aprovado para NSCLC avançado
EGFR	Erlotinibe	Tarceva	Aprovado para NSCLC avançado
EGFR	Cetuximabe	Erbix	Fase II/III
EGFR	Matuzumabe		Fase I
EGFR	Panitumumabe	Vectibix	Fase II
EGFR, HER2	Lapatinibe	Tykerb	Fase II
EGFR, HER2	HKI-272		Fase II
EGFR, HER2, ERB4	CI-1033		Fase II
<b>Inibidores de VEGF/ VEGFR</b>			
VEGF-A	Bevacizumabe	Avastin	Aprovado para NSCLC avançado
VEGFR-2, EGFR	Vandetanibe	Zactima	Fase II/III
VEGFR-1-3	AZD2171	Recentin	Fase II/III
VEGFR-1-3, PDGFR, c-KIT, FLT-3	Sunitinibe	Sutent	Fase II
VEGFR-1-3, PDGFR-β, c-KIT, c-fms	Vatalanibe		Fase II
VEGFR-1-3, PDGFR, c-KIT	Axitinibe	Champix	Fase II
VEGFR-1-3, PDGFR, c-KIT	AMG 706		Fase I
<b>Inibidores das vias Ras/Raf/MEK</b>			
Ras	Tipifarnibe	Zarnestra	Fase III
Ras	Lonafarnibe	Sarasar	Fase III
Raf-1, VEGFR-2 e -3, PDGFR, c-KIT	Sorafenibe	Nexavar	Fase II
MEK	CI-1040		Fase II
MEK	PD-0325901		Fase I/II
MEK	AZD6244		Fase I
<b>Inibidores de PI3K/Akt/PTEN</b>			
PI3K	LY294002	Rapamune	Fase I
mTOR	Rapamicina		Fase I
mTOR	Temsirolimus		Fase I/II
mTOR	Everolimus		Fase I/II
mTOR	AP23573		Fase I
<b>Terapia gênica supressora de tumor</b>			
p53	p53 retrovírus	Advexin	Fase I
p53	p53 adenovírus		Fase I
FUS1	FUS1 nanopartícula		Fase I
<b>Inibidores de proteassoma</b>			
Proteassomos	Bortezomibe	Velcade	Fase II
<b>Inibidores de HDAC</b>			
HDAC	SAHA: Vorinostate	Zolinza	Fase II
HDAC	Depsipeptídeo		Fase I
<b>Inibidores de Telomerase</b>			
Telomerase	GRN163L		Fase I

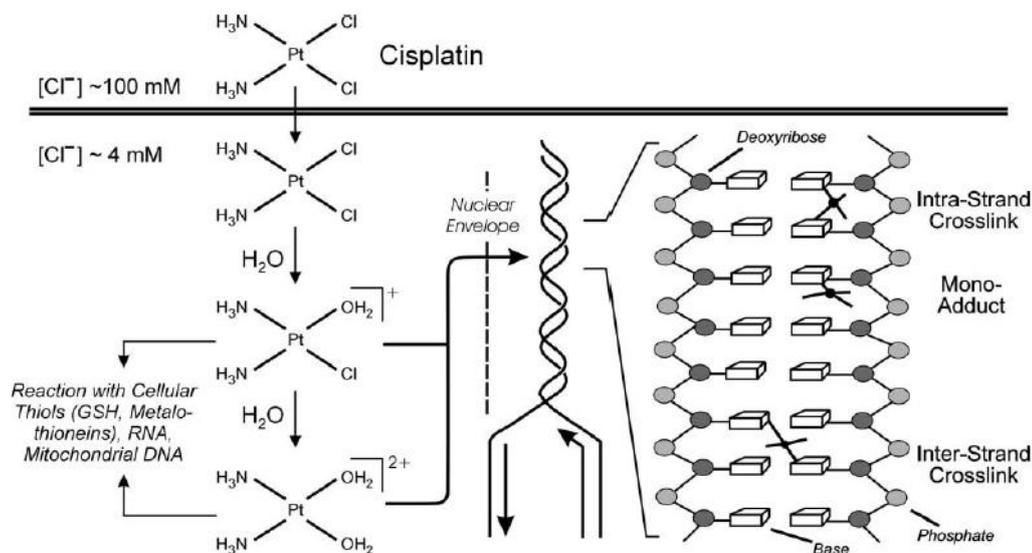
**Tabela 2:** Agentes selecionados na clínica para o tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células. Adaptado de Sun et al., 2007.

Mesmo com o grande avanço nas pesquisas dos diversos tipos de câncer, especialmente no câncer de pulmão, ainda não foram encontrados biomarcadores confiáveis, os quais pudessem direcionar o melhor tratamento e também apontar o prognóstico do paciente.

## **1.2 Cisplatina e mecanismos de resistência**

### ➤ *Reatividade da Droga e Indução de dano*

Cisplatina é um complexo inorgânico neutro e planar que reage com o DNA para induzir efeitos biológicos característicos, os quais culminam em reparo de DNA e consequente sobrevivência celular, ou ativação irreversível das cascatas apoptóticas. Entretanto, para que a interação ocorra com o DNA, a cisplatina que entra na célula sob a forma neutra tem de ser ativada através de uma série de reações espontâneas, as quais envolvem uma seqüencial troca dos ligantes *cis*-cloro com moléculas de água (Khateeb et al., 1999; Kelland, 2000). A forma monoaquosa é reconhecida como uma espécie altamente reativa; porém, após a sua formação esta pode interagir com muitos nucleófilos endógenos, como glutatona (GSH), metionina, metalotioneína e proteínas. Então, quando a cisplatina entra na célula, esta é potencialmente vulnerável para inativação citoplasmática por estes e outros componentes intracelulares (Siddik, 2003). As seqüências de reações de ativação e ação da cisplatina são mostradas na figura 2.



**Figura 2:** Visão geral da ativação e ação da cisplatina. Adaptado de; *Maria Kartalou, John Essingmann, 2001.*

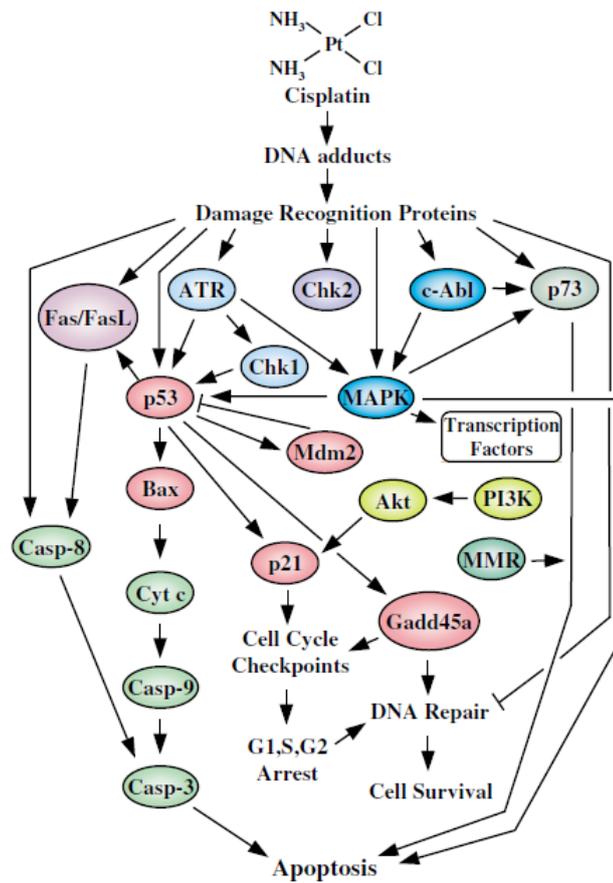
A ação citotóxica da cisplatina é descrita pela sua interação com sítios nucleofílicos N7 das purinas no DNA, formando interações proteína-DNA, ligações cruzadas inter e intrafitas e monoaddutos com o DNA (todas estas ligações formam adutos no DNA) (Eastman A. e Schulte N., 1988). Entretanto, a formação de adutos intrafitas são as principais lesões responsáveis pela ação citotóxica (Siddik, 2003). Devido a isso, a cisplatina afeta a replicação do DNA; porém, embora afete tal fenômeno celular, não existe uma correlação entre a inibição da síntese de DNA e a citotoxicidade (Sorenson e Eastman, 1988).

A indução apoptótica da cisplatina é facilitada pelo reconhecimento dos danos ao DNA por mais de 20 proteínas, as quais se ligam nas distorções físicas no DNA induzidas pelos adutos de platina intrafitas (Bellon *et al.* 1991). Estas proteínas de reconhecimento de dano incluem a hMSH2 ou hMutS $\alpha$  - que são componentes do complexo de reparo MMR (sigla em inglês para *mismatch repair*) - grupo 1 e 2 de

proteínas não-histonas de alta mobilidade (HMG1 e HMG2), dentre outras (Donahue *et al.*, 1990; Finck *et al.*, 1998; Chaney e Vaisman, 1999).

Uma das vias de dano ao DNA causado pela cisplatina culmina com a ativação dos pontos de checagem do ciclo celular, os quais temporariamente induzem uma parada transiente na fase S, acompanhado pela inibição de Cdc2-ciclina A ou B cinase para afetar a duração da parada em G2/M (Shi *et al.*, 1994; Shapiro e Harper, 1999). Uma vez que os efeitos inibitórios dos adutos de DNA induzidos por cisplatina nas CDKs da fase G1 são eventos tardios na sequência de ativação dos pontos de checagem, e comumente facilitados pelo inibidor de Cdk4, p16<sup>INK4A</sup>, a acumulação significativa de células em parada na fase G1 é infrequente, pois grande parte das células está parada na fase G2/M (Siddik, 2003).

Contudo, os eventos de parada no ciclo celular parecem ser inibitórios ao processo de citotoxicidade, uma vez que a retirada, através de fármacos específicos, dos pontos de checagem de G2/M aumenta a sensibilização celular da cisplatina (Demarcq *et al.*, 1994; O'Connor e Fan, 1996). Isto se explica pelo fato de que a parada de ciclo celular - como uma consequência do dano ao DNA - é necessária para permitir que o complexo de reparo por excisão de nucleotídeo (*NER*, sigla em inglês) remova os adutos e promova a sobrevivência celular. Somente quando o reparo é incompleto, que seria o caso quando o dano é extensivo, as células entrariam em apoptose. Por isso, os mecanismos de reparo estão intimamente ligados a ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e a indução dos fenômenos apoptóticos (Bullock e Fersht, 2001; Siddik, 2003). A figura 3 sintetiza as principais vias envolvidas nos efeitos celulares induzidos pela cisplatina.



**Figura 3:** Visão geral das vias envolvidas nos efeitos celulares induzidos pela cisplatina. Adaptado de Zahid H Siddik., (2003).

➤ *Mecanismos de Resistência à Cisplatina*

- *Maior efluxo da droga (redução da acumulação intracelular):*

Amplas evidências indicam que a acumulação reduzida da droga constitui-se um dos principais mecanismos de resistência. Reduções na ordem de 20-70% foram documentadas em diversas linhagens celulares, e isso mostrou uma resistência à cisplatina em um fator de 3-40 vezes (Siddik, 2003). No entanto, a redução na acumulação da droga não é diretamente proporcional ao nível de resistência (Johnson *et al.*, 1997). De fato, o perfil dos mecanismos de resistência de um dado tipo de linhagem tumoral pode não incluir defeitos na acumulação da droga. Por outro lado, em alguns

cânceres, a redução na acumulação da cisplatina é o principal mecanismo de resistência, contabilizando 70-90% da totalidade da resistência (Siddik, 2003).

A causa da acumulação intracelular da cisplatina nas células resistentes pode ser atribuída por uma inibição na captação da droga, por um aumento no efluxo da droga, ou por ambos. Um defeito no processo de captação parece ser o prevalente, mas o mecanismo ainda permanece de certa forma obscuro (Yoshida *et al.*, 1994). No entanto, uma alteração envolvendo o transporte ativo Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase ou nos canais iônicos não podem ser totalmente descartados (Siddik 2003).

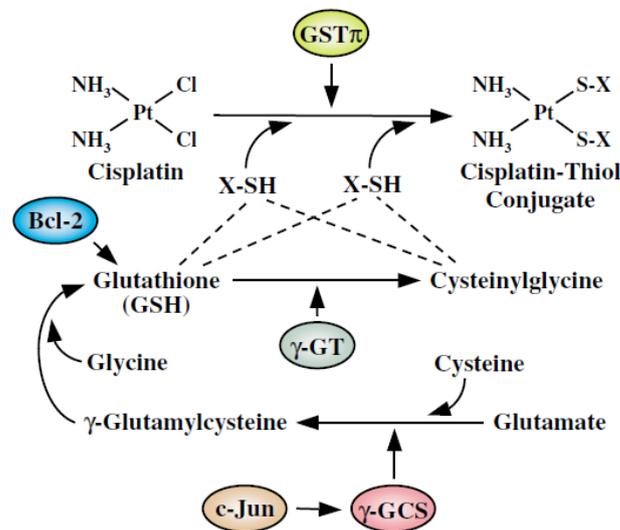
Desenvolvimento de resistência como resultado de um aumento no efluxo da cisplatina foi amplamente esquecido em estudos anteriores. Mais recentemente, houve um ressurgimento nesse sistema devido à descoberta de novas proteínas exportadoras. O gene da família de proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas (MRP), composto de pelo menos 7 membros (MRP1-7) foram os principais alvos de investigação, principalmente pelo fato de terem sido encontradas e associadas com o efluxo celular de uma grande variedade de drogas (Borst *et al.*, 2000). Contudo, somente a MRP2 (cMOAT) parece estar envolvida na resistência a cisplatina, e isso é consistente com a observação de que células resistentes têm níveis elevados deste transportador (Siddik, 2003). Ainda, um aumento de 10X na resistência foi demonstrado em células que super-expressam MRP2 (Cui *et al.*, 1999) e, além disso, a transfecção de RNA antisense contra a MRP2 aumenta a sensibilidade das células à cisplatina (Koike *et al.*, 1997). É importante notar que a proteínas MRP2 não está universalmente associada com a resistência à cisplatina. Uma segunda área de investigação importante envolvendo o efluxo de cisplatina tem focado as proteínas ATP7A e ATP7B, as quais são super-expressas em células tumorais resistentes à cisplatina. Experimentos de transfecção celular com essas proteínas demonstraram que a células transfectadas com

ATP7B adquirem uma resistência significativa para a cisplatina, principalmente com relação ao efluxo da droga (Siddik, 2003).

Por estas razões, o mecanismo de efluxo da droga está fortemente associado com a resistência a diversas linhagens tumorais, não somente a cisplatina, mas também a diversos outros fármacos utilizados na clínica.

- *Aumento da Inativação por moléculas contendo grupos tióis.*

Cisplatina pode ser inativada por inúmeros constituintes citoplasmáticos, incluindo a abundante proteína nucleofílica GSH e as metalotioneínas ricas em cisteínas. Concentrações dessas moléculas contendo tiol induzem resistência por diminuir os níveis de agente antitumoral disponível para interação com o DNA. A inativação da cisplatina pela GSH e as vias que promovem essa reação são mostradas na figura 4.



**Figura 4:** Inativação da cisplatina por GSH. X-SH = glutathiona ou cisteinilglicina. *Zahid H. Siddik 2003.*

O aumento no conteúdo de GSH foi demonstrado em vários modelos tumorais de resistência a cisplatina (Siddik, 2003), e confirmados em estudos clínicos (Wolf *et al.*, 1987). Além disso, em um painel de modelos de tumores de ovários resistentes, proeminentes elevações nos níveis de GSH foram correlacionados diretamente com a resistência. Algumas elevações podem ocorrer como resultado de um aumento de expressão do gene de  $\gamma$ -glutamilcisteíno sintetases ( $\gamma$ -GCS) (Hamaguchi *et al.*, 1993), e os produtos da tradução desse gene são enzimas passo limitante envolvidas na biossíntese de GSH.

A alta reatividade da cisplatina aquosa promove sua interação com GSH de uma maneira não-enzimática. Essa reação de conjugação, entretanto, pode ser catalisada pela GSH-S-transferase  $\pi$  (GST $\pi$ ), a qual é membro de uma família de enzimas envolvidas nas reações de detoxificação de xenobióticos (Goto *et al.*, 1999). O aumento na expressão de GST $\pi$ , junto com elevados níveis de GSH em células tumorais resistentes, sugerem que a inativação enzimática da cisplatina contribui significativamente para o fenótipo em nível clínico (Sakamoto *et al.*, 2001). De fato, baixos níveis de GST $\pi$  foram correlacionados com uma sobrevida geral de 82% em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com cisplatina, enquanto altos níveis dessa enzima foram associados com uma redução de duas vezes na sobrevida (Shiga *et al.*, 1999).

Sem dúvida, o aumento nas reações de conjugação entre GSH e cisplatina são geralmente aceitas como um fator significativo na resistência, mas outras explicações para o efeito da GSH também são alvo de interesse. Isto inclui o papel de GSH elevada aumentando o reparo do DNA, ou aumentando os efeitos inibitórios na apoptose (Siddik, 2003 ; Slater *et al.*, 1995).

- *Aumento no reparo do DNA*

Formação e persistência dos adutos de DNA formados pela cisplatina são vitais na indução da apoptose. Entretanto, um aumento na taxa de reparo dos adutos atenuaria o processo apoptótico. Isto está suportado pela demonstração de que um aumento na taxa de reparo está associada com uma inibição da citotoxicidade induzida pela droga em muitas linhagens de tumores murinos e humanos (Lai *et al.*, 1988; Siddik *et al.*, 1998). Como todos os outros mecanismos, o reparo não está universalmente presente em todas as linhagens resistentes a cisplatina (Schmidt e Chaney, 1993). Quando presente, entretanto, a contribuição do aumento no reparo para a resistência é baixo, e usualmente resulta numa resistência na ordem de 1,5-2,0 vezes. Este aumento limitado é, de qualquer forma, considerado como significativo uma vez que a inativação dos adutos é em grande parte devido ao reparo do DNA (Siddik 2003).

O sistema NER (reparo por excisão de nucleotídeo, sigla em inglês) é a principal via para a remoção do dano ao DNA. A significância desse sistema de reparo é demonstrada pelos achados que defeitos celulares nessa via resultam numa hipersensibilidade a cisplatina, e a restauração desse sistema restabelece a sensibilidade a níveis normais (Chaney e Sancar, 1996). O NER tem ampla especificidade, e não são observadas diferenças na excisão de adutos induzidos por cisplatina e outras drogas a base de platina (Chaney e Vaisman, 1999). De fato, um aumento no reparo dos adutos nas células resistentes também se aplica aos análogos de platina (Jennerwein *et al.*, 1991).

Para manter a estabilidade genômica, é vital que o reparo do DNA ocorra antes da replicação do DNA. Entretanto, a resistência advém quando as células aumentam sua capacidade de replicar o DNA passando o aduto e, então, iniciando o reparo após a replicação do DNA (Chaney e Sancar, 1996). Isto aumenta a habilidade das células

tumorais de tolerar altos níveis de DNA danificado induzido por cisplatina. A este respeito, é significativo que o desvio na replicação é aumentado de 3-6 vezes por defeitos nas proteínas hMLH1 ou hMSH6, as quais apresentam grande importância no papel do MMR na resistência a cisplatina (uma vez que as proteínas hMLH1 e hMSH6 fazem parte do sistema MMR) (Vaisman *et al.*, 1998). Entretanto, um aumento no sistema de desvio replicação também ocorre independente do MMR. É notável que o aumento da tolerância para os adutos de DNA não somente está ligada a deficiência no sistema MMR, mas também ocorre acompanhada de uma má função da proteína p53. De fato, uma disfunção na p53 exacerba a resistência à cisplatina em células tumorais deficientes em MMR (Siddik, 2003).

A resistência a estes tipos de fármacos pode surgir de diversas associações e rotas intracelulares. O que se denota notável é que uma única via dificilmente será a única responsável pela resistência e, por essa razão, o estudo de uma única rota intracelular parece ser insuficiente para se chegar a uma conclusão sobre os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais a estes fármacos.

### 1.3 Cofilina-1:

As proteínas ADF/cofilina são expressas em todas as células eucarióticas com três formas nos mamíferos: ADF, cofilina-1 (a principal forma nos tecidos não-musculares) e cofilina-2 (a principal forma no músculo). ADF e cofilina-1 têm atividades de dinâmica de actina similares que diferem quantitativamente – ADF são mais eficientes em sequestrar monômeros, e a cofilina-1 é mais eficiente na nucleação e quebra. Experimentos de silenciamento e restabelecimento de células em cultura mostram que ambas proteínas podem recuperar muitos dos comportamentos normais (cofilin node). Entretanto, knockout do gene da cofilina-1 é letal para embriões de camundongos, enquanto a deficiência da ADF causa cegueira por volta de 4 semanas (Gurniak *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2003).

Cofilina-1 é uma proteína ubiquitosa de aproximadamente 19 kDa que é capaz de ligar-se tanto a actina-G (monomérica), quanto a actina-F (filamentosa) (artigo breast cancer). A cofilina-1 é bem conhecida como uma reguladora da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina. Se a cofilina-1 promove a polimerização ou a despolimerização depende da concentração de cofilina-1 relativa a actina e a concentração relativa de outras proteínas ligantes de actina (Van Troys *et al.*, 2008). É sabido que a atividade da cofilina-1 é necessária para motilidade celular *in vitro*. Entretanto, como a cofilina-1 funciona na motilidade celular e quais partes são afetadas pela cofilina-1 nesse ciclo de motilidade é complexo e requer uma análise específica para cada tipo celular (Wang *et al.*, 2007). Além disso, como já citado anteriormente, a cofilina-1 também pode participar da morfogênese em diferentes organismos, incluindo os mamíferos, sendo necessária para a polarização e migração celular normal durante o período morfogênico (Ono, K. *et al.*, 2003).

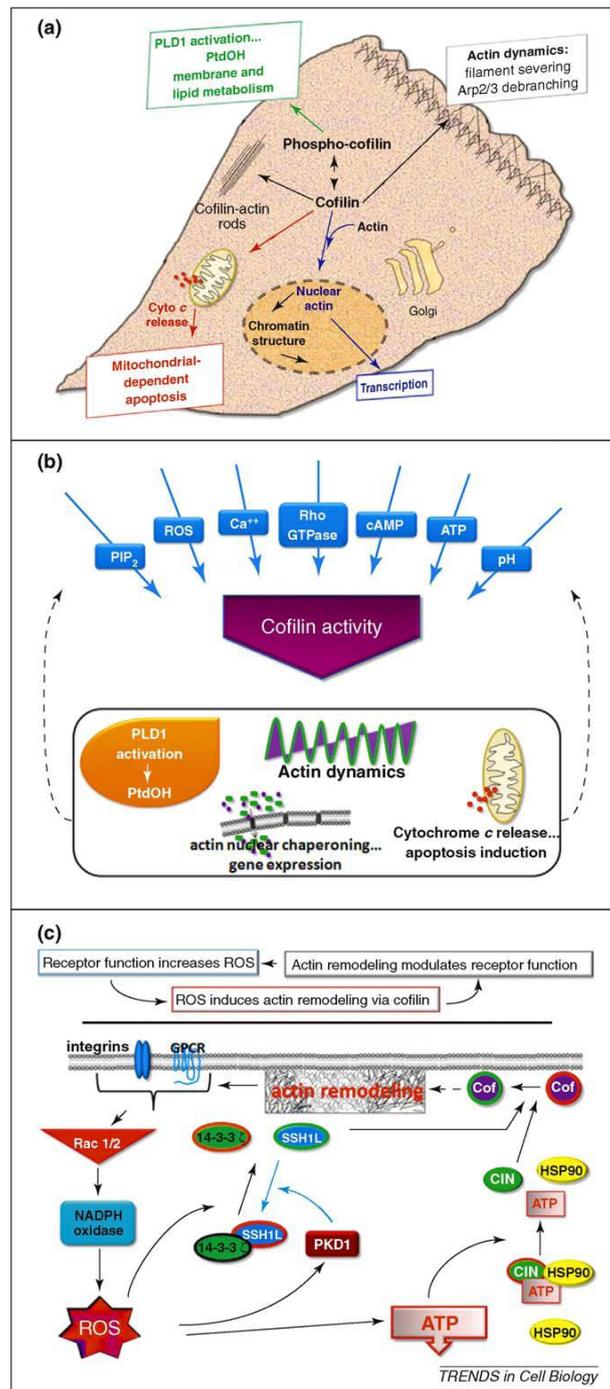
A via da cofilina-1 é composta por um grupo de cinases e fosfatases que regulam a cofilina-1 e coordenadamente iniciam a polimerização da actina e a motilidade celular em resposta a estímulos do microambiente. Alguns desses estímulos incluem *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) dentre outros. A cofilina-1, então, é regulada por 4 processos independentes. Primeiro, a fosforilação da cofilina-1 na serina 3 pela LIM cinase 1 (LMK1) e suas cinases relacionadas (LIMK2, NRK, TESK 1 e 2) regulam a cofilina por inibir a sua atividade impedindo-a de ligar-se na actina. Segundo, a defosforilação da serina 3 da cofilina por fosfatases tipos 1, 2A e 2B, *slingshot* (SSH) e cronofina fosfatases resultam na ativação das propriedades ligantes de actina da cofilina. Terceiro, a ligação da cofilina-1 a actina é inibida por ligação a fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PIP2), e a atividade da cofilina é dependente da fosfolipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) mediando a hidrólise do PIP2. E quarto, mudanças no pH na faixa fisiológica como a mediada pela proteína de troca Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pode ativar a atividade de quebra da cofilina-1 quando esta está no estado defosforilado. Além disso, ainda em níveis de regulação, LIMKs são ativadas pela fosforilação pela p21-ativadora de cinase (PAK1), PAK4 e proteínas cinases dependentes de Rho, e inibida pela defosforilação pela SSH1, então potencializando a defosforilação da cofilina (Niwa *et al.*, 2002; Meberg *et al.*, 1998; Mouneimne *et al.*, 2004).

Além das suas propriedades reguladoras de dinâmica de citoesqueleto (pelos filamentos de actina), a cofilina-1 apresenta outras funções celulares. Uma delas é a capacidade de translocar para o núcleo. Estudos anteriores mostraram que a cofilina-1 sob alguns estímulos químicos/físicos pode translocar para o núcleo. Essa translocação nuclear somente ocorre se a proteína estiver no seu estado ativado, uma vez que somente nesse estado a cofilina-1 expõe a sua sequência de sinalização nuclear. Pendleton e colaboradores mostraram em 2003 que a cofilina apresenta a função de

carrear actina para o núcleo (Matsuzaki *et al.*, 1988; Pendleton *et al.*, 2003). Pelo fato da actina ter um papel na formação de complexos heterogêneos nucleares de ribonucleoproteínas, e na expressão gênica (Pederson, 2008), considera-se que a habilidade de permitir as funções nucleares da actina seja um dos papéis celulares cruciais da cofilina-1. Por outro lado, estudos de proteômica mostraram que a cofilina-1 foi encontrada translocando para a mitocôndria após indução de apoptose por staurosporina em células de neuroblastoma (Chua *et al.*, 2003). Em neutrófilos, a oxidação da cofilina-1 e sua translocação para a mitocôndria também induziu apoptose (Klamt & Shacter, 2005; Klamt *et al.*, 2009). A translocação da cofilina-1 parece ser necessária para a abertura do poro de permeabilidade transitória da mitocôndria e subsequente liberação de citocromo *c*, uma etapa inicial da apoptose. Actina não é carregada com a cofilina-1 para a mitocôndria. Nem a translocação para a mitocôndria, nem a liberação do citocromo *c*, requerem ligação a actina, embora a apoptose seja bloqueada pela mutação dos domínios ligantes da actina (Chua *et al.*, 2003).

Pelo fato de apresentar essas diversas funções no âmbito celular, a cofilina-1 está relacionada a diversos processos celulares também nas células tumorais. Já foi demonstrado que elevados níveis de cofilina-1 estão relacionados a uma maior invasividade em diversos tipos tumorais, incluindo os cânceres de pulmão e mama (Wang *et al.*, 2007). A cofilina-1 também pode estar associada a uma possível resistência a agentes alquilantes em câncer de pulmão de não pequenas células, onde um elevado imunconteúdo da proteína está associado com um valor elevado de IC<sub>50</sub> em linhagens de câncer de pulmão de não-pequenas células (Castro *et al.*, 2010). Ainda, meta-análise usando programas de bioinformática demonstrou uma possível associação de resistência a agentes alquilantes e a proteína cofilina-1, sendo que esta foi associada

com uma possível resistência a mais de 20 drogas alquilantes (Castro *et al.*, 2010). A figura 5 resume as principais funções celulares descritas da cofilina-1.



**Figura 5:** Diversas funções celulares da cofilina-1. (a) diagrama mostrando muitas funções celulares da cofilina (cof). (b) Fatores que regulam a atividade da cofilina são elas mesmas reguladas pela cofilina e fosfo-cofilina. (c) Um exemplo de regulação homeostática de *feedback* no ciclo de estresse oxidativo. (Adaptado de Bernstein & Bamburg, 2010).

Por essas características, a cofilina-1 vem sendo objeto de estudo de alguns grupos de pesquisas e seus papéis na dinâmica celular ainda precisa ser melhor esclarecidos em alguns aspectos (como exemplo podemos citar a resistência a agentes alquilantes em câncer de pulmão de não pequenas células).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

Visto a relevância do estudo desta doença e a possível correlação entre prognóstico e a proteína cofilina-1, este trabalho foi elaborado com o objetivo de validar e reforçar um possível papel da proteína cofilina-1 na resistência a agentes alquilantes em linhagens de NSCLC.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a citotoxicidade (valores de  $IC_{50}$ ) do agente alquilante cisplatina na linhagem humana de câncer de pulmão de não-pequenas células A549;
- b) Aplicar o protocolo de resistência intrínseca no intuito de selecionar linhagens resistentes à cisplatina, fazendo uma correlação com o aumento de imunoconteúdo de cofilina quando comparada ao controle;
- c) Super-expressar o gene da cofilina-1 (*CFL-1*), verificando a relação do aumento de  $IC_{50}$  da cisplatina nas células A549 transfectadas com plasmídeo contendo a sequência codante da cofilina-1 em relação ao seu controle (Mock – plasmídeo sem a sequência codante da cofilina-1).

## **Parte II**

<b>Manuscript #</b>	CCR-10-3316
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2010-12-15 07:39:42
<b>Current Stage</b>	Initial QC
<b>Title</b>	Exploring the Role of Cofilin-1 Protein on Alkylating drugs Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer
<b>Running Title</b>	cofilin-1 in alkylating drug resistance
<b>Manuscript Type</b>	Perspectives
<b>Special Section</b>	N/A
<b>Category</b>	Experimental Therapeutics
<b>Corresponding Author</b>	Dr. Fábio klamt (Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS)
<b>Contributing Authors</b>	Mr. Matheus B Freitas , Mr. Marco A De Bastiani , Mr. Leonardo L Motta , Mr. José E Vargas , Mr. Matheus A Pasquali , Ms. Fernanda Lopes , Dr. Melissa M Markoski , Dr. José Cláudio F Moreira
<b>Abstract</b>	<p><b>Purpose:</b>Despite progress in molecular research, current treatments offer limited benefits and non-small cell lung cancer (NSCLC) is still the major determinant of overall cancer mortality worldwide. Cofilin-1 levels in NSCLC biopsies have proven to be an accurate predictor of prognosis and response to alkylating drug treatment. Herein we explored the role of cofilin-1 protein in cisplatin resistance of NSCLC.</p> <p><b>Experimental Design:</b>Review of current literature on the topic in combination with two different experimental strategies: i) evaluation of cofilin-1 immunoccontent in intrinsic cisplatin resistant derived from A549 NSCLC cell line; and ii) a molecular biology approach by the determination of cisplatin toxicity in A549 cells transfected with a plasmid containing CFL1 cDNA or mock.</p> <p><b>Results:</b>Intrinsically resistant A549 cells, selected by challenging parietal A549 cells with 10X drug GI50 value, presented an increased cofilin-1 immunoccontent. Moreover, cells transfected with cofilin-1 became significantly more resistant to cisplatin (P &lt; 0.01).</p> <p><b>Conclusions:</b>This study added more in vitro data that support new treatment initiatives based on cofilin-1 levels to guide chemotherapeutic interventions in NSCLC patients.</p>
<b>User-Defined Keywords</b>	non-small cell lung cancer, cofilin-1, alkylating drug resistance
<b>Keywords</b>	___Lung cancer, ___Biomarkers and intervention studies

**Article type: Perspective**

**Exploring the Role of Cofilin-1 Protein on Alkylating Drugs Resistance in  
Non-Small Cell Lung Cancer**

**Running title:** cofilin-1 in alkylating drug resistance

Matheus Becker,<sup>1,2</sup> Marco A. De Bastiani,<sup>1,2</sup> Leonardo L. Motta,<sup>1,2</sup> José E. Vargas,<sup>3</sup>  
Matheus A. Pasquali,<sup>1</sup> Fernanda M. Lopes,<sup>1,2</sup> Melissa M. Markoski,<sup>4</sup> José C. F.  
Moreira,<sup>1</sup> and Fábio Klamt<sup>1,2</sup>

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Center of Oxidative Stress Research, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil; <sup>2</sup>National Institutes for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre/RS, Brazil; <sup>3</sup>Department of Biophysics, IB/UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil, <sup>4</sup>Molecular and Cellular Cardiology Laboratory, IC/FUC, Porto Alegre/RS, Brazil.

**Grant support:** 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).

**Request for reprints:** 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](mailto:00025267@ufrgs.br)

## **Abstract**

**Purpose:** Despite progress in molecular research, current treatments offer limited benefits and non-small cell lung cancer (NSCLC) is still the major determinant of overall cancer mortality worldwide. Cofilin-1 levels in NSCLC biopsies have proven to be an accurate predictor of prognosis and response to alkylating drug treatment. Herein, we explored the role of the cofilin-1 protein in cisplatin resistance of NSCLC.

**Experimental Design:** Review of current literature on the topic in combination with two different experimental strategies: *i*) evaluation of cofilin-1 immunocontent in intrinsic cisplatin resistant cells derived from A549 NSCLC cell line; and *ii*) a molecular biological approach for the determination of cisplatin toxicity in A549 cells transfected with a plasmid containing *CFLI* cDNA or mock.

**Results:** Intrinsically resistant A549 cells, selected by challenging parental A549 cells with 10X drug GI50 value, presented an increase in the immunocontent of cofilin-1. Moreover, cells transfected with cofilin-1 became significantly more resistant to cisplatin ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions:** This study added more *in vitro* data to support new treatment initiatives based on cofilin-1 levels to guide chemotherapeutic interventions in NSCLC patients.

## **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed.

## **Introduction**

Lung cancer is the most frequently diagnosed cancer and the most common source of cancer mortality worldwide, being responsible for almost 1.3 million deaths a year. Nearly 85% of lung cancer cases are non-small cell lung cancer (NSCLC) (1). Long-term survival results most likely when NSCLC is diagnosed early, but this is extremely rare, due to inaccurate diagnostic methods (2) and its capacity to generate early metastasis within the lungs and then to distant organs (3). Currently, prognosis of NSCLC patients is done by analyzing patient performance status and tumor staging. However, accumulating data has shown that these are unsatisfactory for predicting patient outcome or in guiding physicians on the best course of action for each patient. Although significant advances have been achieved in conventional therapies, mainly based on surgical resections and chemotherapeutic combinations with alkylating agents (*e.g.* cisplatin), poor prognosis and short survival time of patients are factors demanding novel and more effective therapy (4). The use of biomarkers could be a great advance in the treatment of cancer due to its critical role in early diagnosis, guiding therapy treatment, and monitoring the prognosis of cancers. However, the currently available lung cancer biomarkers are not sensitive or specific enough to be used clinically in diagnosis, patient stratification, prognosis or drug response (5). When it comes to NSCLC, an impressive number of markers are related in the prognosis of this disease and could have important applications such as prediction and planning of the treatment; however, poor individual performance precludes their inclusion in the clinical practice (5). Thus, further investigation, newer assays and the development of an appropriate panel of molecular markers are still required (6).

## **Cofilin-1 protein**

The reorganization of actin at the leading edge of eukaryotic cells is a fundamental aspect of cell motility, and requires the coordinated function of both actin-polymerizing and actin-depolymerizing/severing factors. Cofilin (*CFL1* gene product; cofilin-1, non-muscle isoform; Gene ID: 1072) is one of the major proteins responsible for cell migration processes, by playing a key role in actin filaments dynamics (7) (Figure 1). This protein is found on regions containing high actin dynamic activity and is essential in diverse cellular phenomena such as cytokinesis (8). Cofilin-1 performs a crucial role on actin cytoskeletal adaptation and localized cellular functions (9). Bernstein and Bamburg (10) suggest that cofilin-1 plays a major role in cell biology, and that any interference with its normal activity is likely to have severe repercussions (Figure 1). Under EGF (Endothelial Growth Factor) stimulation, cancer cells use cofilin-1 to locally restructure the actin cytoskeleton network, leading to cell migration and invasion (11). Cofilin-1 is overexpressed in the highly invasive C6 rat glioblastoma cell line, A549 human lung cancer cells and human pancreatic cancer cells (12-13). The spontaneous overexpression of cofilin can also be detected in invasive sub-populations of breast tumor cells in rats, as well as in biopsies of oral, renal and ovarian carcinomas (14). Cofilin-1 also plays a role in vesicular trafficking and apoptosis of cancer cells induced by oxidants (15, 16).

## **Cofilin-1 protein and alkylating drug resistance**

Based on the abovementioned biological information, in a recent study we explored the hypothesis that the amount of cofilin-1 in NSCLC could provide relevant information about the aggressiveness of a tumor and therefore be used as a prognostic marker. Based

on immunohistochemistry, hazard ratio, and a receive or operating characteristic curve, we found that *CFLI* levels in NSCLC biopsies can discriminate between good and bad prognosis, where high *CFLI* levels are correlated with lower overall survival rate (17). To increase the robustness of these findings, six human cell lines of the 3 major histological types of NSCLC, namely adenocarcinoma cells (H-23, A549, EK VX), squamous cells carcinomas (H-226), and large cells carcinomas (H-460, HOP-92), were evaluated for cellular invasiveness (determined by Matrigel Invasion Chamber System) and resistance against a list of 118 standard chemotherapy agents (from the NCI-60 drug discovery pipeline) (17). In addition to this higher potential for invasive behavior, this experimental approach revealed that high levels of *CFLI* mRNA and protein content are also correlated with resistance against different anticancer drugs—mainly alkylating agents (22 clinically relevant alkylating drugs, like cisplatin, carboplatin, iproplatin, and others). These finding are extremely relevant because this class of drugs is among the most effective cytotoxic agents for the treatment of advanced cancer and has long been the cornerstone of NSCLC management. To explore the role of cofilin-1 protein on the resistance to alkylating drugs in non-small cell lung cancer, we performed two distinct experimental approaches: *i*) evaluation of cofilin-1 immunocontent in intrinsic cisplatin resistant cells derived from A549 NSCLC cell line; and *ii*) a molecular biological approach by the determination of cisplatin toxicity in A549 cells transfected with a plasmid containing *CFLI* cDNA or mock (Figure 2). The selection of intrinsically resistant A549 cells was performed by treating them with 10X of determined GI50 (drug concentration that inhibit 50% of cell growth) of cisplatin for 24 hours, resulting in an increase of the immunocontent of cofilin in these cells (Figure 2A, right panel). To confirm that the remaining cells represented a cisplatin resistant sub-population of A549, approximately 2 weeks after the treatment, the cells were harvested

and the GI50 for cisplatin was determined (Figures 2A, left and middle panels). Our data shows that these intrinsically resistant cells presented a 6-fold increase in drug GI50, confirming the acquisition of a resistant phenotype. In addition, we applied molecular biological techniques in an attempt to attempt to corroborate the association between cofilin and cisplatin resistance. A549 cells were transfected using Lipofectamine® (Invitrogen) with a plasmid containing the codant sequence of cofilin-1 (pCMV-XL5) and Mock (plasmid without cofilin codant sequence). Dot blot analysis shows an increase in cofilin-1 immunocontent after 48 hours of transfection. Transfection with Mock did not change the cofilin immuncontent when compared with the control (untransfected cells). In addition, A549 cells were transfected with pCMV-XL5 and Mock for 48 hours and then were treated with cisplatin for 24 hours to determine the GI50 value of the drug. The GI50 value for A549 transfected with pCMV-XL5 was significantly higher than A549 transfected with Mock and these results corroborate our hypothesis (all these data is shown in Figure 2B). In any case, it is known that cofilin-1 has a nuclear localization signal (NLS) and can, in specific conditions (e.g., chemical and physical stress), translocate into the nucleus accompanied by actin monomers. However, the role of this protein on the nucleus is still unclear (18, 23). Taking into account these data, we suggest that cofilin-1 has a still unknown role in alkylating drug resistance in NSCLC that should be further explored. Our data also support the use of cofilin-1 protein as a new predictive biomarker in non-small cell lung cancer, being able to influence decisions in the management of a patient with this disease where a patient with high cofilin immunocontent may not respond adequately to a chemotherapeutic treatment based on alkylating agents.

## **Concluding Remarks**

Unfortunately, intrinsic or acquired resistance to alkylating agents is frequently encountered and severely limits its therapeutic potential (24-31). Our findings have clear implications on NSCLC management and therapy, as cofilin-1 levels can be used to predict patient response to chemotherapeutic interventions and indicate which patients should receive a more aggressive therapy in an attempt to reverse a poor prognosis. Our findings may have great impact on survival rates, for currently there is no way to predict and identify potential responders. The refinement of patient stratification with the use of cofilin-1 protein levels are currently available and await evaluation in well-designed clinical trials.

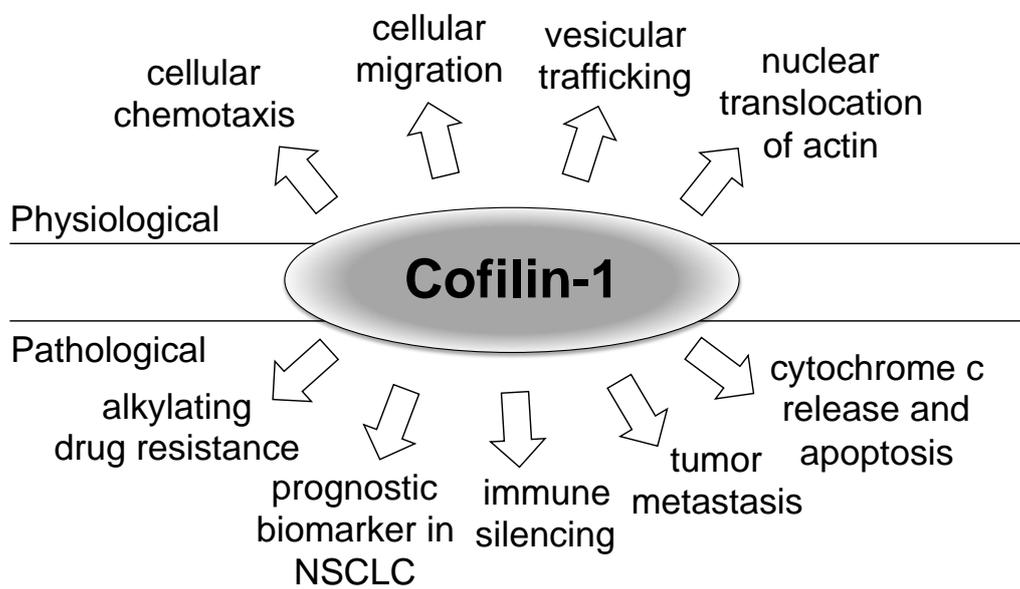
## **Translational Relevance**

Cofilin-1 levels in NSCLC biopsies have proven to be an accurate predictor of prognosis and response to alkylating drug treatment. This study added more *in vitro* data that support new treatment initiatives based on cofilin-1 levels to guide chemotherapeutic interventions in NSCLC patients.

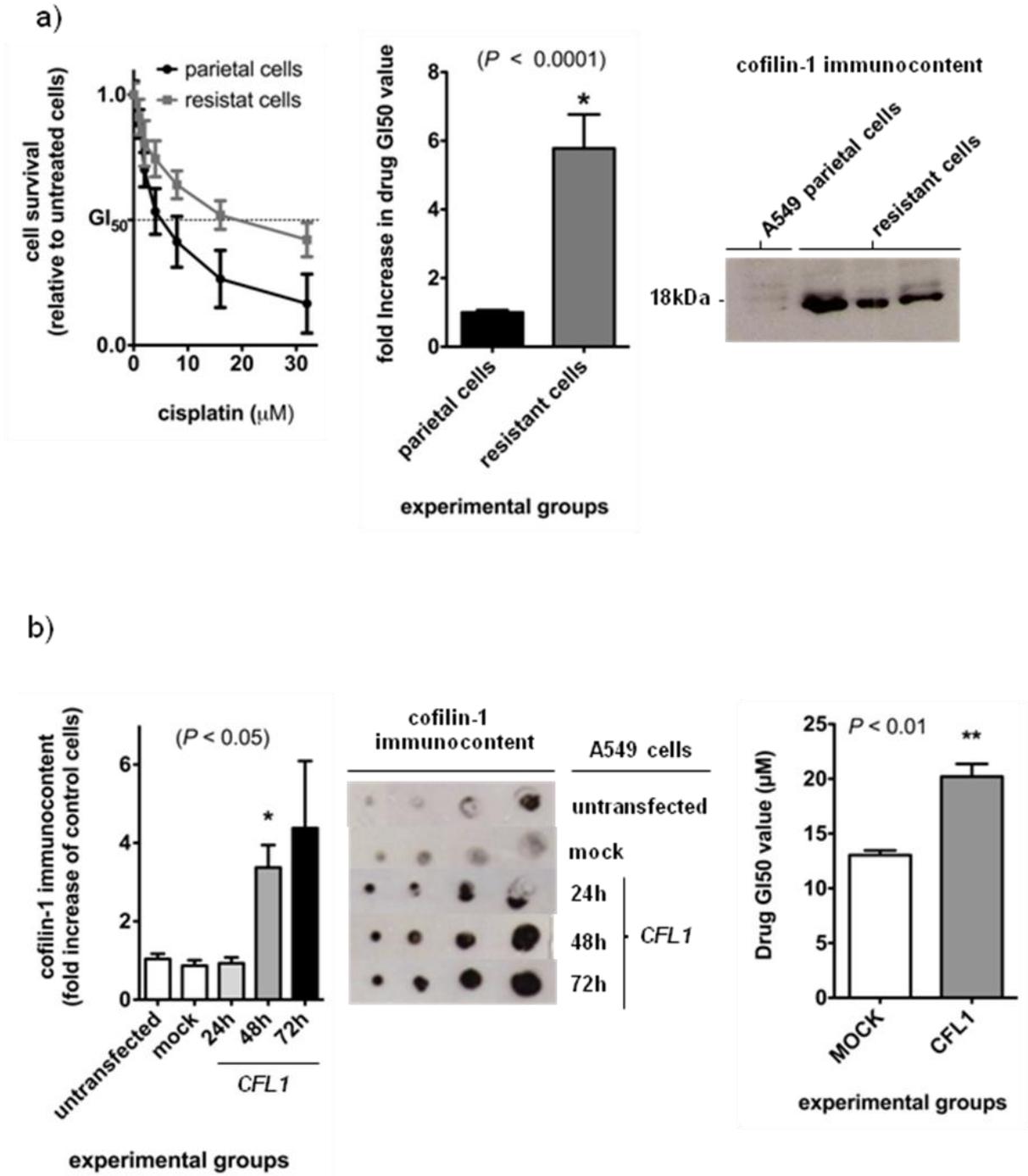
## **Figures Legends**

**Fig. 1.** Diverse (known and suggested) biological functions of Cofilin-1 protein. Diagram showing several of the physiological (top) and pathological (bottom) functions of cofilin within the cell that are described in more detail throughout the text.

**Fig. 2.** Increased cofilin-1 immunocontent is found in intrinsically resistant A549 NSCLC cells to cisplatin and *CFLI* overexpression leads to an increase in drug GI<sub>50</sub>. A GI<sub>50</sub> value of parental and resistant A549 cells, fold increase of these cells and western blot analyses showing the increases in immunocontent of the intrinsically resistant cells. For cisplatin treatment A549 cells were exponentially growing A549 and cultured on RPMI-1640 medium, at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub>. Cisplatin drug GI<sub>50</sub> values were determined after 72 hours of treatment (following NCI-60 protocol) by the Sulforhodamine B (SRB) assay and analyzed using Prism GraphPad® software. For the Western Blot, 25 µg of protein were put through electrophoreses and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Then, 1:2000 of rabbit cofilin polyclonal antibody (Abcam®) was used, followed by 1:8000 of anti rabbit secondary antibody (Pierce®). *B* Transfection of A549 cells showing the increase in immunocontent of the transfected cells with the plasmid containing the codant sequence of cofilin; the GI<sub>50</sub> value of these cells transfected with cofilin plasmid; Mock showing the increased resistance in cells that have more immunocontent of cofilin. Cofilin overexpression was done in A549 NSCLC cells using 0.2 µg of cofilin plasmid (pCMV-XL5) and empty (Mock) plasmid were used in a 96 well plate, with Lipofectamine2000 (1:2 w/w). Dot Blot analysis using 1, 2, 4 and 8 µl of samples was performed to evaluate cofilin-1 overexpression in transfected cells. Data represent mean ± S.D., of at least three independent experiment (n = 3) Student *t* test were performed or one-way ANOVA, with significance of ( $P < 0,05$ ).



**Figure 1**



**Figure 2**

## References

1. Ramalingam S, Belani C. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist*. 2008; 13 Suppl 1:5-13.
2. Sun S, Schiller JH, Spinola M, Minna JD. New molecularly targeted therapies for lung cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117(10):2740-50.
3. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest* 2009; 136: 260-71.
4. Johnson DH. Targeted therapies in combination with chemotherapy in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(14 Pt 2):4451s-4457s.
5. Toschi L, Cappuzzo F. Impact of biomarkers on non-small cell lung cancer treatment. *Target Oncol*. 2010; 5(1):5-17
- Olaussen KA, Dunant A, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006; 355(10):983-91.
6. Geiger S, Schlemmer M, Heinemann V, Stemmler HJ. Adjuvant cisplatin based chemotherapy for resected NSCLC: one size fits all? *Anticancer Drugs*; 21(9):799-804.
7. Maciver SK, Hussey PJ. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol*. 2002;3(5):reviews3007.1-3007.12
8. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerkhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol*. 2008; 87(8- 9):649-67.
9. Kreis, T., Vale, R. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. 2° ed.: Oxford University Press, 1999.
10. Bernstein BW, Bamberg JR. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol*. 2010; 20(4):187-95.

11. Wang W, Eddy R, Condeelis The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *J.Nat Rev Cancer*. 2007 (6):429-40.
12. Van Rheenen J, Song X, van Roosmalen W, Cammer M, Chen X, Desmarais V, Yip SC, Backer JM, Eddy RJ, Condeelis JS. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J Cell Biol* 2007; 179: 1247-59.
13. Gunnensen JM, Spirkoska V, Smith PE, *et al.* Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression. *Glia* 2000; 32: 146.–154.
14. Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J *et al.* Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 34: 53-8
15. Zdanov S, Klamt F, Shacter E. Importance of cofilin oxidation for oxidant induced apoptosis. *Cell Cycle*. 2010; 9(9):1675-7.
16. Klamt F, Zdanov S, *et al.* Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(10):1241-6.
17. Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, *et al.* CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2010; 116(15):3645-55.
18. Kwak IH, Kim HS, Choi OR, Ryu MS, Lim IK. Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res*. 2004; 64(2):572-80.
19. Pendleton A, Pope B, Weeds A, Koffer A.J Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *Biol Chem*. 2003; 278(16):14394-400.
20. Matsuzaki F, Matsumoto S, Yahara I, Yonezawa N, Nishida E, Sakai H. Cloning and characterization of porcine brain cofilin cDNA. Cofilin contains the nuclear transport signal sequence. *J Biol Chem*. 1988; 263(23):11564-8.

21. Ohta Y, Nishida E, Sakai H, Miyamoto E. Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin. *J Biol Chem.* 1989; 264(27):16143-8.
22. Nishida E, Iida K, Yonezawa N, et al. Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(15):5262-6.
23. Nebl G, Meuer SC, Samstag Y. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem.* 1996; 271(42):26276-80.
24. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J; Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350(4):351-60.
25. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem.* 2003; 10(3):257-66.
26. Aggarwal SK. J. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *Histochem Cytochem.* 1993; 41(7):1053-73.
27. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003 Oct 20; 22(47):7265-79.
28. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research.* 2001; 478(1-2):1-21.
29. Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A, Lippard SJ. Repair of cisplatin- DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry.* 1996; 35(31):10004-13.
30. Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H. Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 66(6):1103-11

31. Rosell R, Lord RV, Taron M, Reguart N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 38(3):217-27.

### **Parte III**

### 3. Discussão

Câncer de pulmão é um dos cânceres com a maior letalidade entre todos os tipos e o segundo mais incidente. Este tipo de tumor está dividido em dois principais tipos: câncer de pulmão de pequenas células e câncer de pulmão de não-pequenas células. O de não-pequenas células é responsável por cerca de 85% dos casos de câncer de pulmão. A detecção precoce e o estadiamento desse tipo de tumor são de suma importância na escolha do tratamento a ser desenvolvido. Muitos esforços são empregados no intuito de melhorar significativamente a vida de indivíduos que apresentam essa enfermidade. O tratamento de escolha – sendo considerado o *padrão ouro* – para este tipo de câncer são os agentes quimioterápicos da classe dos agentes alquilantes (Jamnik, 2008). No entanto, muito pouca eficácia obtém-se com este tipo de tratamento, sendo que em alguns casos a sobrevivência do paciente não chega a 5% (Jamnik, 2008). Por esse motivo, denota-se de suma importância a existência de biomarcadores considerados confiáveis, os quais possam orientar os profissionais da saúde na melhor escolha para o tratamento a ser desenvolvido em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células. Por isso, a associação entre as pesquisas científicas na área básica e sua aplicabilidade na clínica se denota extremamente importante. Nesse contexto, a proteína cofilina-1 assume um papel no qual é uma candidata forte como um possível biomarcador para câncer de pulmão de não-pequenas células, sendo que trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram não somente um mau prognóstico associado a elevados imunocópios dessa proteína (Castro *et al.*, 2010; Müller *et al.*, submetido), mas também uma possível associação entre a cofilina-1 e a resistência a agentes alquilantes. Dados de imunohistoquímica semi-quantitativa demonstraram que elevados níveis de cofilina são preditivos de um mau prognóstico para o paciente (Muller *et al.*, submetido). Ainda, essas marcações imunohistoquímicas demonstraram que diferentes

biópsias demonstraram compartimentalizações celulares diferentes (ver figura 5, anexo) onde algumas apresentaram forte marcação citósolica, enquanto outras demonstraram forte marcação nuclear. Como o local de ação dos agentes alquilantes é o DNA, fica a questão se a compartimentalização celular também tem alguma relação com o desfecho e, além disso, se existe alguma relação com o tratamento quimioterápico utilizado nesses pacientes. Por toda essa possível associação e no intuito de corroborar ainda mais a associação da cofilina com a resistência a agentes alquilantes, efetuamos duas abordagens, uma na qual se aplicou um protocolo de resistência intrínseca, e outra utilizando experimentos de biologia molecular. Os resultados obtidos na seleção intrínseca mostraram que há uma forte possibilidade de que aumentando a resistência à cisplatina há também um aumento no imunoconteúdo de cofilina. No entanto, mais análises são necessárias para corroborar essa hipótese. Por outro lado, os resultados obtidos com a biologia molecular mostraram uma forte associação entre a cofilina-1 e a resistência à cisplatina, uma vez que células A549 que super-expressaram essa proteína obtiveram um aumento no valor do  $IC_{50}$  para a cisplatina quando comparada ao seu controle (Mock). Com isso, fica elucidado que aumentando o imunoconteúdo de cofilina-1 também aumenta a resistência ao agente alquilante cisplatina. Esses achados mostram a associação entre essa proteína e a resistência a agentes alquilantes. Visando elucidar a eficiência da transfecção, utilizou-se plasmídeo de tamanho semelhante ao plasmídeo da cofilina-1, contendo GFP, para que os resultados encontrados não fossem por um evento ao acaso, mas sim por ter a maior parte das células super-expressando esta proteína e, também, foram testados diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas, sendo que o tempo de 48 horas apresentou um “platô” do sinal verde fluorescente, corroborando com o tempo onde começa a super-expressão da proteína cofilina-1. Ainda, os

resultados demonstraram uma eficiência de transfecção em torno de 60%, sendo esta considerada eficaz para demonstrar a validade dos achados (ver anexo, figuras 1, 2).

A proteína cofilina-1 é considerada uma proteína reguladora dos filamentos de actina, sendo de suma importância em eventos que exijam remodelamento de citoesqueleto em diversos fenômenos celulares. No entanto, sua importância na biologia celular vai muito além desse seu mecanismo regulatório. Dados da literatura demonstraram que esta proteína, quando na forma ativa, não somente apresenta um sinal de localização nuclear, como também é a responsável por carrear actina monomérica para o núcleo em situações que envolvam estresses físicos/químicos. No entanto, seu papel dentro do núcleo ainda não foi elucidado. Além disso, a cofilina-1 também está associada com eventos apoptóticos, uma vez que a oxidação desta proteína acarreta sua translocação para a mitocôndria causando a liberação de citocromo *c* e desencadeando, então, as cascatas de sinalização da apoptose (Klamt *et al.*, 2009). Em virtude desses fatos, a proteína cofilina-1 desempenha outros papéis na biologia celular, e um destes poderia ser o de conferir resistência a agentes alquilantes em câncer de pulmão de não-pequenas células, já que esta proteína adentra ao núcleo e o local de ação dos agentes alquilantes é exatamente o DNA. Por estas razões a cofilina-1 surge como um potencial biomarcador para câncer de pulmão de não-pequenas células, não somente direcionando o tipo de tratamento, mas também o prognóstico do paciente. Mais estudos na área são necessários no intuito de aplicar a cofilina como um biomarcador, mas os achados até o presente momento demonstram que essa proteína é uma forte candidata para ser um biomarcador neste tipo de tumor.

#### **4. Conclusão**

O câncer de pulmão é um dos tumores mais letais, com uma das maiores incidências no mundo todo. Por ser uma patologia de difícil diagnóstico precoce, muitas vezes os pacientes adentram em estágios muito avançados, onde a cura, ou simplesmente uma melhora na qualidade de vida, se torna muito complicada e difícil. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento dessa enfermidade, os agentes alquilantes, ainda apresentam uma eficácia muito limitado no sentido de melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência do paciente. Isso se deve, em grande parte, pelo fato dos tumores muitas vezes adquirirem resistência à essas drogas, fazendo com o que o tratamento acabe perdendo ainda mais a sua eficácia. Por essa razão, se denota de suma importância a existência de alvos moleculares e biomarcadores que possam predizer o prognóstico e o melhor tratamento a ser desenvolvido nesses pacientes. Nesse contexto, a proteína cofilina-1 surge como uma forte candidata a ser um possível biomarcador para câncer de pulmão de não-pequenas células não somente indicando o prognóstico do paciente, como também direcionando ao melhor tratamento quimioterápico a ser desenvolvido. Esta proteína fora associada em trabalhos prévios do nosso grupo com resistência a diversos agentes alquilantes através de meta-análise utilizando ferramentas de bioinformática. Ainda, elevados imunconteúdos de cofilina-1 foram também, nesse trabalho prévio, associados com maiores valores de  $IC_{50}$  em seis diferentes linhagens de câncer de pulmão de não-pequenas células. No intuito de corroborar esses dados, o trabalho apresentado aqui reforça essa associação entre cofilina e resistência. Nossos achados mostraram que um aumento na resistência possivelmente apresenta também um aumento no imunconteúdo de cofilina-1. Por outro lado, nossos resultados demonstraram que um aumento no imunconteúdo dessa proteína aponta uma maior resistência em células A549 transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência

codante da cofilina-1. Portanto, nossos resultados corroboraram a hipótese de que altos níveis da cofilina-1 estão associados com um aumento da resistência a agentes alquilantes em uma linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células. Mais estudos são necessários para reforçar ainda mais essa hipótese, mas a aplicabilidade dessa proteína como um possível biomarcador parece estar próxima de se tornar algo real, com amplo espectro para a clínica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albain K.S., Crowley J.J., LeBlanc M. Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: The Southwest Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991;9:1618-1626.

Arriagada R., Bergman B., Dunant A. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:351-360.

Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*. 1991 30:8026-35.

Bernstein BW, Bamburg JR. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol*. 2010; 20:187-95.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:1295-302.

Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*. 2001 1:68-76.

Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, Soares M, Müller CB, Lopes FM, Zanotto-Filho A, da Cruz Fernandes M, Moreira JC, Shacter E, Klamt F. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2010; 116:3645-55.

Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:1346-60.

Chaney SG, Vaisman A. Specificity of platinum-DNA adduct repair. *J Inorg Biochem.* 1999; 77:71-81.

Chua BT, Volbracht C, Tan KO, Li R, Yu VC, Li P. Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat Cell Biol.* 2003; 5:1083-9.

Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* 1999; 55:929-37.

Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman A. The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell Growth Differ.* 1994; 5:983-93.

Dillman R.O., Seagren S.L., Propert K.J. A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1990;323:940–945.

Donahue BA, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney JH, Lippard SJ, Essigmann JM. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry.* 1990; 29:5872-80.

Eastman A, Barry MA. Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry.* 1987; 26:3303-7.

el-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton AM. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J Inorg Biochem.* 1999; 77:13-21.

Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res.* 1998; 4:1-6

Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res.* 1999; 31:549-58.

Gurniak CB, Perlas E, Witke W. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol.* 2005 ; 278:231-41.

Hamaguchi K, Godwin AK, Yakushiji M, O'Dwyer PJ, Ozols RF, Hamilton TC. Cross-resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53:5225-32.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100:57-70.

Ikeda S, Cunningham LA, Boggess D, Hawes N, Hobson CD, Sundberg JP, Naggert JK, Smith RS, Nishina PM. Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Hum Mol Genet.* 2003; 12:1029-37.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em: 21 de Janeiro de 2011.

Jamnik, S., I. L. Santoro. "Estudo Comparativo de Fatores Prognósticos em Portadores de Carcinoma Não-Pequenas Células de Pulmão: Sobrevida Superior a Cinco Anos e Inferior a Um Ano." *Revista Brasileira de Cancerologia* 2008; 55:5-10.

Jennerwein MM, Eastman A, Khokhar AR The role of DNA repair in resistance of L1210 cells to isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum complexes and ultraviolet irradiation. *Mutat Res.* 1991; 254:89-96.

Johnson SW, Laub PB, Beesley JS, Ozols RF, Hamilton TC. Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57:850-6.

Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs.* 2000; 59 Suppl 4:1-8; discussion 37-8.

Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, Yu LR, Veenstra TD, Shacter E. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol.* 2009; 11:1241-6.

Koike K, Kawabe T, Tanaka T, Toh S, Uchiumi T, Wada M, Akiyama S, Ono M, Kuwano MA. Canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.* 1997; 57:5475-9.

Lai GM, Ozols RF, Smyth JF, Young RC, Hamilton TC. Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37:4597-600.

Matsuzaki F, Matsumoto S, Yahara I, Yonezawa N, Nishida E, Sakai H. Cloning and characterization of porcine brain cofilin cDNA. Cofilin contains the nuclear transport signal sequence. *J Biol Chem.* 1988; 263:11564-8.

Meberg PJ, Ono S, Minamide LS, Takahashi M, Bamburg JR. Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1998; 39:172-90.

Mouneimne G, Soon L, DesMarais V, Sidani M, Song X, Yip SC, Ghosh M, Eddy R, Backer JM, Condeelis J. Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol.* 2004; 166:697-708.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997; 111:1710-7.

Niwa R, Nagata-Ohashi K, Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell.* 2002; 108:233-46.

O'Connor PM, Fan S. DNA damage checkpoints: implications for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res.* 1996; 2:165-73.

Ono K, Parast M, Alberico C, Benian GM, Ono S. Specific requirement for two ADF/cofilin isoforms in distinct actin-dependent processes in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* 2003; 116:2073-85

Pederson T. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J Cell Biol.* 2008; 180:1061-4.

Pendleton A, Pope B, Weeds A, Koffer A. Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem.* 2003; 278:14394-400.

Ramalingam S, Belani C. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist.* 2008; 13 Suppl 1:5-13.

Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, Goto T, Sakamoto H, Miyake K, Koyamatsu Y, Akiya T, Iwabuchi H, Muroya T, Ochiai K, Tanaka T, Kikuchi Y, Tenjin Y. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell.* 2001; 14:305-15.

Schmidt W, Chaney SG. Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53:799-805.

Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest.* 1999; 104:1645-53.

Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science.* 1994; 263:1143-5.

Shiga H, Heath EI, Rasmussen AA, Trock B, Johnston PG, Forastiere AA, Langmacher M, Baylor A, Lee M, Cullen KJ. Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:4097-104.

Siddik ZH, Mims B, Lozano G, Thai G. Independent pathways of p53 induction by cisplatin and X-rays in a cisplatin-resistant ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* 1998; 58:698-703.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22:7265-79.

Slater AF, Nobel CS, Maellaro E, Bustamante J, Kimland M, Orrenius S. Nitron spin traps and a nitroxide antioxidant inhibit a common pathway of thymocyte apoptosis. *Biochem J*. 1995; 306:771-8.

Sorenson CM, Eastman A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 1988; 48:6703-7.

Sun S, Schiller JH, Spinola M, Minna JD. New molecularly targeted therapies for lung cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117:2740-50.

Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res*. 1998; 58:3579-85.

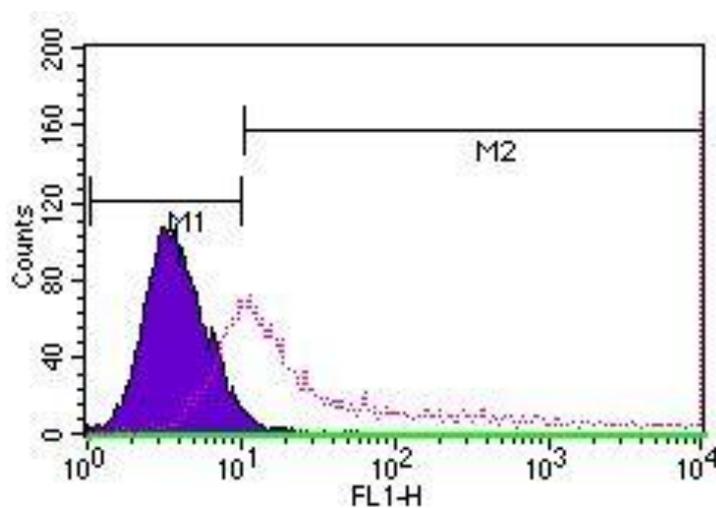
Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerkhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol*. 2008; 87:649-67.

Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:429-40.

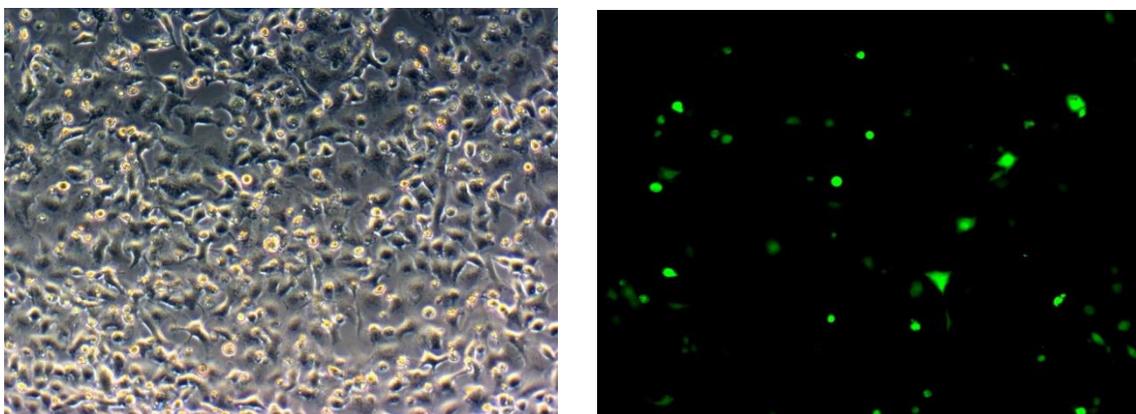
Wang W, Wyckoff JB, Goswami S, Wang Y, Sidani M, Segall JE, Condeelis JS. Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors. *Cancer Res*. 2007; 67:3505-11.

Yoshida M, Khokhar AR, Siddik ZH. Biochemical pharmacology of homologous alicyclic mixed amine platinum(II) complexes in sensitive and resistant tumor cell lines. *Cancer Res.* 1994; 54:3468-73.

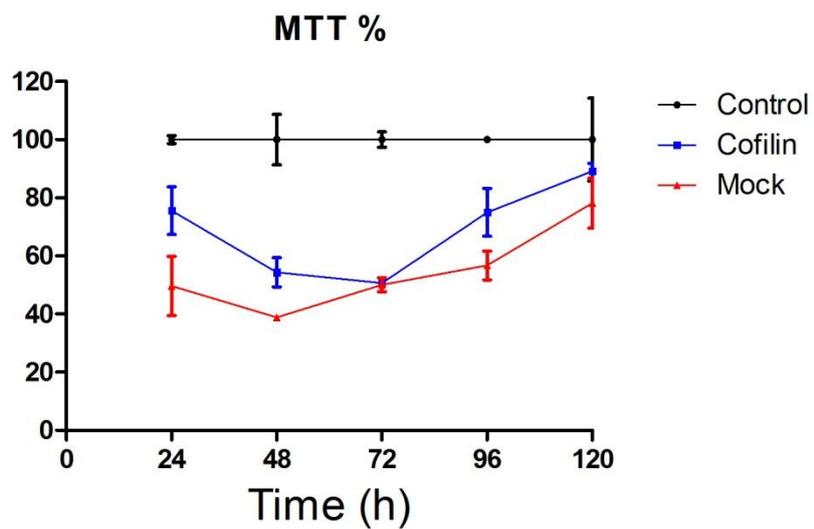
## ANEXOS



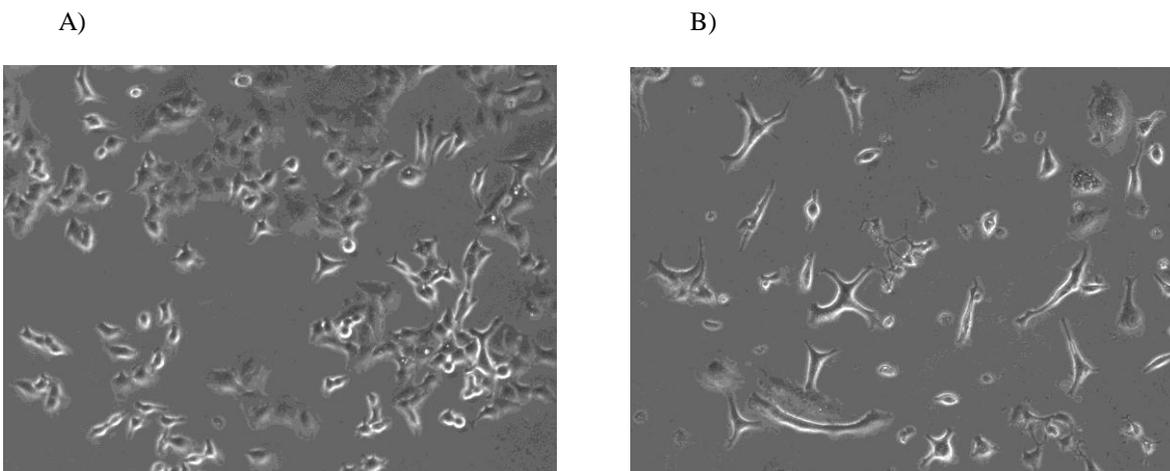
**Figura 1:** Análise de citometria de fluxo com sobreposição do controle com as células A549 transfetadas com plasmídeo contendo a sequência GFP (tempo de 48 horas).



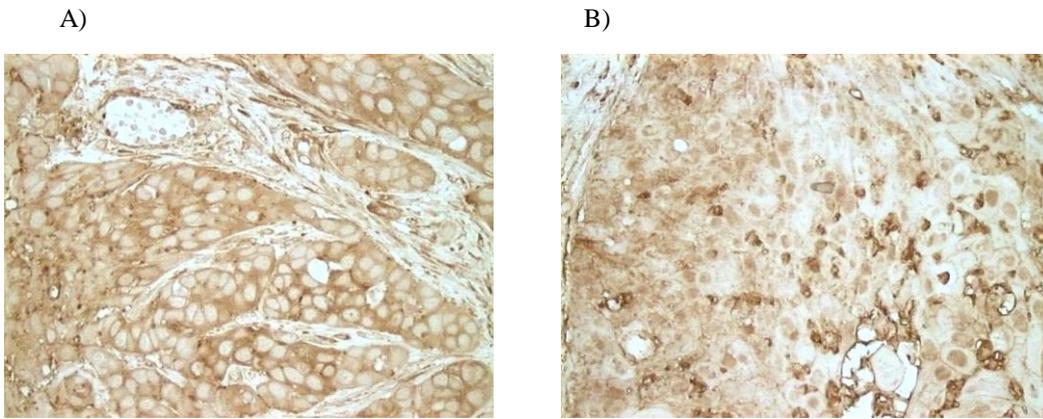
**Figura 2:** Células A549 sem fluorescência e após análise de fluorescência, mostrando a marcação positiva do plasmídeo GFP (X200, tempo de 48 horas).



**Figura 3:** Viabilidade das células A549 transfetadas com o plasmídeo da cofilina e com o Mock em diferentes tempos.



**Figura 4:** Células A549 controle (em A), e células A549 após o tratamento com 10X o  $IC_{50}$  da droga cisplatina (em B).



**Figura 5:** Imunoistoquímica da cofilina-1 de biópsia de paciente com câncer de pulmão de não-pequenas células. Marcação citosólica em A, e marcação nuclear em B.

Tabela 1: Descrição TNM

---

Tumores Primários (T)

TX – O tumor primário não pode ser avaliado

T0 – Não há evidência de tumor primário

Tis – Carcinoma *in situ*

T1 – Tumor < ou igual a 3 cm de tamanho envolto pelo pulmão ou pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão proximal.

T2 – Tumor com qualquer uma das características de tamanho ou extensão:

>3cm de dimensão

Envolve os principais brônquios, > ou igual a 2cm distais da Carina

Invasão da pleura visceral

Associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva

T3 – Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer uma destas estruturas: caixa torácica, diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal.

T4 – Tumor de qualquer tamanho que diretamente invade qualquer uma destas estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, carina, dentre outras; ou tumor com malignidade pleural ou efusão pericárdica.

Linfonodos Regionais (N)

NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais.

N1, N2 e N3 - Comprometimento crescente dos linfonodos regionais

Metástase a Distância (M)

MX - A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0 - Ausência de metástase à distância.

M1 - Metástase à distância.

---

**Tabela 1:** Classificação clínico-patológica TNM descrita para todos os tipos de tumores. Adaptado de [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) e *Mountain et al., 1997*.