

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA-FAMED**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO QUIMIOTERÁPICA NA INDUÇÃO DE MORTE  
IMUNOGÊNICA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO-  
PEQUENAS CÉLULAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**JOSÉ IGNÁCIO GONZALEZ SOLARI**

Porto Alegre,  
Outubro, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA-FAMED  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO QUIMIOTERÁPICA NA INDUÇÃO DE MORTE  
IMUNOGÊNICA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO-  
PEQUENAS CÉLULAS

JOSÉ IGNÁCIO GONZALEZ SOLARI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para o título de mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Cristiano Feijó Andrade

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Fábio Klamt

**Colaborador:** Prof. Dr. Eduardo Filippi-Chiela.

### CIP - Catalogação na Publicação

Gonzalez Solari, José Ignácio  
AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO QUIMIOTERÁPICA NA INDUÇÃO  
DE MORTE IMUNOGÊNICA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE  
PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS / José Ignácio  
Gonzalez Solari. -- 2017.  
70 f.

Orientador: Cristiano Feijó Andrade.  
Coorientador: Fábio Klamt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Câncer de Pulmão. 2. Morte imunogênica. 3.  
Autofagia. I. Feijó Andrade, Cristiano, orient. II.  
Klamt, Fábio, coorient. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente à minha família, sem a ajuda deles o mesmo não seria possível. Ao meu pai, por sempre me demonstrar, de maneira indireta e direta, desistir jamais e me incentivando a acreditar que é possível, basta querer. À minha mãe, desde o ensino básico me mostrando que não somos nada sem o estudo e me incentivando, cada vez mais, a querer um ser humano melhor. Mami y Papi, sin ustedes yo no seria nada muchas gracias por todo, los amo y los admiro eternamente. Simplesmente de su manera son los mejores. Meus irmãos (Maria, Carlitos y Flor) pois, eu sei que sempre estarão do meu lado, muito obrigado por fazerem parte de mim, los amo com toda mifuerza.

A todos, meu muito obrigado. Los quiero Mucho !!

## **AGRADECIMENTOS**

À Marta, responsável pela unidade de experimentação Animal (UEA) do HCPA, por me fazer acreditar em mim mesmo e me estimular para não desistir de fazer a entrevista da pós-graduação para o mestrado, ter me apresentado para o Dr. Cristiano. Marta, fostes fundamental para o meu ingresso no mestrado, muito obrigado de coração.

Ao Professor Dr. Cristiano Feijó Andrade, meu orientador, pela imensurável paciência ao longo destes 2 anos. Simplesmente muito obrigado por ter me aceitado, acreditado em mim desde o começo e sempre me incentivando em todas as etapas do experimento e a me tranquilizar.

Ao Professor Dr. Fábio Klamt, por ter aberto as portas do laboratório 24 da bioquímica da UFRGS, por ter me ajudado e incentivado desde o começo.

Ao Matheus Becker, por ter me inspirado e me apresentado ao tema “morte imunogênica”. Muito Obrigado.

À Graziela Hunning, por toda amizade e incentivo desde o meu estágio no Hospital de Cardiologia.

À Fabricia Oliveira Saraiva, obrigado pela ajuda no desenvolvimento da dissertação.

Ao Eduardo Filippi-Chiela, pela inspiração ao longo de todo os experimentos. Sem a tua presença de espírito e bom-humor, seria mais difícil chegar até aqui. Muito obrigado pelos ensinamentos e pela paciência.

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>1 Câncer de Pulmão .....</b>	<b>12</b>
<b>2 Manejo clínico do Câncer de pulmão .....</b>	<b>15</b>
2.1 Classificação do tumor .....	15
2.2 Tratamento .....	16
<b>3 Morte Celular Imunogênica .....</b>	<b>19</b>
3.1 Definição .....	19
3.2 Mecanismo da apoptose mediado pelo sistema imune .....	20
3.2.1 Translocação pré-apoptótica da CRT .....	21
3.2.2 Liberação de nucleotídeos (principalmente ATP) na fase pós- apoptótica.....	23
3.2.3 Secreção da proteína HMGB1 na fase tardia da apoptose .....	24
3.2.4 Consequências da ativação dos DAMPs.....	25
<b>4 Quimioterápicos para Tratamento de CPNPC e Morte Celular Imunogênica .....</b>	<b>27</b>
4.1 Platinas .....	27
4.2 Etoposide .....	32
4.3 Paclitaxel .....	33
4.4 Gemcitabina.....	34
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>5 Objetivos .....</b>	<b>36</b>
5.1 Geral .....	36
5.2 Específicos .....	36
<b>6 REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>7 Artigo .....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK .....	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
ATP .....	Trifosfato de adenosina
CD91 .....	<i>Cluster of Differentiation 91</i>
CPNPC.....	Câncer de pulmão de não-pequenas células
CPPC .....	Câncer de pulmão de pequenas células
CRT .....	Calreticulina
CT26 .....	linhagem de Carcinoma colorretal
DAMPs .....	<i>Danger associated molecular patterns and danger signals</i>
DC .....	Células Dendríticas
DNA.....	Ácido Desoxirribonucléico
DU 145 .....	Linhagem de câncer de próstata
EGF .....	<i>Epidermal growth factor</i>
eIF2 $\alpha$ .....	Fator de iniciação eucariótica
FDA .....	Food and Drug Administration
HCT116 .....	Linhagem celular do carcinoma colorretal humano HCT116
HMGB1 .....	Proteína do grupo de altamobilidade B1
IL-1.....	Interleucina 1
IL-1 $\beta$ .....	Interleucina 1 $\beta$
IL-6 .....	Interleucina 6
IL-18.....	Interleucina 18
IFN- $\gamma$ .....	Interferon-gama
LLC.....	Lewis Lung Carcinoma
LRP1.....	<i>Low density lipoprotein-related protein 1</i>
MCA205 .....	Linhagem celular de fibrossarcoma
MG-63OS.....	Linhagem celular de osteosarcoma
NLRP3.....	Inflamassoma

OV90 ..... Linhagem celular de câncer de ovário OV90

P2RX7 ..... *Purinergic receptor*

P2RY2 ..... *Purinergic receptor*

PS ..... Fosfolípido aniônico fosfatidilserina

PANX1 ..... Canal de panexina-1

PERK ..... Proteína transmembranar associada ao reticulo endoplasmático

RE ..... Retículo Endoplasmático

SNARE ..... *Soluble NSF attachment receptor*

TLR2 ..... *Toll-like receptor 2*

TLR4 ..... *Toll-like receptor 4*

TNF- $\alpha$  ..... Fator de necrose tumoral Alfa

TNM ..... T= tamanho do tumor, N= envolvimento linfonodal e M= metástase

TSA ..... Linhagem celular de carcinoma mamário

VEGF ..... *Vascular endothelial growth factor*

VP-16 ..... Etoposide



## LISTA DE TABELAS

Tabela1- Sistema TNM de estadiamento aplicado ao câncer de pulmão.....	15
Tabela2- Estadiamento – subconjuntos TNM aplicados ao carcinoma pulmonar de células não pequenas.....	16
Tabela 3 -Escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance de status.....	16

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de Câncer de Pulmão.....	13
Figura 2. Mecanismo da Morte celular Imunogênica.....	21

## RESUMO

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer na população mundial. Muitos estudos vêm demonstrando que em determinados tipos tumorais, algumas drogas quimioterápicas estimulam uma eficiente resposta antitumoral, através da indução de uma forma de apoptose conhecida como morte celular imunogênica, sendo caracterizado por uma série de alterações que ocorrem no processo apoptótico, como a exposição pré-apoptótica da calreticulina (CRT) na superfície celular, a liberação de ATP e HMGB1 para o microambiente tumoral.

**Objetivo:** Avaliar a possível morte celular imunogênica causada pelos principais agentes quimioterápicos combinados utilizados na prática clínica para o tratamento de câncer de pulmão de não-pequenas células (CPNPC).

**Metodologia:** Células da linhagem celular de CPNPC A549, foram plaqueadas com os quimioterápicos para indução da morte celular pelo período de 48 horas. Seguido da determinação da concentração das drogas a ser utilizadas com a quantificação da taxa de apoptose inicial com a marcação de anexina V e a exposição da CRT pela citometria de fluxo. O sobrenadante foi retirado para ser analisado o ATP pelo ensaio de bioluminescência e o HMGB1 pela técnica de Dot Blot.

**Resultados:** As porcentagens de células apoptóticas iniciais encontradas para cada tratamento com quimioterápicos foram: controle:  $4 \pm 1\%$ , cisplatina  $40\mu\text{M}$  + etoposide  $13,2\mu\text{M}$ :  $42,1 \pm 8,8\%$ , carboplatina  $200\mu\text{M}$  + Paclitaxel  $100\text{ nM}$ :  $20,8 \pm 4,1\%$ . **Expressão da CRT:** controle:  $0,002 \pm 0,001\%$ ; cisplatina  $40\mu\text{M}$  + etoposide  $13,2\mu\text{M}$ :  $60,7 \pm 1,87\%$ , carboplatina  $200\mu\text{M}$  + paclitaxel  $100\text{nM}$ :  $55,5 \pm 4,6\%$ . **ATP:** controle: 100; cisplatina  $40\mu\text{M}$  + etoposide  $13,2\mu\text{M}$ :  $320,4 \pm 9,4$  e carboplatina  $200\mu\text{M}$  + paclitaxel  $100\text{ nM}$ :  $299,6 \pm 6,4$ . **HMGB1:** controle: 1; cisplatina  $40\mu\text{M}$  + etoposide  $13,2\mu\text{M}$ :  $2,20 \pm 0,10$ ; carboplatina  $200\mu\text{M}$  + paclitaxel  $100\text{nM}$ :  $1,56 \pm 0,25$ . **Conclusão:** Observamos que, ao contrário de alguns estudos ambos as combinações de quimioterápicos possuem a capacidade de expressar os principais marcadores para desencadear a morte celular imunogênica. Podendo auxiliar no desenvolvimento e melhor direcionamento, dos quimioterápicos sobre a indução da morte imunogênica para o tratamento do CPNPC.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 1 CÂNCER DE PULMÃO

### Introdução

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer em homens, sendo a segunda entre as mulheres na população mundial (1). Dados epidemiológicos globais indicam que, em 2015, 1, 7 milhão de pessoas foram diagnosticadas como novos casos de câncer de pulmão (2). No Brasil, no ano de 2014, 25.333 mortes ocorreram por neoplasia maligna dos brônquios e dos pulmões (3), sendo 3.246 no estado do Rio Grande do Sul, que o coloca em terceiro lugar no ranking nacional (4).

Este câncer é altamente heterogêneo, podendo apresentar tanto tumores ressecáveis ou não e cursar com ou sem metástase microscópica para os linfonodos. Ele pode surgir em muitos locais diferentes (tanto da árvore brônquica quanto no parênquima pulmonar), apresentando sinais e sintomas altamente variáveis, dependendo da localização anatômica (5).

Costuma-se subdividir o câncer de pulmão em dois principais grupos clínicos, dependendo da sua biologia, terapia e prognóstico (Figura 1): câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de não-pequenas células (CPNPC). Estes dois grupos têm características próprias de crescimento e disseminação assim como tratamento (6).

O CPNPC é responsável por cerca de 80-85% dos casos, sendo dividido em 3 principais subtipos, dependendo de qual célula se originou: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (epidermóide) e o carcinoma de grandes células (7). O adenocarcinoma é o subtipo mais frequente, atingindo tanto fumantes como ex-fumantes, sendo também bem comum em pessoas não tabagistas (8).

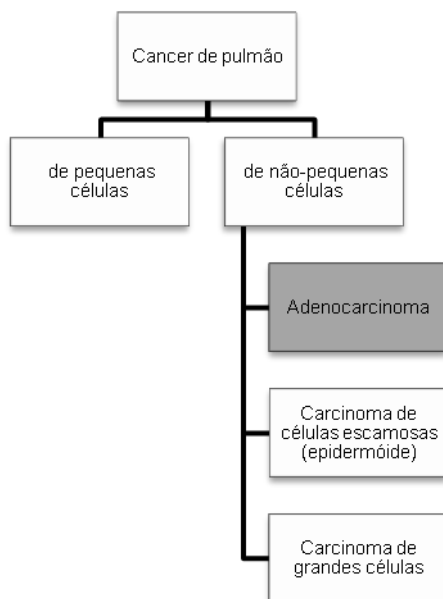


Figura 1. Tipos de Câncer de Pulmão.  
Fonte: elaborado pelo autor.

Atualmente o CPNPC é uma doença extremamente letal, cerca de 40% dos pacientes são diagnosticados em estágio avançado da doença (IV), tendo um prognóstico extremamente ruim, com uma sobrevida média de menos de um ano (7). Em países desenvolvidos o percentual de pacientes que apresentam uma taxa de sobrevida superior a cinco anos varia entre 13 a 21% e países em desenvolvimento entre 7 a 10%(6,7).

A alta letalidade dessa doença é atribuída ao fato de ela não apresentar sintomas iniciais específicos ou biomarcadores eficazes. Por isso, a maioria dos pacientes é diagnosticada em estágio avançado e inoperável da doença (9,10).

O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão, fumantes têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver carcinoma de pulmão quando comparados aos não tabagistas (11). O tabaco é constituído por uma série de carcinógenos – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com capacidade de progressão tumoral, que requerem uma alteração metabólica para exercer seus efeitos (12). Os carcinógenos presentes no tabaco produzem espécies reativas de oxigênio que são extremamente prejudiciais aos pulmões, tendo como resultado danos e quebras ao ácido desoxirribonucléico (DNA), exigindo vários mecanismos de reparo (13). Mesmo após a cessação do

tabagismo os danos genéticos e metabólicos persistem. Por isso, ex-tabagistas tendem a ter um risco elevado para câncer de pulmão por vários anos (14,15).

O câncer de pulmão também pode ser causado por exposições a outros poluentes, especialmente entre trabalhadores de minas de carvão e aqueles que entram em contato com poluição do ar e certos materiais combustíveis. Outra população de risco para câncer de pulmão são indivíduos que, apesar de não fumarem, fazem uso de cozimento com carvão e outros materiais combustíveis, poluindo o ar do interior do domicílio, acabam mostrando taxas de prevalência de câncer de pulmão mais alta do que a população em geral onde vivem como é o caso de mulheres chinesas (16).

Essas exposições vão resultar em alterações no fenótipo celular normal ocorrendo várias etapas que se caracterizam pelo acúmulo de inúmeras alterações sucessivas. Causando defeitos nos mecanismos reguladores que orientam a proliferação celular normal e a homeostasia. Estas alterações levam resistência à morte celular, permitindo a imortalidade replicativa, evitando a destruição imunológica do tumor, crescimento invasivo de tecido subjacente, metástase em outros órgãos via sistema sanguíneo e/ou linfático, além da produção de fatores de angiogênicos etc. Estes fatores levam a uma instabilidade genômica gerando uma diversidade genética e epigenética, acelerando o processo de inflamação e causando a reprogramação do metabolismo energético a favor da progressão tumoral ( 5,17,18).

A melhor estratégia para diminuir a incidência de câncer de pulmão é a prevenção contínua do hábito de fumar, seja através do estabelecimento de lugares livres do fumo, monitoramento e assistência a pessoas que fumam e a proibição da publicidade a favor do tabaco. Tais estratégias são as melhores armas para estimular as pessoas a pararem com o hábito de fumar (19).

## 2 MANEJO CLÍNICO DO CÂNCER DE PULMÃO

O primeiro passo para o manejo de um paciente com câncer de pulmão é estabelecer corretamente o seu prognóstico, pois isso é essencial na escolha do tratamento para cada caso. As variáveis relacionadas ao prognóstico podem ser divididas em: relativas ao tumor (tipo celular, local primário e estadiamento); e relacionadas ao estado do paciente.

### 2.1 Classificação do tumor

A classificação anatômica do tumor é descrito conforme o sistema TNM (T= tamanho do tumor, N= envolvimento linfonodal e M= metástase), que inclui características como aspecto do câncer, localização, existência de metástases locais ou a distância e comprometimento de outros órgãos (Tabela 1).

Tabela 1 - Sistema TNM de estadiamento aplicado ao câncer de pulmão.

TX	Citologia positiva, somente
T1	≤ 3 cm
T2	> 3 cm, brônquio principal ≥ 2 cm da Carina, invade pleura visceral, atelectasia parcial
T3	Parede torácica, diafragma, pericárdio, pleura mediastinal, brônquio principal < 2 cm da Carina, atelectasia total
T4	Mediastino, coração, grandes vasos, carina, traquéia, esôfago, vértebra; nódulos distintos no mesmo lobo, derrame pleural maligno
N1	Peribrônquico homolateral, hilar homolateral
N2	Mediastinal homolateral, subcarinal
N3	Hilar ou mediastinal contralateral, escaleno ou supraclavicular
M1	Inclui nódulo distinto em lobo diferente

Fonte: Ministério da Saúde (20).

A partir da classificação TNM, é possível determinar o estágio do tumor, o que auxilia na definição do tipo de tratamento e a antecipação do prognóstico do paciente, sendo utilizado tanto para o CPNPC quanto para o SCLC (21).

Tabela 2 - Estadiamento – subconjuntos TNM aplicados ao carcinoma pulmonar de células não pequenas.

Estágio	Subconjunto TNM
0	Carcinoma in situ
IA	T1N0M0
IB	T2N0M0
IIA	T1N1M0
IIB	T2N1M0 T3N0M0
IIIA	T3N1M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N2M0
IIIB	T4N0M0 T4N1M0 T4N2M0 T1N3M0 T2N3M0 T3N3M0 T4N3M0

Fonte: McLoud et al (22)

Para avaliar o estado do paciente, comumente é utilizada uma escala chamada de “*performance status*”, que avalia a progressão da doença (Tabela 3). O objetivo desta escala é quantificar o bem-estar geral dos pacientes, a fim de determinar a possibilidade do paciente de receber quimioterápicos e o ajuste de doses, dentre outros. As variáveis verificadas são úteis individualmente ou combinadas para formar um índice prognóstico múltiplo (23).

Tabela 3 - Escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance de status

Grau	Descrição
0	Totalmente ativo. Capaz de realizar todas as performances pré-doença sem restrições.
1	Restrições em relação a atividades extenuantes. Capaz de realizar trabalhos de natureza leve ou sedentária.
2	Ambulatorial e capaz de se cuidar, mas incapaz de realizar qualquer atividade laborosa.
3	Capaz de alguns autocuidados limitados. Confinando à cama ou à cadeira mais de 50% das horas em que o indivíduo está acordado.
4	Completamente incapaz. Totalmente confinado à cama ou à cadeira.
5	Morto

Fonte: Adaptado de Oken et al.(24).

## 2.2 Tratamento

A escolha do tratamento leva em conta, principalmente, o estadiamento do tumor. Além disso, a determinação do tratamento depende de outros fatores, como comorbidade, histologia e características genéticas e moleculares.



Para os estágios I e II do CPNPC, o tratamento é cirúrgico (associado ou não à quimioterapia). Evidências sugerem que após a ressecção cirúrgica, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 60- 80% em estágio I e 30-50% em estágio II, aumentando a possibilidade de cura nestes pacientes (25).

Em algumas situações, mesmo no estágio inicial da doença não é possível proceder com cirurgia (por exemplo, por algum tipo de comorbidade). Nestes casos, pode ser utilizado o tratamento com radioterapia estereotáxica (25).

No estágio II, além do tratamento cirúrgico, também pode ser recomendado tratamento com radioterapia e quimioterapia adjuvante baseada em agente de platina (26,27). As combinações de quimioterápicos recomendados nestes estágios são (28–30):

- Cisplatina + etoposide;
- Cisplatina + vinorelbina e
- Cisplatina + gemcitabina.

Pacientes com algumas comorbidades que não toleram os efeitos adversos da cisplatina podem ser tratados com carboplatina + paclitaxel ou carboplatina + pemetrexed (31). A estratégia para o tratamento no estágio III inclui: radioterapia, quimioterapia e eventualmente procedimento cirúrgico em tumores ressecáveis (32).

Para pacientes em estágio avançado com metástases, o tratamento consiste em quimioterapia combinada com radioterapia, ambos com fins paliativos, o que melhora a sobrevida e a qualidade de vida destes pacientes (33). A cirurgia nestes casos, só é considerada em situações especiais para alívio dos sintomas, como por exemplo, para controle de infecção em lesões obstrutivas (24,27).

Nestes casos, além das combinações de quimioterápicos anteriormente citadas, também são utilizadas as seguintes combinações: carboplatina + pemetrexed ou cisplatina + pemetrexed (34). O tratamento quimioterápico aumenta a sobrevida em um ano em média, em apenas 10 a 50% dos pacientes neste estágio (35).

Como a eficácia dessas drogas é muito baixa, principalmente com os agentes derivados de platina, novas abordagens estão sendo testadas com o objetivo de melhorar na resposta ao tratamento. Como outros tipos de quimioterápicos estão surgindo como: o *erlotinib*, *afatinib*, e o *crizotinib* (9,33,36). Essas são as terapias de primeira linha aprovadas para pacientes que expressam mutações pontuais no receptor EGF (do inglês “*epidermal growth factor*”), ou apresentam tumores positivos para rearranjo AKL (do inglês “*anaplastic lymphomakinase*”) (37).

Pacientes com CPNPC do subtipo de células não escamosas que apresentam as mesmas mutações citadas anteriormente podem ser tratados com *bevacizumab*, um anticorpo monoclonal anti- VEGF (do inglês “*vascular endothelial growth factor*”) com objetivo de inibir a angiogênese, resultando na depleção de moléculas e nutrientes essenciais no microambiente tumoral (37). Portanto, estas drogas privilegiam uma pequena parcela de pacientes com CPNPC, ainda, assim, limitando-se a determinados fatores.

### 3 MORTE CELULARIMUNOGÊNICA

#### 3.1 Definição

O processo de morte celular é de extrema importância no desenvolvimento de um indivíduo, como na manutenção de homeostasia tecidual. Devido a tal importância, a perda do equilíbrio entre divisão e morte celular são um dos motivos principais para a instalação do processo neoplásico. Existem vários tipos de morte celular, sendo a apoptose, a necrose e a autofagia as mais estudadas (38).

O termo apoptose foi criado em 1972, para designar um tipo de morte celular que ocorre de maneira programada, com gasto de trifosfato de adenosina (ATP), permanecendo até hoje um dos mecanismos biológicos mais estudados, pois é o mecanismo celular fundamental envolvido em várias condições tanto fisiológicas como patológicas.

A morte celular apoptótica é um processo reversível até uma determinada fase, mas tornando-se irreversível. É caracterizada pela forte ativação de caspases (proteases específicas), permeabilização mitocondrial e exposição do fosfolípido aniônico fosfatidilserina (PS), sendo responsável por emitir sinais para que ocorra o processo de fagocitose celular (38).

Apoptose é um dos tipos mais comuns de morte celular, sendo caracterizada pelo arredondamento celular, retração dos pseudopodes, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear (cariorréxis), formação dos corpos apoptóticos na membrana plasmática (mantendo a integridade celular até o final do processo apoptótico) e resultando no engolfamento pelos fagócitos residentes (38).

A ativação da apoptose pode ocorrer através de diferentes rotas bioquímicas como por exemplo: via intrínseca ou extrínseca, com ou sem contribuição mitocondrial dentre outros modos.

Apesar dessas características, morte celular por apoptose pode ocultar aspectos funcionais heterogêneos como a percepção desta pelo sistema imunológico. Apoptose pode ocorrer de forma não – imunogênica ou imunogênica, sendo esta podendo ser estimulada por alguns tipos de quimioterápicos levando à célula neoplásica a secreção de proteínas onde o sistema imune é ativado (39,40).

Neste último caso, é fundamental a participação de um sistema imune competente. Esse mecanismo ficou conhecido como *morte celular imunogênica*, termo cunhado pelo grupo de pesquisa liderado por Guido Kroemer em 2005(41).

Este mecanismo de apoptose mediado pelo sistema imune tem sido demonstrado em diversos tipos de tumores em estudos experimentais e em humanos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* submetidos ao tratamento de drogas quimioterápicas, radioterapia ou terapia fotodinâmica. Desse modo, alguns quimioterápicos parecem estimular uma resposta imune anti-resistência tumoral, contribuindo assim, para a total eliminação ou contenção do processo tumoral em animais imunocompetentes (42–44), sendo capaz de gerar memória imunológica (45).

É importante destacar que a apoptose via sistema imune não é a única maneira que os quimioterápicos levam à morte celular. Alguns quimioterápicos também parecem ser capazes de induzir necrose, autofagia e outros tipos de morte celular, que não depende da intermediação do sistema imune não sendo capaz de produzir uma memória imunológica.

### 3.2 Mecanismo da apoptose mediado pelo sistema imune

Para dar início ao processo de morte celular imunogênica, é necessário que a quimioterapia (ou a radioterapia ou a terapia fotodinâmica) cause estresse celular em células neoplásicas. A partir desse estresse, substâncias endógenas são produzidas, ativando a via da morte celular e então são liberados vários tipos de DAMPs (do inglês – “danger-associated molecular patterns and danger signal”) (Padrões Moleculares Associados a Danos) (Figura 2).

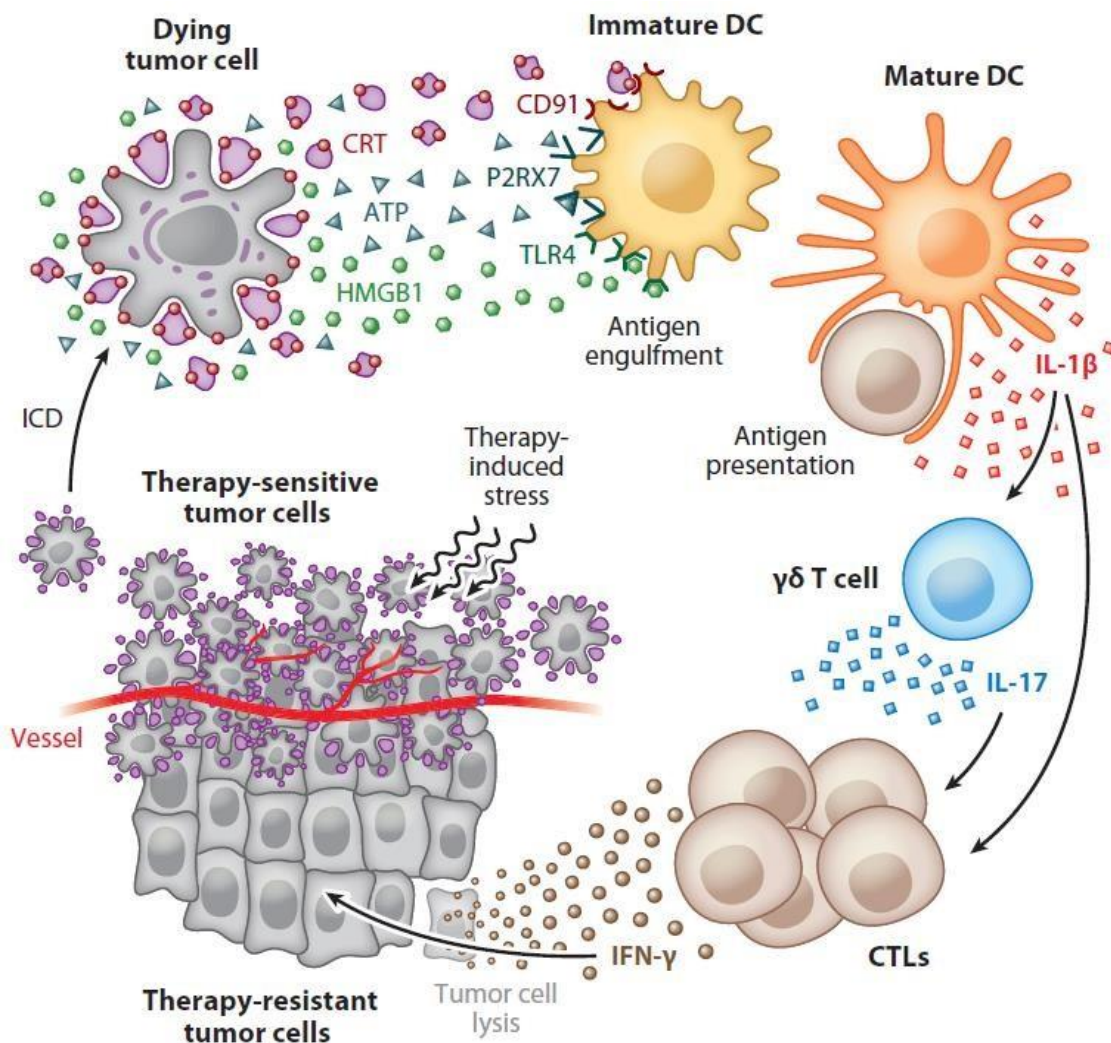


Figura 2. Mecanismo da Morte celular Imunogênica.  
Fonte: Kroemer *et al.*(46)

Os 3 principais DAMPs (47) são:

- Translocação pré-apoptótica da calreticulina (CRT);
- Liberação de nucleotídeos principalmente o ATP, na fase pós-apoptótica;
- Secreção para o meio extracelular de proteína do grupo de alta mobilidade (HMGB1) na fase tardia da apoptose (necrose).

### 3.2.1 Translocação pré-apoptótica da CRT

A CRT é uma chaperona com função de modular o processo de homeostasia do cálcio, normalmente encontrada no retículo endoplasmático (RE),

mas também pode ser encontrada em pequenas quantidades no citosol e núcleo (46,48).

A exposição da CRT na superfície da membrana plasmática é desencadeada em resposta ao estresse causado no lúmen do RE e depende de uma série de alterações que ocorrem na apoptose (46,48). A exposição da CRT ocorre antes da exposição da PS do folheto externo da membrana plasmática, sendo este processo a principal diferença entre morte celular imunogênica e não-imunogênica (39).

Quimioterápicos como antraciclinas e outros agem causando, estresse no RE dando o início ao processo fundamental de fosforilação do fator de iniciação eucariótica (eIF2 $\alpha$ ), pelas proteínas transdutoras de sinais de estresse no RE, como a PEK1<sup>1</sup>( protein kinase RNA (PKR)-like RE kinase).Este processo estimula a proteólise mediada pela caspase 8 no RE pela proteína BAP 1 e ativação das proteínas pro-apoptóticas BAX e BAK, resultando no transporte de CRT do RE para o aparelho de Golgi (48). Ocorrendo a exocitose nas vesículas do aparelho de golgi, tendo como resultado a translocação dependente de SNARE (do inglês “*soluble NSF attachment receptor*”) de CRT para a superfície da membrana plasmática. Outra forma de exposição da CRT pela antraciclina é estresse via formação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, o que leva a translocação da CRT para o RE (39).

Uma vez exposta na superfície celular, a CRT emite sinais de atração para as células dendríticas (DC) (do inglês “*eat me signal*”). As proteínas de choque térmico como HSP70 e HSP90 (também fazem parte dos marcadores de morte imunogênica) são Expressas com a CRT. Estes se ligam ao receptor-relacionado CD 91 (do inglês “Cluster of Differentiation 91”), também conhecido como LRP1( do inglês “ Low density lipoprotein-related protein 1” ), das células apresentadoras de antígenos para promover a produção de citocinas pro-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa ( do inglês “TNF-  $\alpha$ ”), ativando assim, uma resposta de imunossupressão ao ambiente tumoral (39).

---

<sup>1</sup>PERK-proteína transmembranar associada ao retículo endoplasmático

Sendo assim, a exposição da CRT é determinante na indução da morte imunogênica, como demonstrado em vários estudos tanto em modelo *in vivo* e *in vitro* (39).

Em uma coorte de pacientes com neuroblastoma, câncer de pulmão e colorretal, altos níveis de CRT em células malignas está relacionado com um prognóstico favorável e aumento de sobrevida nestes pacientes (49–51).

Alguns mecanismos inibem a via por onde ocorre a translocação da CRT, seja farmacológica ou intervenção genética, o que elimina a CRT da superfície celular e anula o processo imunogênico de atração das DC, diminuindo a resposta imune gerada pelo agente químico estressor (44).

### 3.2.2 Liberação de nucleotídeos (principalmente o ATP) na fase pós-apoptótica

Além de servir como uma das principais fontes de energia intracelular, o ATP também atua no mecanismo de sinalização extracelular. Ele se encontra no citoplasma numa concentração de 2 e 5mM (52).

O ATP é secretado em resposta aos efeitos citotóxicos e citostáticos de alguns agentes agressores como as drogas quimioterápicas (53,54). A liberação do ATP ocorre durante o processo de apoptose e formação dos corpos apoptóticos. Na apoptose, diferentes mecanismos podem levar à liberação de ATP do meio intracelular para o extracelular: ativação dos canais de calnexina, ativação dos transportadores ABC, abertura dos canais de panexina1 (PANX1) e autofagia (52). Destes três, a abertura dos canais de panexina1 e a autofagia parecem ocorrer na morte celular imunogênica.

Durante a formação dos corpos apoptóticos, a caspase (3 ou 7) atua na clivagem na porção C-terminal levando a abertura e ativação dos canais de panexina1, ocorrendo assim a liberação de ATP para o meio extracelular. A ativação apoptótica das caspases também é necessária para que ocorra o recrutamento de macrófagos para o microambiente tumoral (55). O processo de autofagia também pode se tornar necessário para liberação de ATP a partir de células neoplásicas em apoptose. Na autofagia os constituintes citoplasmáticos são degradados em organelas de dupla membrana, os autofagosomas e posteriormente a sua fusão com os lisossomos, tendo como consequência a degradação do conteúdo autofagocítico pelas hidrolases ácidas e sua reciclagem em direção ao metabolismo energético ou reações anabólicas, liberando o ATP para o meio extracelular (56).

Michaud et al., demonstraram a relação entre autofagia e liberação de ATP, quando ocorre a inibição da autofagia pela via farmacológica os níveis de ATP extracelular são reduzidos, anulando o processo imunogênico (57).

O ATP no microambiente tumoral passa a emitir sinais (do inglês “*find-me signal*”) para atrair DC para o ambiente tumoral e ocorrendo a fagocitose dos corpos apoptóticos gerados (58).

Uma vez liberado no meio extracelular, o ATP se liga aos receptores purinérgicos P2RY2 e P2RX7 das células dendríticas, tendo como resultado o influxo de íons de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> ativando assim o inflamassoma NLRP3 (do inglês “*Inflammasome*”), seguido da ativação da caspase-1, estimulando a maturação proteolítica e secreção de interleucina 1(IL-1) e interleucina 18 (IL-18), contribuindo para a resposta imunogênica(58).

### 3.2.3 *Secreção para o meio extracelular de proteína do grupo de altamobilidade (HMGB1) na fase tardia da apoptose.*

A HMGB1 é uma proteína caracterizada pela sua alta mobilidade eletroforética em géis de poliacrilamida, sendo considerada uma proteína não-histona ubíqua. A HMGB1 se localiza no núcleo ligado a cromatina, tendo funções intra e extracelulares. Desempenhando função de replicação, reparo, recombinação, transcrição no DNA e estabilidade genômica (59).

O HMGB1 pode ser liberado pelas células do sistema imunológicas inato em resposta a patógenos (sem necessidade de morte celular) ou secretado por células em resposta algum tipo de dano na fase tardia da apoptose (necrose) (60). Quando secretado para o meio extracelular, o HMGB1 estimula a produção de fatores pró-inflamatórios. Entre os agentes causadores de danos estão alguns agentes antineoplásicos (antraciclinas, oxiplatina). A capacidade destes agressores de induzir a liberação de HMGB1 tem sido observada em vários modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (55,61).



A liberação de HMGB1, esta associado à perda da integridade da membrana plasmática e a translocação núcleo citoplasma para o meio extracelular. O HMGB1 uma vez secretado no meio extracelular emite sinais de perigo (do inglês “*danger signals*”), e tem capacidade de desencadear uma resposta pro-inflamatória através da ligação com receptores TLR4 e TLR2 (do inglês “*toll-like receptor*”) nas DC. A resposta imune estimulada, leva à ativação de citocinas pelos monócitos e macrófagos, contribuindo assim para a morte imunogênica(62).

#### 3.2.4 Consequências da ativação dos Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs)

Tanto a ativação da translocação pré-apoptótica da CRT, quanto a liberação do ATP e HMGB, tem como resultado atração de DC para o microambiente tumoral. Uma vez lá, as DC fagocitam as células tumorais e passam a liberar substâncias pró-inflamatórias no tumor (por exemplo interleucina IL-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) e IL-18, de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), dentre outras) como demonstrado na figura 2. Além disso, as DC também realizam a apresentação de antígenos tumorais pelas células apresentadoras de antígenos, culminando principalmente com a ativação de linfócitos T citotóxicos CD8+, que são fundamentais na ativação da resposta antitumoral imune de retração tumoral(63).

Este mecanismo é tão eficiente que pode levar à erradicação de células tumorais, tendo como resultado a morte celular imunogênica (63).

Em contrapartida, a morte celular seja por apoptose não imunogênica culmina com a modulação de células do sistema imunológico, principalmente os macrófagos, promovendo a liberação de interleucinas e outros fatores anti-inflamatórios, estimulando a reconstrução tecidual e em vez de erradicar o tumor, este processo pode contribuir para a disseminação do processo neoplásico (64).

Sendo assim, dado que o microambiente tumoral é extremamente heterogêneo, e que há uma modulação da resposta imune em favor do tumor (65). A obtenção de fármacos, ou a combinação dos já existentes, sobre os mecanismos de ativação causados pelos quimioterápicos e a escolha de um tratamento visando um tipo de morte celular na qual a célula é induzida, podem contribuir de forma significativa para uma resposta mais eficaz contra tumores, em especial o CPNPC.

As evidências disponíveis até o momento não permitem estabelecer um consenso sobre os agentes quimioterápicos utilizados na prática clínica do CPNPC (como cisplatina, carboplatina, etoposide, paclitaxel, gemcitabina) no que diz respeito à capacidade desses quimioterápicos da imunogenicidade do processo apoptótico quando aplicados em monoterapia ou combinados(32).

#### 4 QUIMIOTERÁPICOS PARA O TRATAMENTO DE CPNPC E MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA

A quimioterapia anticancerígena tem dois objetivos principais: causar a morte seletiva de células neoplásicas ou interromper irreversivelmente o seu crescimento e proliferação. Geralmente as drogas citotóxicas atuam interferindo na síntese do DNA ou causando algum tipo de dano ao mesmo, assim levando a célula à morte celular. No entanto, os quimioterápicos que são capazes de induzir apoptose imunogênica parecem ser mais eficientes, tanto que estudos têm demonstrado que vários tipos de quimioterápicos são mais eficientes em tumores implantados em animais imunocompetentes do que em animais imunodeficientes (42,61,66).

Estratégias terapêuticas que possam modular o sistema imunológico, tendo a capacidade de desencadear uma resposta imunológica e sustentar um resultado terapêutico duradouro são extremamente relevantes.

##### 4.1 Platinas

Os quimioterápicos baseados em agentes alquilantes como a platina são os principais utilizados na prática oncológica mundialmente. São eles: cisplatina, carboplatina e oxiplatina(67).

A **cisplatina** (cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), foi aprovada pela FDA (do inglês “*Food and Drug Administration*”) em 12 de dezembro de 1978 com nome comercial de Platinol (*Bristol-Myers Squibb*)(67). Em uso há quase 40 anos, ela vem sendo utilizada para o tratamento em vários tipos de câncer como: ovário, CPNPC, câncer de pulmão de pequenas células, pescoço, cervical, testículo, vesícula, colorretal, mama, cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin e outros tipos de neoplasias (68,69).

No CPNPC, a cisplatina foi primeiro utilizada em 1988. Atualmente, é o tratamento de primeira escolha, sendo o padrão-ouro (70). Evidências apontam que a cisplatina aumenta a sobrevivência dos casos de CPNPC em um ano (33). Isto levou a avaliação de várias combinações à base de platina para o tratamento

de CPNPC, com o intuito de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes (32).

No início do tratamento, a cisplatina apresenta respostas parciais, podendo ocorrer à estabilização da doença. Por exemplo, a cisplatina é altamente efetiva contra câncer testicular de células germinativas, levando a uma remissão de aproximadamente 80% dos pacientes (71). No entanto, uma fração de tumores que são originalmente sensíveis à cisplatina, eventualmente desenvolve quimiorresistência aos efeitos citostáticos e citotóxicos em alguns tipos de câncer como, por exemplo, o de pulmão, próstata e colorretal (72).

O tratamento com cisplatina é acompanhada de diversos efeitos colaterais como: nefrotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos e ototoxicos ligeiros ou moderados. Tais efeitos adversos forma o principal obstáculo contra o uso deste quimioterápico (73).

Assim, um dos grandes objetivos da pesquisa clínica em relação à cisplatina é estabelecer esquemas de tratamento que minimizem seus efeitos adversos e potencializem sua capacidade de induzir a morte tumoral, CPNPC.

O mecanismo de ação da cisplatina ainda não foi muito bem esclarecido. O que se sabe atualmente é que a platina e seus componentes entram na célula através da hidrólise que ocorre pela substituição dos cloretos por água, o que leva à perda de íons cloretos e oxalato, ativando a cisplatina e formando derivados reativos de mono-aquo e di-aquo (74). Este produto hidrolisado é um eletrófilo composto pelas moléculas reativas de platina, que se liga aos grupos nucleófilos contendo oxigênio, nitrogênio, ácidos nucleicos e doadores de enxofre. Estes grupos são onipresentes dentro da célula, nas cadeias laterais de aminoácidos e nas bases de purina do RNA ou DNA(75).

Uma vez que as moléculas reativas da platina se ligam a esses grupos, ocorre a formação de adutos de platina ao DNA, sendo esse o principal mecanismo de ação da cisplatina. Estes adutos bloqueiam o processo de divisão celular como a transcrição e replicação, tendo como resultado o dano ao DNA levando à célula neoplásica a morte celular por apoptose, seguida ou não de necrose (76).

A cisplatina foi testada em linhagem CT26 em modelo animal de câncer colorretal, neste estudo verificou-se que ela falha na indução da translocação pré-apoptótica da CRT na membrana plasmática. O mesmo foi demonstrado em outros estudos e em modelos de câncer como, por exemplo: Linhagem celular MG-63 de osteosarcoma (77), Lewis *lung cancer cells* (LLC) (40), CT26, HCT116- linhagem celular do carcinoma colorretal humano (42). Mas por outro lado, a cisplatina consegue induzir a liberação de ATP e a secreção de HMGB1, mas não consegue causar a translocação de CRT para a superfície celular, sendo insuficiente para que haja a sinalização e o processo imunogênico(39).

A **oxiplatina** é quimioterápico conhecido por promover a morte imunogênica em células tumorais. Apesar das duas drogas serem similares, a oxiplatina e a cisplatina difere na capacidade de indução da morte imunogênica (39).

Estudos realizados em camundongos imunocompetentes x imunodeficientes demonstram que a oxiplatina podem ser mais efetiva contra tumores com o sistema imune intacto comparando com um sistema imune deficiente em camundongos (42), pois esta droga tem capacidade de induzir os 3 principais DAMPs (principalmente a translocação de CRT para a superfície celular, mas também a secreção de ATP e HMGB1 no microambiente tumoral) (42).

A indução da translocação da CRT para a membrana plasmática pela oxiplatina foi demonstrada em estudos na linhagem CT26 em modelo animal de câncer colorretal, resultando em atração de macrófagos tendo como resultado um aumento no processo de fagocitose (48).

Uma das principais diferenças observadas em alguns estudos, entre as duas drogas, é que a oxiplatina tem a capacidade de exposição da CRT, através de uma via complexa envolvida na resposta ao estresse que é acompanhada pela indução da fosforilação de eIF2 $\alpha$  mediada por PERK, clivagem por caspase 8 e a proteína BAP 31 do retículo endoplasmático resultando a translocação da CRT na superfície celular (78).

A cisplatina não provoca estresse no retículo endoplasmático, pois falha para estimular a ativação de PERK/eIF2 $\alpha$  /caspase 8/BAP 31clivagem. Sendo essencial este evento para que ocorra o processo de translocação da CRT, em decorrência disso, não há formação de stresse granular (55). Sendo assim, seria necessário utilizar algumas estratégias com objetivo de aumentar a capacidade imunogênica da cisplatina especialmente no tratamento de CPNPC.

Uma possibilidade seria a combinação de cisplatina e radioterapia, pois a radioterapia sozinha parece ser capaz de induzir a translocação de CRT, como demonstrado na linhagem CT26 e injetada por via subcutânea em camundongos. A radioterapia é um potente indutor da morte imunogênica, tanto sozinha quanto combinada com outros compostos (66).

Outra possibilidade para aumentar a imunogenicidade da cisplatina é combiná-la com outros compostos:

- Em modelo animal de carcinoma de câncer de pulmão (do inglês “Lewis lung câncer” -LLC), quando a cisplatina foi combinada com *piridoxina* (precursor da vitamina B6), houve indução de altos níveis de fosforilação de eIF2 $\alpha$ , tendo como resultado ativação de uma resposta imunogênica completa com a expressão dos 3 marcadores, desencadeando uma forte resposta imunológica contra o tumor(40).
- A *thapsigargin* um protótipo que induz estresse no RE, age na inibição da SERCA geralmente mediado pela ATPase que catalisam o influxo de Ca<sup>2+</sup> nas membranas intracelulares do RE. A thapsigargin causa fluxo de Ca<sup>2+</sup> no RE, sendo necessário para a translocação do CRT.
- *Atunicamycin* atua também causando estresse no RE, bloqueando a síntese de todas as glicoproteínas de N-ligados (N-glycans). A thapsigargin e tunicamycin restauram a imunogenicidade quando combinada com a cisplatina em modelos, *in vivo* e *in vitro* na linhagem celular Hela (câncer humano cervical), carcinoma de câncer de pulmão LLC, CT26 e linhagem celular de fibrosarcoma MCA 205 (55).

Poucos estudos foram realizados *in vivo e in vitro* de CPNPC, a com a cisplatina e suas principais combinações utilizadas na clínica, sobre a indução de morte imunogênica em CPNPC.

A **Carboplatina** ou *Cis-diammine* surgiu em 1980, como uma segunda geração de platina (cyclobutane-1, 1-dicarboxylate-O, O') platinum (II), sendo aprovada em 1989 pela FDA (79,80).

Foi desenvolvida com o intuito de diminuir os efeitos colaterais da cisplatina mantendo suas propriedades anticancerígenas. A carboplatina possui mecanismo de ação semelhante à cisplatina, (formação de adutos de DNA), porém com potencial de ação diminuído, mas sem os efeitos adversos de nefro e neurotoxicidade, permanecendo a quimioresistência para o tratamento de alguns tipos tumorais (81).

É utilizada para o tratamento de câncer colorretal, de ovário e diversos tipos de câncer de pulmão. Após tratamento com quimioterapia, em biópsias metastáticas em fígado de pacientes com câncer colorretal, se verificou um aumento na densidade de linfócitos infiltrados no tumor (82). Em outro estudo, o uso da carboplatina resultou em aumento na sobrevida de paciente com câncer colorretal e mama(83).

Até o momento, não encontramos estudos investigando sobre capacidade da carboplatina na indução da morte imunogênica especialmente em modelo de CPNPC.

Algumas evidências já foram apresentadas neste sentido para outros tipos de câncer. Estudo demonstrou a translocação parcial de CRT para a superfície celular, um pequeno aumento na secreção de ATP extracelular e a liberação parcial de HMGB1 quando a combinação de carboplatina e radioterapia, em linhagem celular de carcinoma mamário (TSA). A combinação destes dois agentes pode trazer a estimulação de receptores pro-imunogênicos nas células dendríticas, a partir das células tumorais no processo apoptótico, que podem resultar em respostas imunológicas contra o processo carcinogênico (84).

## 4.2 Etoposide

A etoposide (conhecida como VP-16) é um derivado semi-sintético do vegetal podofilotoxina, utilizado desde 1983 para o tratamento de vários tipos de câncer, como testicular, leucemia, SCLC, CPNPC e outros (85–87).

A VP-16 age na enzima topoisomerase II. Esta enzima nuclear tem como função o desenrolamento e o relaxamento do DNA, durante o processo de replicação e transcrição, sua ação é fundamental para o processo de duplicação. A VP-16 se liga à topoisomerase II, formando e estabilizando um complexo ternário (VP-16-topoisomerase II-DNA), o qual inibe a topoisomerase de afastar a clivagem de moléculas do ácido nucléico. Deste modo, este complexo medeia quebras no DNA de cadeia dupla (88).

Este complexo não interfere no processo de clivagem, mas prejudica na etapa de religação do ponto de quebra, que conseqüentemente impede que a replicação avance ao longo da fita de DNA. Essas quebras, acumuladas ao longo da fita de DNA, fazem com que a célula não consiga entrar na fase mitótica da divisão celular. Esta reação em curta duração é tolerada pela célula, no entanto, em altas concentrações tem efeito citotóxico, pois a reparação do DNA é prejudicada, resultando na morte celular (89).

A ação da VP-16 é melhorada de forma acentuada repetindo administração do fármaco; dependendo da dose administrada são geradas quebras de DNA de cadeia simples ou cadeia dupla (89).

A VP-16 sozinho não parece ser capaz de induzir os DAMPS, portanto, não seria capaz de levar à morte imunogênica. A VP-16 foi testada em várias linhagem celulares: de câncer de ovário (OV90), de câncer de próstata (DU 145), e leucemia linfoblástica aguda. Em todos esses estudos, após o tratamento de VP-16 não ocorreu a translocação da CRT (provavelmente porque o VP-16 não conseguiu causar estresse no RE). No mesmo estudo após o tratamento com VP-16 ocorre a liberação de HMGB1 em estágios tardios de apoptose (90). Após o



tratamento com VP-16 em linhagem EG7(do inglês “*thymoma cells*”), os níveis de ATP intracelular foram reduzidos e níveis de ATP extracelular aumentados (91).

Quando combinado com outros compostos, o VP-16 parece ser capaz de induzir morte celular imunogênica. Sendo demonstrado em modelo de câncer CT26 em camundongos imunocompetente, quando combinado VP-16 com tautomycin ou calyculin A ou salubrinal. Esses agentes são inibidores da eIF2 $\alpha$  fosfatase composta da proteína fosfatase1, que regula a subunidade 15( GADD34) e pirofosfatase (inorgânica) 1(PP1), tendo como resultado eIF2 $\alpha$  fosforilado, mesmo na ausência de estresse no RE. Como consequência, ocorre à exposição da CRT restaurando assim o processo imunogênico e aumentando assim a fagocitose tumoral (39).

#### 4.3 Paclitaxel

Paclitaxel, agente semi-sintético derivado do *Taxus brevifolia* (nome comercial ITaxo I®, Bristol-Myers Squibb) é utilizado desde 1998 para tratamento de primeira linha de vários tipos de tumores sólidos como: mama, CPNPC, câncer de pâncreas, em monoterapia ou em combinação (92–94). O paclitaxel age inibindo a divisão celular pela estabilização dos microtúbulos, podendo atuar como mimético de lipopolissacarídeos ativando o sistema imunológico atraindo macrófagos e mediando efeitos citotóxicos contra células tumorais (95,96).

O paclitaxel aumenta atividade antitumoral linfócito T CD8<sup>+</sup>e ativação de células apresentadoras de antígenos (97). Este processo demonstrado em vários estudos inclusive em CPNPC, podendo ser associado com aumento da efetividade do tratamento em pacientes com alguns tipos de câncer (96,98,99).

O Paclitaxel pode aumentar o processo imunológico, pois apresenta características imunogênicas. Em um estudo em modelo *in vitro* TSA, o paclitaxel combinado com radioterapia se mostrou capaz de induzir os DAMPS, aumentando a liberação de ATP e HMGB1 e a translocação da CRT para a membrana celular. Estas evidências clínicas e experimentais sugerem que respostas anticâncer, estimuladas pelo sistema imunológico podem contribuir diretamente para o sucesso da quimioterapia, aumentando assim a eficácia do tratamento quimioterápico (84).

#### 4.4 Gemcitabina

A Gemcitabina (2', 2'-difluoro-20-deoxycytidine) é utilizada para o tratamento de câncer de mama e CPNPC, entre outros (100,101). A gemcitabina é um análogo do nucleosídeo desoxicitidina. Ela age ao sofrer uma conversão intracelular complexa para a gemcitabina difosfato e trifosfato, após a absorção dos transportadores de nucleosídeos, que são importantes para explicar seus efeitos citotóxicos. A enzima ribonucleotídeo redutase catalisa a redução de ribonucleotídeos para deoxirribonucleotídeos, sendo essencial para a síntese de DNA. O mecanismo de ação da gemcitabina é justamente a inibição desta enzima, levando a redução do pool de deoxirribonucleotídeos 5'- difosfato, facilitando assim na incorporação do metabólito ativo de trifosfato da gemcitabina pela DNA polimerase, evitando o alongamento da cadeia de DNA. Como consequência, a gemcitabina bloqueia a divisão celular, entre as fases G1 e S do ciclo celular, culminando com a morte celular (102,103).

Na literatura, ainda não foram observadas evidências sobre a capacidade da gemcitabina de induzir morte celular imunogênica, quando utilizada em monoterapia. Quando combinada com outros agentes, no entanto, a gemcitabina parece ser capaz de induzir os DAMPs. Zhao et al., demonstrou que a combinação deste quimioterápico com o PX-478 (inibidor de HIF-1 $\alpha$ ), em linhagem de câncer de pâncreas (CFPAC-1, BxPC-3, Panc-1) desencadeou uma forte resposta imunológica. Resultando na inibição do crescimento tumoral pela indução da morte imunogênica, sendo seu efeito dependente da fosforilação de eIF2 $\alpha$  relacionado com a translocação da CRT na superfície celular, aumento de ATP extracelular e liberação de HMGB1, retardando a progressão tumorigênica (104).

## JUSTIFICATIVA

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer na população mundial, sendo o prognóstico de CPNPC extremamente ruim com uma sobrevida média de menos de um ano.

Em relação ao CPNPC, existem evidências incipientes da capacidade dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de pulmão em relação a indução de morte celular imunogênica. Portanto, estudos sobre esse tema tornam-se extremamente necessários, com o objetivo de gerar evidências e descrever melhor o mecanismo da morte celular imunogênica destes quimioterápicos durante o tratamento do CPNPC, uma vez que os mesmos são utilizados há muito tempo. Além disso, tais investigações tem o potencial de trazer melhores combinações de quimioterápicos no futuro.

O presente estudo poderá auxiliar no desenvolvimento e melhor direcionamento do tratamento quimioterápico, uma vez que se evidencie a melhor combinação de drogas quimioterápicas na indução de morte imunogênica no tratamento do CPNPC.

Portanto, devido a sua extrema letalidade, estudos que busque uma melhor compreensão da relação entre a neoplasia e o sistema imunológico (responsável pela eliminação tumoral), tornam-se extremamente necessários, a fim de auxiliar nos tratamentos atuais utilizados.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Geral

Avaliar se drogas quimioterápicas utilizadas na clínica para o tratamento de CPNPC tanto em monoterapia quanto em combinação induzem morte celular imunogênica na linhagem celular A549 de CPNPC.

### 5.2 Específicos

- Estimar as concentrações ideais dos quimioterápicos para o tratamento da linhagem A549, bem como determinar a taxa de apoptose inicial, tanto de drogas utilizadas em monoterapia (cisplatina, etoposide, carboplatina, paclitaxel, gemcitabina) quanto em combinação (cisplatina+ etoposide, carboplatina+ paclitaxel);
- Analisar os marcadores da morte imunogênica (CRT, ATP, HMGB1).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. In: Advances in experimental medicine and biology [Internet]. 2016. p. 1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667336>
2. World Health Organization. Top 10 causes of death worldwide [Internet]. Fact Sheet. 2017 [cited 2017 Jan 31]. p. 1. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
3. DATASUS. Óbitos p/Residência segundo Região - CID-10 C34 Neoplasia maligna dos brônquios e dos pulmões. Mortalidade Brasil. 2014. p.1.
4. DATASUS. Óbitos p/Residência por Anodo Óbito segundo Capítulo CID-10. C34 Neopl malig dos bronquios e dos pulmoes. 2014. p. 1.
5. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(3):319–26.
6. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8+ T cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2008;113(6):1387–95.
7. Sulpher JA, Owen SP, Hon H, Tobros K, Shepherd FA, Sabri E, et al. Factors influencing a specific pathologic diagnosis of non-small-cell lung carcinoma. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2013;14(3):238–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2012.11.004>
8. American Cancer Society. What Is Non-Small Cell Lung Cancer? [Internet]. *Cancer A-Z.* 2016 [cited 2017 Jan 31]. p. 3. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>
9. National Comprehensive Cancer Network. Lung Cancer - Non-small cell lung cancer [Internet]. 1.2015. National Comprehensive Cancer Network. Washington: NCCN Foundation; 2016. 2000 p. Available from: [www.nccn.org/patients](http://www.nccn.org/patients)
10. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J Thorac Dis* [Internet]. 2013;5(suppl.5):S463–78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3804871/pdf/jtd-05-S5-S463.pdf>
11. Jamnik S, Santoro IL, Borges EL, Uehara C, Silva VV da. Estudo Comparativo de Fatores Prognósticos em Portadores de Carcinoma Não-Pequenas Células de Pulmão : Sobrevida Superior a Cinco Anos e Inferior a Um Ano. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 2009;55(1):5–10. Available from: [http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_55/v01/pdf/03\\_artigo\\_estudo\\_comparativo.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_55/v01/pdf/03_artigo_estudo_comparativo.pdf)
12. van Zandwijk N, Hirsch FR. Chemoprevention strategies for non-small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2002;14(2). Available from:

- [http://journals.lww.com/co-oncology/Fulltext/2002/03000/Chemoprevention\\_strategies\\_for\\_non\\_small\\_cell\\_lung.8.aspx](http://journals.lww.com/co-oncology/Fulltext/2002/03000/Chemoprevention_strategies_for_non_small_cell_lung.8.aspx)
13. Consonni D, De Matteis S, Lubin JH, Wacholder S, Tucker M, Pesatori AC, et al. Lung cancer and occupation in a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*.2010;171(3):323–33.
  14. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* [Internet]. 2007;26(22):3279–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496922>
  15. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2007;1773(8):1263–84.
  16. Nandasena S, Wickremasinghe AR, Sathiakumar N. Indoor air pollution and respiratory health of children in the developing world. *World J Clin Pediatr* [Internet]. 2013;2(2):6–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25254169>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4145638>
  17. Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, de Fraipont F, Lantuejoul S, Frappat V, et al. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J Suppl*. 2003;39:36s–44s.
  18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
  19. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2015;25(January):1–12. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
  20. Ministério da Saúde. Classificação de Tumores Malignos [Internet]. 6<sup>a</sup>. Uicc. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. 254 p. Available from: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/index.asp>
  21. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2007;2(8):706–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a>
  22. McCloud TC, Westcott J, Davis SD, Fleishon H, Gefter WB, Henschke CI, et al. Estadiamento De Carcinoma Broncogênico, carcinoma pulmonar de células não pequenas. *Imagem torácica*. 2005;2(1):729–38.
  23. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2011 Nov 12 [cited 2017 Feb 1];378(9804):1727–40. Available from:

- <http://www.thelancet.com/article/S0140673610621010/fulltext>
24. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 1982 Dec;5(6):649–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7165009>
  25. Nanda RH, Liu Y, Gillespie TW, Mikell JL, Ramalingam SS, Fernandez FG, et al. Stereotactic body radiation therapy versus no treatment for early stage non-small cell lung cancer in medically inoperable elderly patients: A National Cancer Data Base analysis. *Cancer* [Internet]. 2015 Dec 1;121(23):4222–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858816301150>
  26. Tanoue LT, Detterbeck FC. New TNM classification for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2009;9(4):413–23. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Citation&list\\_uids=19374596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Citation&list_uids=19374596)
  27. Gould MK, Donington J, Lynch WR, Mazzone PJ, Midthun DE, Naidich DP, et al. Evaluation of individuals with pulmonary nodules: When is it lung cancer? Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5SUPPL):93–120.
  28. Rotolo F, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Arriagada R. Adjuvant cisplatin-based chemotherapy in nonsmall-cell lung cancer: New insights into the effect on failure type via a multistate approach. *Ann Oncol*. 2014;25(11):2162–6.
  29. Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, et al. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):35–42.
  30. Ng R, Hasan B, Mittmann N, Florescu M, Shepherd F a, Ding K, et al. Economic analysis of NCIC CTG JBR.10: a randomized trial of adjuvant vinorelbine plus cisplatin compared with observation in early stage non-small-cell lung cancer--a report of the Working Group on Economic Analysis, and the Lung Disease Site Group, Natio. *J Clin Oncol*. 2007;25(16):2256–61.
  31. Liang Y, Wakelee HA. Adjuvant chemotherapy of completely resected early stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2013;2(5):403–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367729/>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367729/pdf/tlcr-02-05-403.pdf>
  32. Eberhardt WEE, De Ruyscher D, Weder W, Le Péchoux C, De Leyn P, Hoffmann H. 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2015;26:1573–88. Available from: <http://annonc.oxfordjournals.org/>

33. Ramalingam S, Belani C, Belani CP. Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Oncol.*2008;13(1):5–13.
34. Govindan R, Bogart J, Stinchcombe T, Wang X, Hodgson L, Kratzke R, et al. Randomized Phase II Study of Pemetrexed, Carboplatin, and Thoracic Radiation With or Without Cetuximab in Patients With Locally Advanced Unresectable Non-Small-Cell Lung Cancer: Cancer and Leukemia Group B Trial 30407. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Aug 10;29(23):3120–5. Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747084>
35. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2011 Feb 28;6(1):49–69. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011110-130206>
36. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang Y-W, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015;1856(2):189–210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26297204>
37. Davies M. New modalities of cancer treatment for NSCLC: Focus on immunotherapy. *Cancer Manag Res.*2014;6(1):63–75.
38. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* [Internet]. 2009;16(1):3–11. Available from: <http://www.nature.com/cdd/journal/v16/n1/pdf/cdd2008150a.pdf>
39. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.*2007;13(1):54–61.
40. Aranda F, Bloy N, Pesquet J, Petit B, Chaba K, Sauvat A, et al. Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* [Internet]. 2015;34(23):3053–62. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2014.234>
41. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* [Internet]. 2005;202(12):1691–701. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* [Internet]. 2010;29(4):482–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.356>
43. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rébé C, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol* [Internet]. 2011 Jul;224(3):389–400. Available from:<http://doi.wiley.com/10.1002/path.2866>



44. Garg AD, Krysko D V, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* [Internet]. 2012 Mar 7;31(5):1062–79. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.497>
45. Asano K, Miwa M, Miwa K, Hanayama R, Nagase H, Nagata S, et al. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *J Exp Med* [Internet]. 2004;200(4):459–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2211927&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2013;31(1):51–72. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/233534817\\_Immunogenic\\_Cell\\_Death\\_in\\_Cancer\\_Therapy](https://www.researchgate.net/publication/233534817_Immunogenic_Cell_Death_in_Cancer_Therapy)
47. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* [Internet]. 2014;3(9):e955691. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4292729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* [Internet]. 2009;28(5):578–90. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19165151](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19165151)
49. Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, Kuo ML, Chen CN, Lai DM, et al. Calreticulin expression in neuroblastoma - A novel independent prognostic factor. *Ann Oncol*. 2005;16(2):314–21.
50. Garg AD, Elsen S, Krysko D V., Vandenabeele P, Witte P de, Agostinis P, et al. Resistance to anticancer vaccination effect is controlled by a cancer cell-autonomous phenotype that disrupts immunogenic phagocytic removal. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(29):26841–60. Available from: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=4754&path%5B%5D=12626>
51. Peng RQ, Chen YB, Ding Y, Zhang R, Zhang XSX, Yu XJ, et al. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage III B colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2010;16(19):2428–34.
52. Brandao-Burch A, Key ML, Patel JJ, Arnett TR, Orriss IR. The P2X7 receptor is an important regulator of extracellular ATP levels. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(MAR):1–9.
53. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y PP et al. Autophagy-Dependent Anticancer. 2011;334(December):1573–8.

54. Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014;21(1):79–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3857631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* [Internet]. 2011;30(10):1147–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.500>
56. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* [Internet]. 2010 Oct 22;40(2):280–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510007513>
57. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* [Internet]. 2011 Dec 16;334(6062):1573–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208347>
58. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol*. 2012;13(4):343–51.
59. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. Vol. 40, *Molecular Aspects of Medicine*. 2014. p.1–116.
60. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol*. 2011;33(4):395–401.
61. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz Cet al. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Publ Gr*. 2007;2(2):48–9.
62. Kepp O, Senovilla L, Kroemer G. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. *Oncotarget* [Internet]. 2014;5(14):5190–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25114034>
63. Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2009 Jan;21(1):71–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19125021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19125021)
64. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(5):349–55.
65. Ramanathan S, Jagannathan N. Tumor associated macrophage: A review on the phenotypes, traits and functions. *Iran J Cancer Prev*. 2014;7(1):1–8.
66. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesnierea, van Endert P, et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* [Internet].

- 2007;14(10):1848–50. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17657249>
67. Galanski M. Recent Developments in the Field of Anticancer Platinum Complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.*2006;1(li):285–95.
68. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* [Internet]. 2016;35(46):5931–41. Available from:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2016.104>
69. Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Futur Oncol* [Internet]. 2009;5(1):33–42. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243296>
70. Rapp E, Pater JL, Willan A, Cormier Y, Murray N, Evans WK, et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer--report of a Canadian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 1988 Apr;6(4):633–41. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2833577>
71. Feldman DR, Bosl GJ, Sheinfeld J, Motzer RJ. of Advanced Testicular Cancer quire management from physicians of. *JAMA.*2008;299(6):672–84.
72. Giaccone G. Clinical Perspectives on Platinum Resistance. *Drugs* [Internet]. 2000;59(4):9–17. Available from:<http://dx.doi.org/10.2165/00003495-200059004-00002>
73. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance:Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2010;1806(2):172–82. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.004>
74. Wang K, Lu J, Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord Chem Rev* [Internet]. 1996;151(December 1994):53–88. Available from:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854596901952>
75. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* [Internet]. 2009;1(4):280–91. Available from:  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=b907567d>
76. Sorenson CM, Eastmana. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* [Internet]. 1988;48(23):6703–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3180081>
77. Jin T, Wu H, Wang Y, Peng H. Capsaicin induces immunogenic cell death in human osteosarcoma cells. *Exp Ther Med.*2016;12(2):765–70.
78. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesnierea, Vitale I, Durchschlag M, et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.*2008;15:1499–509.
79. Qu C-P, Sun G-X, Yang S-Q, Tian J, Si J-G, Wang Y-F. Toxicitiesof

- different first-line chemotherapy regimens in the treatment of advanced ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017;96(2):e5797. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201701130-00020>
80. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Sep 3;361(10):947–57. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0810699>
  81. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* [Internet]. 2012;31(15):1869–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.384> <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2011.384>
  82. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2011;71(17):5670–7.
  83. Dieci M V., Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* 2014;25(3):611–8.
  84. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, Demaria S, Helen Barcellos-Hoff M, Formenti SC. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014;3(April):e28518.
  85. You B, Tranchand B, Girard P, Falandry C, Ribba B, Chabaud S, et al. Etoposide pharmacokinetics and survival in patients with small cell lung cancer: a multicentre study. *Lung Cancer* [Internet]. 2008 Nov 10;62(2):261–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011954>
  86. Stein A, Palmer J, Tsai N-C, Al Malki MM, Aldoss I, Ali H, et al. Phase I Trial of Total Marrow and Lymphoid Irradiation Transplant Conditioning in Patients with Relapsed/Refractory Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2017 Feb 1]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087456>
  87. Tabchi S, Blais N, Campeau M-P, Tehfe M. Single-center comparison of multiple chemotherapy regimens for concurrent chemoradiotherapy in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2017 Jan 12;276(2):391–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28083648>
  88. Toffoli G, Corona G, Basso B, Boiocchi M. Pharmacokinetic Optimisation of Treatment with Oral Etoposide. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2004;43(7):441–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15139794>

89. Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* [Internet]. 2007 Jul 8 [cited 2017 Feb 1];252(1):9–18. Available from:<http://www.cancerletters.info/article/S0304383506006227/fulltext>
90. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.*2011;71(14):4821–33.
91. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle.* 2009;8(22):3723–8.
92. Watanabe T, Kuranami M, Inoue K, Masuda N, Aogi K, Ohno S, et al. Comparison of an AC-taxane versus AC-free regimen and paclitaxel versus docetaxel in patients with lymph node-positive breast cancer: Final results of the National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer 02 trial, a randomized comparative phase 3 study. *Cancer* [Internet]. 2017;1–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.30421>
93. Satoi S, Fujii T, Yanagimoto H, Motoi F, Kurata M, Takahara N, et al. Multicenter Phase II Study of Intravenous and Intraperitoneal Paclitaxel With S-1 for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients With Peritoneal Metastasis. *Ann Surg* [Internet]. 2016;XX(X):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982692>
94. Lin H, Chen Y, Shi A, Pandya KJ, Yu R, Yuan Y, et al. Phase 3 Randomized Low-Dose Paclitaxel Chemoradiotherapy Study for Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2016;6(December):260. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00260/full>
95. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, et al. Development of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer after Neoadjuvant Paclitaxel Chemotherapy Development of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer after Neoadjuvant Paclitaxel Chemotherapy 1.2001;7(October):3025–30.
96. Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urminska H, Ryska A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest.* 2008;26(10):1024–31.
97. Michels T, Shurin G V, Naiditch H, Sevko A, Umansky V, Shurin MR. Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. *J Immunotoxicol* [Internet]. 2012;9(3):292–300. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3386478&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
98. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2011;21(9):1628–34. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21897268>

99. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.*2011;29(15):1949–55.
100. Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J ClinOncol.* 2009;27(33):5513–8.
101. Schneider BJ, Kalemkerian GP, Gadgeel SM, Valdivieso M, Hackstock DM, Chen W, et al. Phase II Trial of Dose-dense Pemetrexed, Gemcitabine, and Bevacizumab in Patients With Advanced, Non-Small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2016 Dec 2;5–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525730416303734>
102. Xu H, Faber C, Uchiki T, Racca J, Dealwis C. Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2006;103(11):4028–33. Available from: [papers://ae875177-834e-4ba8-8523-120292c79891/Paper/p6721](http://papers://ae875177-834e-4ba8-8523-120292c79891/Paper/p6721)
103. Plunkett W, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-Difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. *Cancer Res.*1991;51(22):6110–7.
104. Zhao T, Ren H, Jia L, Chen J, Xin W, Yan F, et al. Inhibition of HIF-1 $\alpha$  by PX-478 enhances the anti-tumor effect of gemcitabine by inducing immunogenic cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(4):2250–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4385849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## Original Research

**Corresponding Author:**

Cristiano Feijó Andrade, Federal University of Rio Grande do Sul

PPG –Post Graduation Program in Lung Science – Lung and Airway Laboratory

HPCA – Avenida Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre – RS

CEP 90.035-903, RS, Brazil

Email:cristianofa@gmail.com

### Induction of immunogenic cell death by chemotherapeutics drugs used in non-small cell lung cancer management

José Ignacio Gonzalez Solari<sup>1</sup>; Eduardo Filippi-Chiela<sup>2</sup>; Fábio Klamt<sup>3</sup>; Cristiano Feijó Andrade<sup>1</sup>

1 Post Graduation Program in Lung Science - Lung and Airway Lab – FAMED/UFRGS

2 Post graduation program in Hepatology and Gastroenterology – FAMED/UFRGS

3 Laboratory of Cellular Biochemistry –ICBS/UFRGS

## Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide. It is known that some chemotherapeutic drugs stimulate an efficient antitumor response by inducing a form of apoptosis known as immunogenic death in certain tumor types. This type of cell death is characterized by a series of alterations that occur in the apoptotic process, such as the pre-apoptotic exposure of calreticulin (CRT) on the cell surface, as well as the release of ATP and HMGB1. **Objectives:** To identify whether chemotherapeutic agents commonly used in the clinical practice of non-small cell lung cancer (NSCLC) induce immunogenic cell death (ICD). **Methods:** Monotherapy of cisplatin (40  $\mu$ M and 80  $\mu$ M), etoposide (13.2  $\mu$ M), carboplatin (200  $\mu$ M), paclitaxel (100 nM) and gemcitabine (0,96  $\mu$ M) and combination therapy of cisplatin (40  $\mu$ M) + etoposide (13.2  $\mu$ M); carboplatin (200  $\mu$ M) + paclitaxel (100nM) were used to treat A549 NSCLC cell line, which remained under treatment for 48 hours. After that, the concentration of chemotherapeutic agents needed to induce early apoptosis was measured by means of annexin V and propidium iodide staining by flow cytometry – that is, a concentration that induced apoptosis rates between IC<sub>15</sub> and IC<sub>50</sub>. Once the concentration for each monotherapy and combination therapy was determined, these concentrations were used to treat the cancer cells for another 48 hours. ICD was evaluated by quantifying three damage-associated molecular patterns (DAMPs): the exposure of calreticulin (CRT), release of ATP and High mobility group box 1 protein (HMGB1) and also measured autophagy levels. CRT by quantified by flow cytometry. Released ATP was measured by the bioluminescence assay and HMGB1 was measured by dot blot immunoassay. Autophagy levels were measured by orange acridine (AO) staining of acidic vesicles. The results of all three DAMPs as well as autophagy levels were then compared to the control cells – that is, non-treated A549 NSCLC line cells – and expressed in percentage. All five experiments (early apoptosis, CRT expression, extracellular ATP release, HMGB1 secretion and autophagy levels) were repeated at least three times. The mean of the results and its standard deviation ( $\pm$ SD) were presented. To determine significance, we performed ANOVA (Tukey *pos hoc*). *Ap-value*  $\leq$  0.05 was considered statistically significant. **Results:** The percentages of early apoptotic cells found for each combination therapy were: control:  $4 \pm 1\%$ ; cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M:  $42.1 \pm 8.8\%$ ; *p* = 0.03; carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM:  $20.8 \pm 4.1\%$ ; *p* = 0.541. CRT exposure: control:  $0.002 \pm 0.001 \%$ ; cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M:  $60.7 \pm 1.87 \%$ ; *p* = 0.000; carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM:  $55.4 \pm 4.6\%$ ; *p* < 0.001. ATP levels: control: 100; cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M:  $320.4 \pm 9.4$ ; *p* = 0.013 and carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM:  $299.6 \pm 6.4$ ; *p* = 0.029). HMGB1: control: 1; cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M:  $2.20 \pm 0.10$ ; carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM:  $1.56 \pm 0.25$ . Autophagy: control:  $7 \pm 1\%$ ; cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M:  $55.3 \pm 13\%$ ; *p* = 0.096; carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM:  $61.6 \pm 6\%$ ; *p* = 0.043; etoposide 13.2 $\mu$ M:  $71 \pm 14\%$ ; *p* = 0.012; gemcitabine 0.96 $\mu$ M:  $62 \pm 6\%$ ; *p* = 0.043. **Conclusion:** Common chemotherapeutic drugs used for the treatment of NSCLC have shown the ability to trigger the three main markers of immunogenic death on A549 line cells. Drugs also induced autophagy, which may be related to cell death resistance.

**Keywords:** Non-Small-Cell Lung Carcinoma. Immunogenic cell death, Autophagy.



## Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide<sup>1</sup>. This cancer has two main clinical subgroups: small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC is the most common type, accounting for approximately 85% of all lung cancer cases. Adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma constituting all subtypes of NSCLC<sup>2</sup>. The high mortality of this disease may be attributed to its late diagnosis, resistance to chemotherapy and complications in advanced stages. This disease has poor prognosis with an overall 5-year survival rate of 10 to 15%<sup>2,3</sup>.

Current chemotherapy for lung cancer is not curative and provides limited benefits, with an average survival of less than one year<sup>4</sup>. Even though, we have faced a decade of significant advances in the identification of biomarkers in lung cancer and important progress in immunotherapy<sup>4</sup>. Most recent advances in cancer treatment focus on chemotherapy induced cell death; and that death may take place either through non-immunogenic apoptosis, immunogenic cell death (ICD), and also through autophagy and autophagic cell death, necrosis, cornification, among others<sup>5</sup>.

Recent studies have demonstrated that some chemotherapeutic agents (anthracyclines, oxaliplatin, cisplatin plus pyridoxine) as well as other non-chemotherapeutic treatments ( $\gamma$ -irradiation, hipericin-based photodynamic therapy and high hydrostatic pressure) can induce ICD in cancer cells<sup>6-11</sup>. ICD is characterized by the emission of signals, which are referred to as “damage-associate molecular patterns” (DAMPs), such as the pre-apoptotic exposure of chaperones on cell surface including calreticulin (CRT), post-apoptotic release of protein high mobility group box 1 (HMGB1) and the secretion of adenosine triphosphate (ATP) into the surrounding environment<sup>12-14</sup>.

These three classic markers (CRT, HMGB1, and ATP) bind to cell surface receptors: CD91, toll-like receptor 4 (TLR4, TLR2), and purinergic P2X7 and P2Y2 receptors, respectively, which are present on the surface of dendritic cells (DCs), promoting engulfment of dying cells, presentation of tumor antigens, and production of interleukin-1b (IL-1b), respectively<sup>8,13,15,16</sup>. All these signals are responsible for triggering the elicitation of tumor-targeting immune responses, which are associated with the elimination of residual treatment-resistant cancer cells, as well as the establishment of immunological memory<sup>6,7,17</sup>.

The recruitment of immune cells to the tumor microenvironment and the reactivation of these cells to fight cancer cells have presented promising in lung cancer biology<sup>18</sup>. In this context, the induction of ICD by chemotherapeutic agents may contribute to this process.

The capacity of the chemotherapeutic drugs used in day-by-day clinical management of NSCLC, such as cisplatin, etoposide, carboplatin, paclitaxel and gemcitabine in inducing ICD in NSCLC cell line is poorly understood, in both isolated and combination. In this context, to study the induction of ICD by chemotherapeutic agents is much needed in order to expand current scope of evidence. In this study, we evaluate the induction of ICD by these drugs in A549 lung adenocarcinoma cell line.

## Materials and methods

### Cell line and culture conditions

All experiments were performed using exponential growing A549 cell line of the human lung adenocarcinoma, obtained from NCI-Frederick Cancer DCTD cell line repository. These cells were maintained in a humidified incubator with RPMI 1640 medium supplement with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco/Invitrogen, São Paulo, SP Brazil), added with 2mM-glutamine, 1% of penicillin/streptomycin, and 0.1% of amphotericin B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### Drug treatments

A549 cell lines were seeded in 12-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/mL). After 24 hours of incubation, cells were treated with different concentrations of monotherapy of cisplatin, etoposide, carboplatin, paclitaxel, gemcitabine and also with combination therapy of cisplatin + etoposide; carboplatin + paclitaxel. After that, cells were cultured for 48 hours after overnight adherence. Cisplatin 80µM was used as positive control. The concentration of the chemotherapeutic agents was increased until apoptosis rates reached approximately of IC<sub>15</sub> to IC<sub>50</sub>, as described below. DMSO was used to dilute all chemotherapeutic agents except carboplatin, which was diluted in water. Non-treated cell cultures were used as controls. The chemotherapeutic agents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## Analysis of detection of apoptosis by Flow Cytometry

Apoptosis of A549 cell line induced by each treatment mentioned above was measured after 48 hours of treatment, as well as the basal apoptotic levels of non-treated cells. We also analyzed the apoptosis of cells + DMSO (without any agents) in order to compare the effect of the diluent. The incidence of apoptosis was assessed by measuring membrane redistribution of phosphatidylserine and necrosis was detected by double staining with annexin V-FITC and propidium iodide (PI) detection kit according to the manufacturer's protocol (FITC; BD Biosciences; CA, USA). Flow cytometry (Attune-AB Applied Biosystems) was performed using a single cell gate. The data were analyzed in a FITC/PE dot plot to quantify the percentage of annexin<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>(control), annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> cells (early apoptosis), annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> cells (late apoptosis), annexin<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> cells (necrotic cells).

## Immunogenic cell death evaluation

### Calreticulin expression measurement

A total of  $1 \times 10^4$  cells were plated in a 12 well plate and then treated with the chemotherapeutic agents for 48 hours. The cells were then collected and washed twice with ice cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in ice cold PBS for 5min. They were then submitted to centrifugation (1200rpm, 5min), and washed again in ice cold PBS; cells were then incubated for 30min with primary antibody at room temperature and 4°C. Each sample was diluted in cold blocking buffer (200µL ice cold PBS + 4µL fetal bovine serum + 1µL Anti-CRT antibody, Abcam Cambridge, MA). Followed by washing the cells 2 times with ice cold PBS by centrifugation (1200rpm, 5min) and resuspend in ice cold PBS. Each sample was then analyzed by flow cytometry (Attune-AB Applied Biosystems) to identify cell surface CRT. Isotype-control IgG1 (BD Biosciences; CA, USA); (200µL ice cold PBS + 4µL fetal bovine serum + 1µL isotype-control IgG1) were used as a control.

### ATP release assay

Therefore, we measured release ATP levels in A549 cell line after the exposure to specific cell death inducers. ATP extracellular levels were measured using cell supernatants collected after 48 hours of treatment. Dying tumor cells were separated from viable cells by centrifugation (1200rpm, 5min), and immediately analyzed by using the ADP/ATP ratio assay kit Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

According to the manufacturer's protocol. Briefly, cell numbers were set up as  $1 \times 10^4$  cells/mL for all experiments. After treatment for 48 hours, 10  $\mu$ L of conditioned medium was taken out for ATP assay.

### HMGB1 Measurement

HMGB1 release was measured using the cell supernatants collected after 48 hours of treatment and cleared from dying tumor cells by centrifugation (1200 rpm, 5min), and then immediately analyzed for HMGB1 (Abcam Cambridge, MA) abundance. HMGB1 levels were determined by *dot blot* immunoassay, where serial dilutions of samples (1, 2, 4, and 8  $\mu$ L) were applied to a nitrocellulose membrane and HMGB1 immunoreactivities were determined as described for Western Blot. The assays were performed for each mono and combined therapy and repeated three times. To establish the proportion of HMGB1 release, we divided the levels of HMGB1 by the number of dying cells.

### Autophagy levels –Actinide Orange (AO) assay

Autophagy levels were determined by detecting autophagosome formation. Cells were seeded on 12-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/mL) of incubation and were then treated with chemotherapeutic agents (mono and combined therapy) listed above, and cultured for 48 hours. Cells were trypsinized, collected, and stained for 15min at room temperature with acridine orange (AO), with a final concentration of 2.7mM. AO is a marker of acidic vacuolar organelles that fluoresce green in the whole cell but red in acidic compartments (mainly in late autophagosomes/autolysosomes). To quantify the percentage of AO positive cells and the intensity of the red fluorescence, the AO stained cells were analyzed in flow cytometry (Attune-AB applied biosystems).

## Statistical Analysis

Shapiro-Wilk test was used to test normal distribution of the results of all experiments. Because each experiment was repeated at least three times, results are expressed as means with its respective standard deviation ( $\pm$  SD). The results of the experimental and control groups (that is, untreated A549 line cells) were tested for statistical significance by ANOVA (Tukey *post-hoc*). We used Pearson to test correlation. In all cases, a  $p$ -value  $< 0.05$  was considered significant.

## Results

### Chemotherapeutic agents induce phenotypic changes that exhibit apoptosis and autophagy characteristics in the A549 cell line

Adjuvant chemotherapy with cisplatin-based regimens is standard at all stages of NSCLC. To determine the phenotypic and functional consequences of NSCLC A549 cell line exposure, chemotherapeutic agents widely used in clinical management against solid tumors were used. The following concentrations were shown to induce an apoptosis rate between  $IC_{15}$  and  $IC_{50}$ : cisplatin 80 $\mu$ M, cisplatin 40 $\mu$ M, etoposide 13.2 $\mu$ M, cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M, carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM and gemcitabine 0.96 $\mu$ M by 48 hours. Several cellular phenotypes were induced, depending on the drug. As shown in Figure 1A, there was an increase in the cellular apoptotic phenotype especially for cisplatin, increasing cellular complexity ( $SSC^{high}$ / Side Scatter) and with a decrease in cell size ( $FSC^{low}$ /Forward Scatter) (Figure 1A, red area and 1B). After treatment of the chemotherapeutic agents, a decrease in the percentage of viable A549 cells with relation to the control occurs (Figure 1C).

The toxicity of cisplatin 80 $\mu$ M was too high, so that cells were fragmented and we found an increase in cell debris. Those treatments that did not induce an increase in cells with apoptotic profile, showed an increase in SSC, suggesting autophagy, which can contribute to drug resistance. The fold-increase of FSC and SSC is shown in (Figure 1B). It is important to note that only cisplatin 40 and 80 $\mu$ M reduced, in average, the FSC in relation to control. Etoposide, in turn, induced the strongest effect in FSC and SSC.

### Chemotherapeutic agents induced differential rates of apoptosis in A549 cell line

In order to initially determine the ability of chemotherapy in the induction of ICD, we determined the apoptosis rate in the A549 cell line in response to each treatment. We observed that all mono and combination therapies induced alterations in cell phenotype that resemble apoptosis induction, being the highest the response to cisplatin. These data corroborate the data from FSC and SSC (Figure 1A). Treatments triggered an increase in the apoptosis rate, both early apoptosis (annexin<sup>+</sup>/PI cells)

from 14.4% (Carboplatin 200 $\mu$ M) to 46.5% (Cisplatin 80 $\mu$ M) and late apoptosis (annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> cells) from 5.9% (cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M) to 22% (carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM) as shown in Figure 1D, demonstrating statistically significant for early apoptosis cisplatin 40 and 80 $\mu$ M and cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide 13.2 $\mu$ M with  $*p < 0.05$  and  $***p < 0.001$ , in comparison to control. All treatments induce a transient increase of annexin intensity concomitant to cell shrinkage, followed by a reduction of annexin staining and an even stronger cell shrinkage (Fig. 2A and Supplementary 1). Indeed, among annexin negative cells, there were cells with different FSC intensity, but both populations were in apoptosis stage following the same apoptosis phenotype with transient annexin increase (Figure 2B and 2C).

## Chemotherapeutics induced the translocation of CRT to the plasma membrane of A549 cell line

After 48 hours, all treatments triggered a statistically significant increase in the translocation of CRT on the cell surface, as shown in Figure 3A, ( $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ) in comparison to control. Treated cells with decreased FSC, *i.e.* cells with apoptotic phenotype, showed increased CRT levels (Figure 3B). This finding did not occur in the control, suggesting that physiological cell death (not induced by chemotherapy) does not trigger ICD. All treated cells passed from a viable phenotype (Figure Supplementary 2 - green board) to a phenotype with apoptosis characteristics (Figure Supplementary 2 - blue board). Finally, we found a transient increase in CRT from the phenotype of 'normal' (or viable) cells (Figure Supplementary 2, green area) to a state of initial cell shrinkage (early apoptosis) (Figure Supplementary 2, yellow area). After this, there was an increased in cells fragmentation and increased debris (Figure Supplementary 2, blue area), suggesting late cell death.

## Chemotherapeutic agents increased the release of ATP extracellular and levels of HMGB1 in A549 cell line

For all tested treatments (cisplatin, etoposide, carboplatin, paclitaxel, gemcitabine) alone or combination, we found that the induction of cell death was accompanied by secretion of extracellular ATP in cisplatin 40 $\mu$ M, cisplatin 40 $\mu$ M + etoposide and carboplatin 200 $\mu$ M + paclitaxel 100nM with statistically significant  $*p < 0.05$  (Fig. 3A).

We analyzed the release of the late-stage marker of ICD, HMGB1, in supernatants of A549 cancer cell line. All mono- and combination-therapy demonstrated an increase of HMGB1 secretion when compared to the non-treated control cells, with the exception of Etoposide. Highest levels of release of HMGB1 were found for cisplatin 80 $\mu$ M treatment (Fig. 4A).

## Chemotherapeutic agents induce an increase of autophagy in A549 cell line

Data from FSC x SSC flow cytometry (Figure 1A) strongly suggest that A549 cells increased their intracellular granularity, suggesting autophagy induction. To confirm this, we performed a flow cytometry analysis of AO stained cells, a fluorescent dye that marks the entire cell (cytoplasm and nuclei) in green, but in acidic compartments shine red due to the accumulation of the dye (Figure 5A). The treatments statistically significant with  $*p < 0.05$ , for induction of autophagy were etoposide 13.2 $\mu$ M, carboplatin 200 $\mu$ M+ paclitaxel 100nM and gemcitabine 0.96  $\mu$ M. Corroborating data from SSC and FSC, flow cytometry revealed increased AO intensity in A549 cells exposed to all chemotherapeutics tested (Figure 5B). Interestingly, those treatments that increased apoptosis presented low autophagy, while those treatments that increased autophagy (like etoposide) had low apoptosis, suggesting that autophagy acts as a cytoprotective mechanism in this setting. Finally, cells with increased cellular complexity (high SSC) had increased levels of cell autophagy in relation to cells in early apoptotic cells (gray ratio) and viable cells (blue ratio) as demonstrated; early apoptotic cells had lower levels of autophagy when compared to viable cells (Figure 5C).

## The presence of chemotherapeutic agents have demonstrated a strong correlation between annexin<sup>+</sup> cells, CRT and ATP in A549 cell line

The use of chemotherapeutic agents have demonstrated a strong correlation between percentage of cells with annexin-positive and CRT-positive ( $p = 0.8$ ) and also between percentage of cells with annexin-positive and ATP levels ( $p = 0.7$ ), percentage of cells CRT-positive and ATP levels ( $p = 0.9$ ), as shown in figure 6A. Correlation between cell numbers and cells with annexin-positive ( $p = -0.8$ ) and number of cells and cells with CRT-positive ( $p = -0.9$ ), as shown in Figure 6B.

## Discussion

Conventional anticancer chemotherapy is generally thought to act through killing tumor cells or by irreversibly arresting their growth. Cytotoxic drugs affect cell metabolism, DNA synthesis or DNA integrity, ultimately leading to cell death, mainly through apoptosis. Increasingly, it has been shown that apoptosis is not a homogeneous process, especially with regard to the clearance of death cells and apoptotic bodies<sup>19</sup>. Indeed, the apparent uniformity of the apoptosis may cancel heterogeneous functional aspects of the mechanism, for instance the recognition of death cells by the immune system and the inflammatory response<sup>5</sup>. Clinically, this aspect may strongly affect the development of cancer as well as the response to therapy<sup>20,21</sup>. In the current study, platinum agents (cisplatin and carboplatin), paclitaxel, etoposide, gemcitabine and therapeutically relevant combinations of these drugs (cisplatin+etoposide, carboplatin+ paclitaxel) were assessed to their capacity to induce ICD in A549 human lung adenocarcinoma cells. Although, the drugs used in this study have different mechanisms of action, all of them ultimately lead to DNA damage and cell death. Cells triggered different rates of both early and late apoptosis in response to treatments. All treatments induced typical morphological alterations that resemble to apoptosis, such as cell shrinkage and fragmentation, externalization of phosphatidylserine, detachment from the cell plate, increased SSC and decreased FSC<sup>22,23</sup>.

Data from literature about the capacity of chemotherapeutics to induce ICD in cancer cells are quite heterogeneous and may depend on the cell type, the conditions of treatment (i.e. the concentration of the drug and the duration of the treatment) and, as raised by some results showed here, by technical questions. Oxaliplatin induced ICD in UO2S osteosarcoma cells<sup>24</sup> and colorectal cancer cells<sup>16</sup>. In BLM human melanoma cells and Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells cisplatin increased CRT exposure and the release of ATP and HMGB1<sup>25</sup>. In our study, the combination of chemotherapeutic agents increased this three ICD hallmarks: CRT exposure, ATP secretion and HMGB1 release. Among the drugs tested here, cisplatin had the highest effect on the induction of apoptosis and ICD, reaching a plateau that was not increased even after its combination with etoposide.

We also provided an important information about the profile of CRT externalization along the process of apoptotic cell death. We found that levels of CRT



(as for phosphatidilserine) increased transitorily during cell shrinkage, and then reducing when cells reached their small size. Thus, if assessed when cells already reached the end of apoptosis, authors may find low levels of externalized CRT. This may explain data from the literature, as for CT26 colorectal cancer murine cells, in which cisplatin increased the release of HMGB1 but did not increase the exposure of CRT. However, authors assessed CRT levels in the context of strong late apoptosis induction, so they probably lost the moment of high CRT exposure<sup>16</sup>. The observation that CRT increases transitorily during the apoptotic process is relevant, since the translocation of CRT from the ER to the cell surface is one of the main differences between immunogenic and non-immunogenic death, and a key factor to immunogenic death<sup>7</sup>. At the molecular level, drugs such as oxilaplatin elicits the exposure of CRT through a complex pathway that involves the sequential induction of ER stress response accompanied by PERK-mediated phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , caspase-8-mediated cleavage of the ER protein BAP 31 and, finally, the translocation process. In fact, in U2OS osteosarcoma cells cisplatin failed to stimulate the activation of PERK, as well as the PERK-dependent phosphorylation of eIF2  $\alpha$ , which is a key event for the integrated ER response and the formation of stress granules and autophagosomes<sup>16,24</sup>. In those cells that are resistant to the apoptosis and to the externalization of CRT, the induction of ER the CRT from ER to the plasma membrane, as for U2OS osteosarcoma cells exposed to cisplatin<sup>24</sup> stress restores the capacity of cells to translocate. In our study, as in other cell types, cisplatin was able to induce the externalization of CRT, corroborating that this process depends on the cell model and the profile of treatment. In addition, the externalization of CRT can be mediated by other pathways, but these mechanisms are yet to be understood<sup>26</sup>.

Interestingly, during the analysis of apoptosis and ICD we observed that cells exposed to those treatments that induced low levels of apoptosis had, in parallel, increased SSC (i.e. intracellular granularity). This suggests the induction of autophagy, which has a dual role in cancer: in one hand, it can contribute to suppress cell death; on the other hand, at high levels it can be cytotoxic<sup>27</sup>. Flow cytometry to AO confirmed the induction of high levels of autophagy by several treatments, being etoposide the most pro-autophagic condition. In agreement to this, etoposide induced autophagy and apoptosis in the Hep3B cell line<sup>28</sup>, as paclitaxel induced cytoprotective autophagy in multiple cancer cell lines<sup>29,30</sup>. Gemcitabine can simultaneously induce apoptosis and autophagy in cancer cell line of lung cancer SPC-A1 and A549.

When combination with 3-methyladenine (3-MA), gemcitabine- induced apoptosis was effectively enhanced suggesting that gemcitabine can activate autophagy to impair the chemosensitivity of lung cancer cells<sup>31</sup>. It is important to mention that autophagy is induced in higher extent by treatments that did not induce high levels of early apoptosis. When we looked to the intensity of autophagy in live or dead cells, we found that cells with a viable phenotype or cells with high SSC presented higher levels of autophagy than early apoptotic cells, suggesting that autophagy may contribute to the maintenance of cell homeostasis and cell survival. According to other studies, when combined with 3-MA or cloroquine, enhance the pro-apoptotic effect of cisplatin and attenuated the execution stage of etoposide induced apoptosis in cell lines A549 and U1810 of NSCLC <sup>32</sup>. Corroborating these, the combination of paclitaxel and 3-MA also increased the rate of cell death (26). Whether the cell death induced in these models was ICD, however, is not known.

Actually, the link between autophagy and ICD has recently emerged as a target with clinical potential. Autophagy is essential to the immunogenic release of ATP by dying cells and to the accumulation of extracellular ATP<sup>33</sup>, which acts on purinergic receptors to attract immune effectors to the tumor microenvironment, hence eliciting anticancer immune response that ultimately are mediated by CTL <sup>34</sup>. Similarly, anthracyclines, oxaliplatin and irradiation trigger ATP secretion in response to autophagy <sup>33,35</sup>. Corroborating this data, the suppression of early steps of autophagy (i.e. the autophagosome formation), deeply suppressed the exposure of CRT in the plasma membrane in response to oxaliplatin<sup>36</sup>. This suggests that this positive link may occur early after cell and ER stress. Indeed, ER stress, which is the main mechanism to trigger the externalization of CRT, also increases autophagy<sup>37,38</sup>. In this sense, the induction of autophagy in parallel with immunogenic therapy may increase ICD and, as a consequence, the efficacy of the therapy<sup>27</sup>. On the other hand, the suppression of late steps of autophagy increased CRT exposure<sup>36</sup>. In this case, the cytoprotective role of autophagy in cell homeostasis may be dominant and the disruption of late autophagy may lead to the accumulation of cell trash, increase in oxidative stress and cell death. Clinically, this approach seems to be more effective<sup>39</sup>. Indeed, this is the rationale behind several clinical trials focused on autophagy: the combination of a chemotherapeutic with an inhibitor of late autophagy<sup>40</sup>.

Thus, it is plausible to suggest that cells may integrate several stress signals to define the cell fate, which may directly interfere with the other components of tumor

microenvironment, especially immune cells<sup>41</sup>. The balance between cytoprotective or cytotoxic autophagy and its crosstalk with apoptosis and ICD may be central to define the success of a given therapy. Understanding this process may allow the modulation of this crosstalk in order to increase the therapeutic efficacy.

## Conclusion

In conclusion, we demonstrated that the drugs used for the treatment of NSCLC have the ability to trigger the increase of main markers of immunogenic death. Cisplatin, the first choice treatment for NSCLC, induced the highest levels of ICD markers in A549 cells. Drugs also induced autophagy, which may be related to cell death resistance.

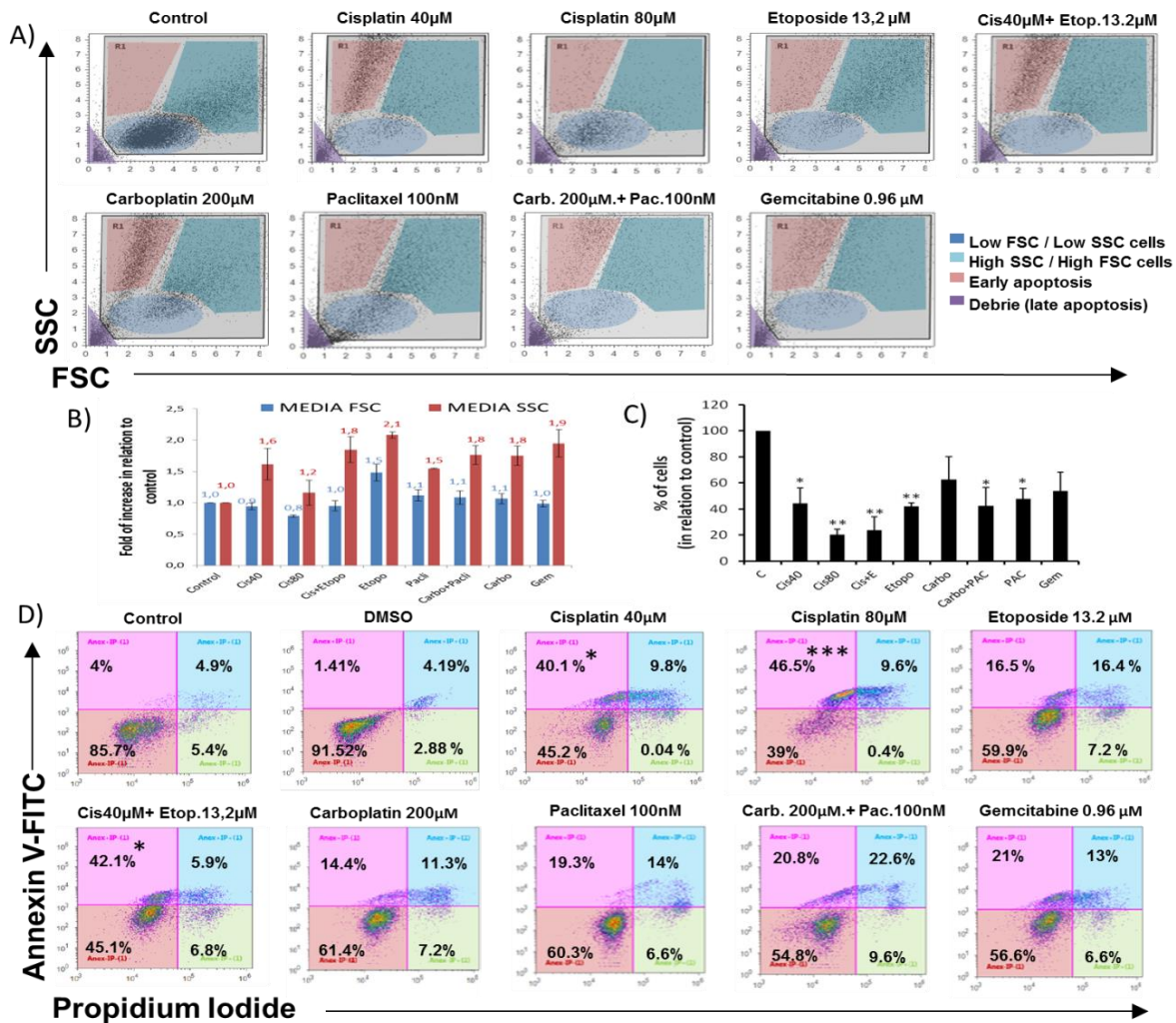
## References

1. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893: 1–19.
2. Sulpher JA, Owen SP, Hon H, et al. Factors influencing a specific pathologic diagnosis of non-small-cell lung carcinoma. *Clin Lung Cancer* 2013; 14: 238–244.
3. Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ. Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137:1191–1198.
4. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; 5: S463–S478.
5. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16:3–11.
6. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; 202: 1691–701.
7. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13:54–61.
8. Aranda F, Bloy N, Pesquet J, et al. Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2015; 34: 3053–3062.

9. Garg AD, Krysko D V., Vandenabeele P, et al. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:215–221.
10. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2014; 3:e28518.
11. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* 2014; 135: 1165–1177.
12. Martins I, Tesniere A, Kepp O, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 2009; 8:3723–3728.
13. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14:1848–50.
14. Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, et al. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr Opin Oncol* 2009; 21: 71–76.
15. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2014; 3:e955691.
16. Tesniere a, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010; 29:482–491.
17. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:51–72.
18. Pol J, Vacchelli E, Aranda F, et al. Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* 2015; 4:e1008866.
19. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008748.
20. Lauber K, Ernst A, Orth M, et al. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front Oncol* 2012; 2: 116.
21. Frey B, Rubner Y, Kulzer L, et al. Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63:29–36.
22. Liu T, Zhang M, Zhang H, et al. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. *Eur J Pharmacol* 2008; 587:78–84.

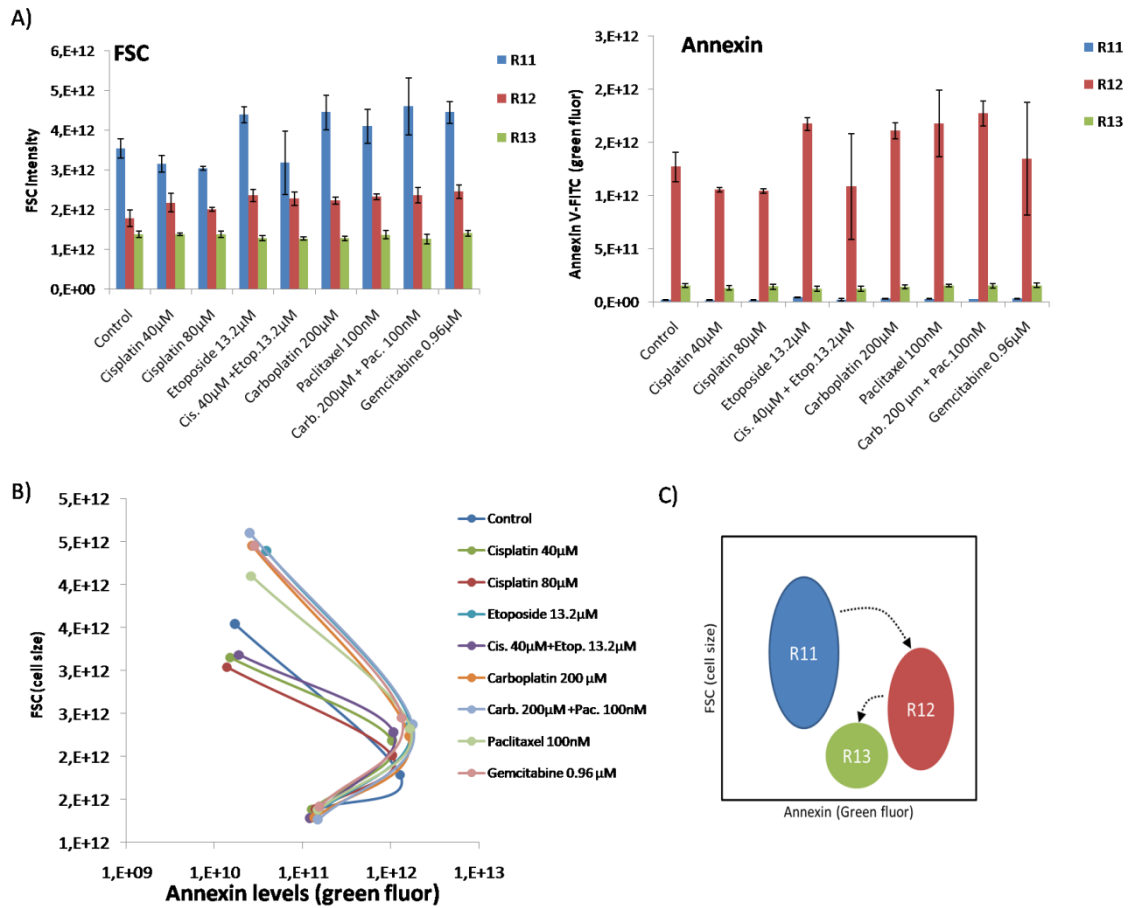
23. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795–808.
24. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 2011; 30:1147–1158.
25. Di Blasio S, Wortel IMN, van Bladel DAG, et al. Human CD1c(+) DCs are critical cellular mediators of immune responses induced by immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1192739.
26. Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, et al. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Front Oncol* 2015; 5: 7.
27. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Demaria S, et al. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 14:247–258.
28. Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, et al. Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol* 2012; 41:1443–1454.
29. Zhang Q, Si S, Schoen S, et al. Suppression of autophagy enhances preferential toxicity of paclitaxel to folliculin-deficient renal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32:99.
30. Liu S, Li X. Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel. *Int J Oncol* 2015; 46:2399–2408.
31. Wu H-M, Shao L-J, Jiang Z-F, et al. Gemcitabine-Induced Autophagy Protects Human Lung Cancer Cells from Apoptotic Death. *Lung* 2016; 194:959–966.
32. Kaminsky VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, et al. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy* 2012; 8:1032–1044.
33. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, et al. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science (80- )*2011; 334:1573–1577.
34. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; 334: 1573–7.

35. Kepp O, Michaud M. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signaling. *Cell Death Differ* 2014. (11): Comment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90:9–10.
36. Li D-D, Xie B, Wu X, et al. Late-stage inhibition of autophagy enhances calreticulin surface exposure. *Oncotarget* 2016; 7:80842–80854.
37. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *NatRevDrug Discov* 2008; 7: 1013–1030.
38. Rashid H, Yadav RK, Kim H, et al. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy* 2015; 11:1956–1977.
39. Li C, Liu Y, Liu H, et al. Impact of autophagy inhibition at different stages on cytotoxic effect of autophagy inducer in glioblastoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35:1303–1316.
40. Sui X, Chen R, Wang Z, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2013; 4: e838.
41. Garg AD, Agostinis P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. *Photochem Photobiol Sci* 2014; 13:474–87.



**Figure 1. Rate of apoptosis of A549 cells treated with chemotherapeutics.**

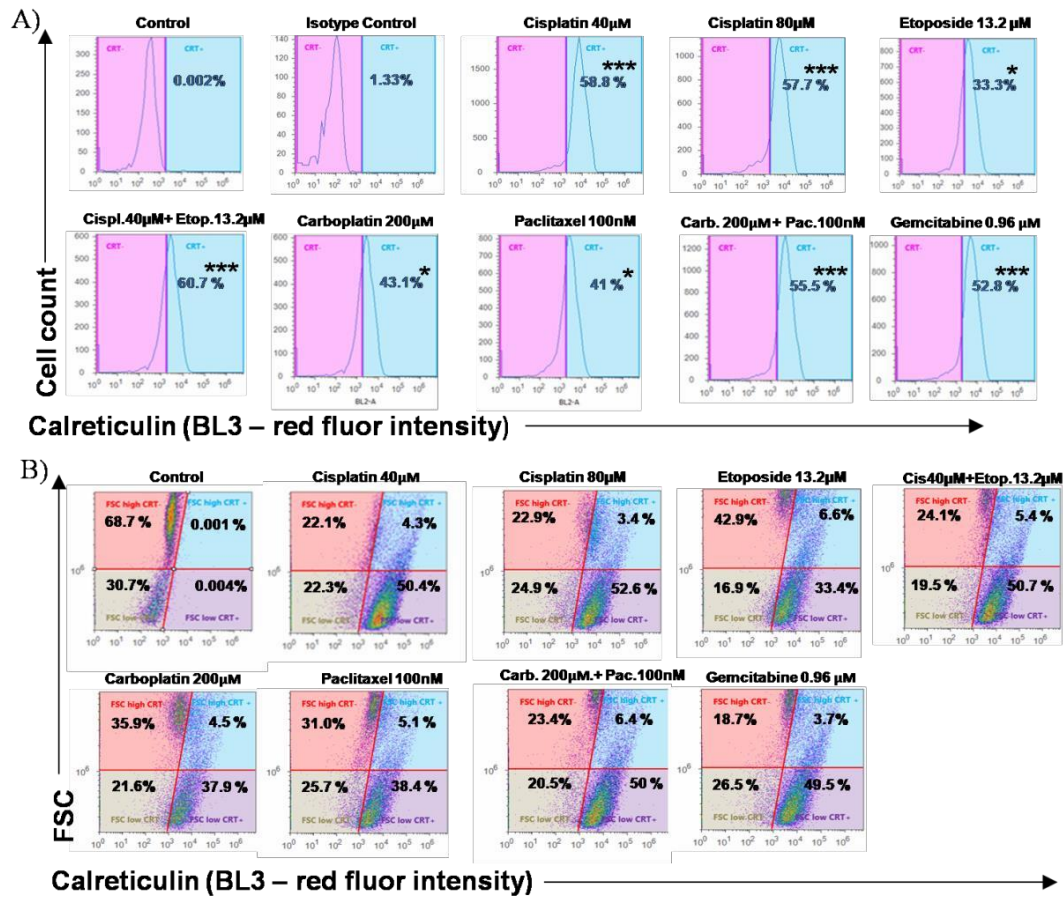
A) Dot plot analysis showing FSC and SSC, after treatment with chemotherapeutic agents in A549 cell line by 48hours. B) Treatment with chemotherapeutic agents increases FSC and SSC in relation to control. C) After treatment the chemotherapeutic agents a decrease in the percentage of A549 cell line with relation to the control. D) The chemotherapeutic agents triggered different rates of apoptosis and necrosis, annex +/IP- cells (early apoptosis- left upper square), annexin+/IP+ cells (late apoptosis-right upper quadrant), left annex -/IP- cells (control – left lower square), annexin-/IP + cells (necrotic cells- right lower square). Data represent mean  $\pm$  SD \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (n=3) compared to untreated cell(control).



**Figure 2. Treatments induce a transient increase of annexin intensity.**

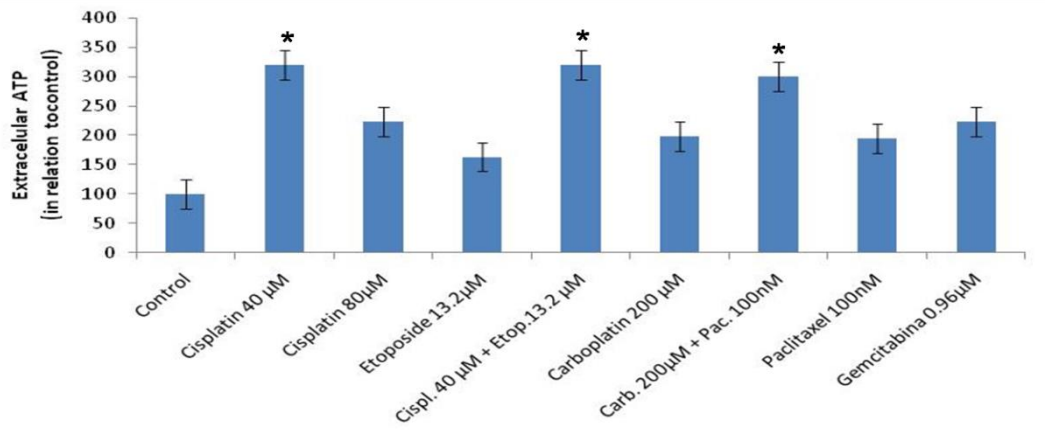
A) Treatments induce a transient increase of annexin intensity concomitant to cell shrinkage, followed by a reduction of annexin staining and an even stronger cell shrinkage. B) and C) Among annexin negative cells, there were cells with different FSC intensity, but both populations were in apoptosis stage following the same apoptosis phenotype with transient annexin increase.



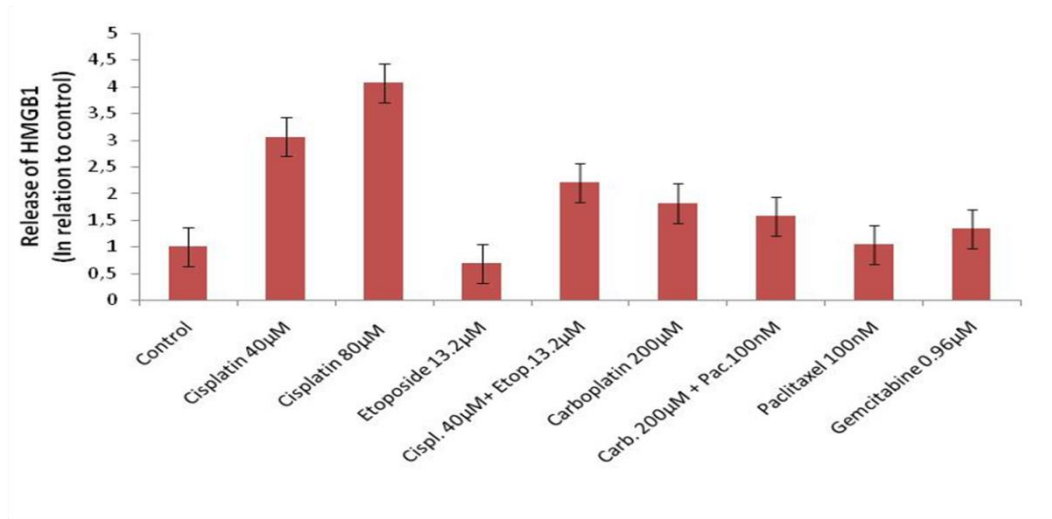


**Figure 3. Chemotherapeutics induced the translocation of CRT to the plasma membrane of A549 cell line.** A) After 48 hours treatment, all treatments triggered an increase in the translocation of CRT on the cell surface and all of them were statistically significant. B) Treated cells with decreased FSC, i.e. cells with apoptotic phenotype, showed increased CRT levels. Data represent mean  $\pm$  SD \* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.001 (n=3) compared to untreated cell (control).

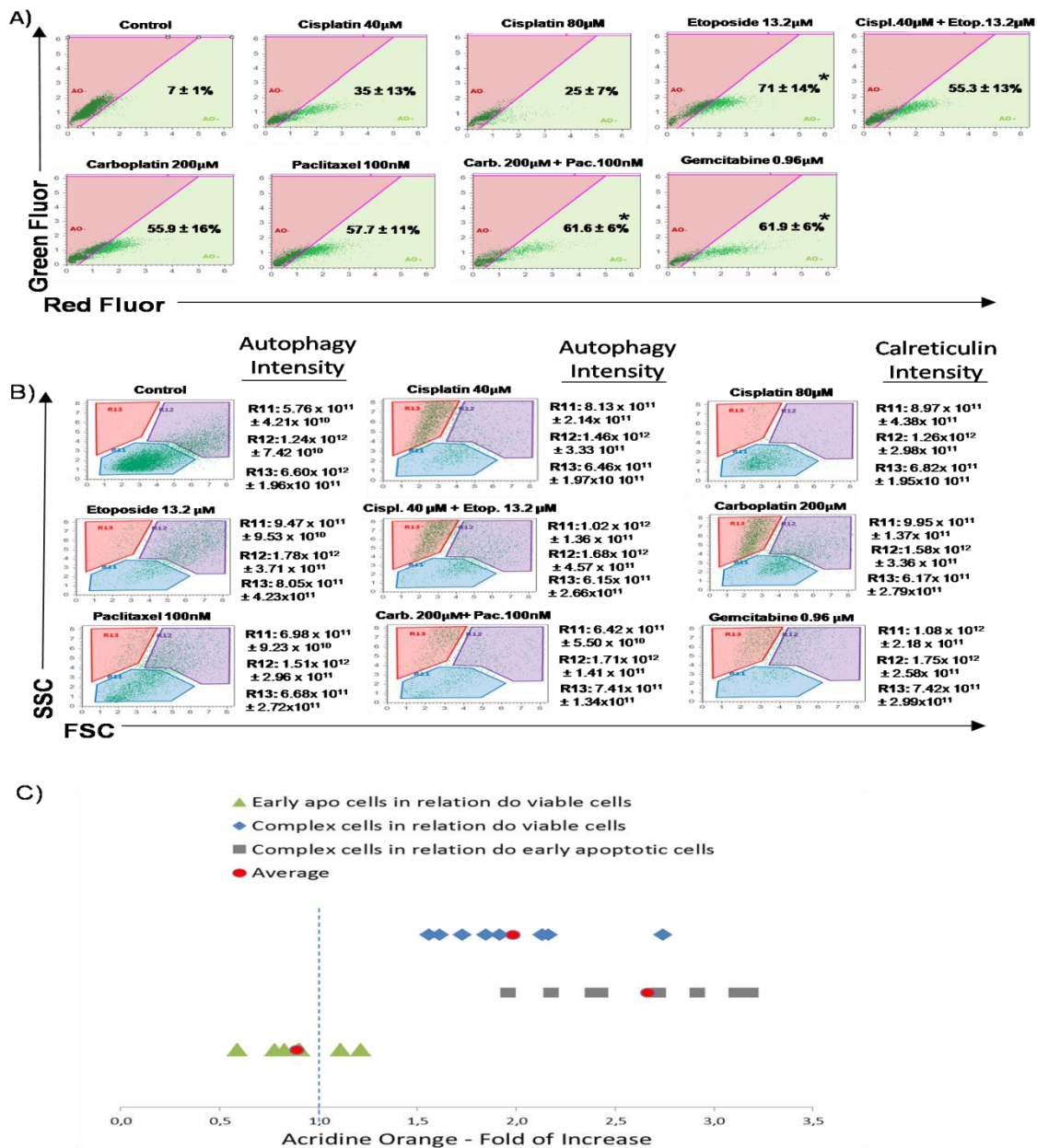
A)



B)

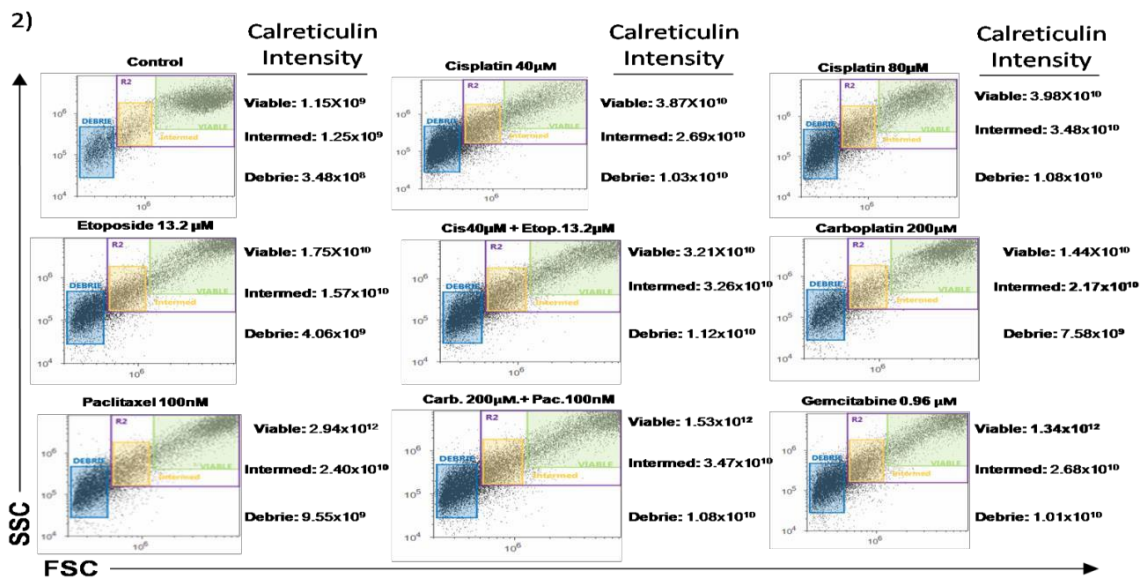
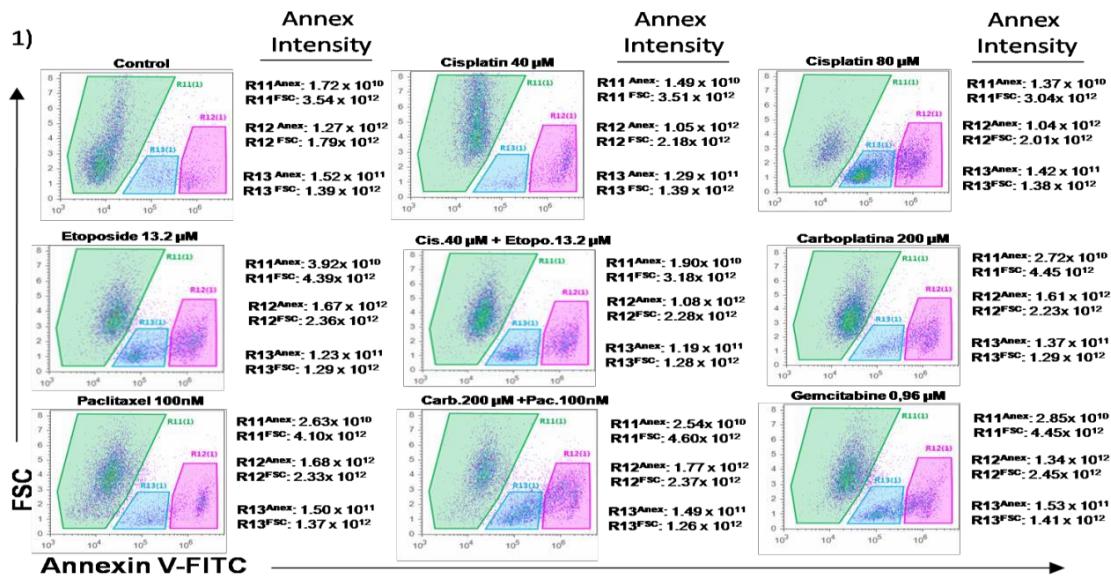


**Figure 4. Chemotherapeutic agents increased the secretion of ATP extracellular and levels of HMGB1 in A549 cell line.** A) The induction of cell death was accompanied by release of ATP levels extracellular by treatment chemotherapeutic agents in A 549 cell line and secretion of HMGB1. B) Data represent mean  $\pm$  SD \* $p < 0.05$  ( $n=3$ ) in comparison to control.



**Figure 5. Chemotherapeutic agents induce an increase of autophagy in A549 cell line.**

A) Dot plots of percentage of autophagy induction detection after treatment with chemotherapeutic agents by 48 hours. B) Dot plot shows SSC and FSC data and autophagy intensity of the chemotherapeutic agents. C) Treatments induced an increased cellular complexity (high SSC) had increased levels of cell autophagy in relation to cells in early apoptotic cells (gray ratio) and viable cells (blue ratio) as demonstrated; early apoptotic cells had lower levels of autophagy when compared to viable cells.



Supplementary Figure 1 and 2.



