

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

Dissertação de Mestrado

**Adaptação e reprogramação metabólica em células de câncer de próstata sob
acidose extracelular induzida**

Augusto Ferreira Weber

Porto Alegre, agosto de 2020

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

**Adaptação e reprogramação metabólica em células de câncer de próstata sob
acidose extracelular induzida**

Augusto Ferreira Weber

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores

Dr^a. Karina Mariante Monteiro

Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, agosto de 2020

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Para resolver um problema desta natureza, o segredo é raciocinar de trás para a frente. É uma proeza da maior utilidade, mas as pessoas não costumam praticá-la.”

Sherlock Holmes, em Um estudo em vermelho, de sir
Arthur Conan Doyle

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luciano e Maristela, pelo apoio ao longo desta nova etapa de minha vida, além do contínuo incentivo na carreira científica e por estarem sempre presentes, mesmo à distância, nos momentos difíceis no decorrer do mestrado. Não poderia deixar de citar a minha irmã, Larissa, pelas conversas e conselhos de cunho pessoal ou profissional.

À minha namorada, Paloma, que novamente esteve comigo nesta nova jornada me dando suporte e me encorajando sempre que necessário. Agradeço sua paciência e seu carinho quando mais precisei, por superar a distância e fazer os finais de semana valerem a pena.

Aos meus orientadores, Henrique Ferreira e Karina Monteiro, por me acolher no grupo de pesquisa e abraçar as ideias de um novo projeto.

Aos professores, Dr. Arnaldo Zaha e Dr. Guido Lenz, pela participação em minha comissão de acompanhamento e pelas sugestões ao longo deste trabalho.

À Danieli, amiga de longa data e companheira de apartamento, pelo companheirismo, apoio e discussões científicas regadas à café e chimarrão. Aos demais amigos de longa data e familiares que continuam me apoiando e incentivando a cada novo projeto.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, pelo convívio, colaborações e discussões científicas, além de nossos *happy hours*. Agradeço especialmente a Cristine, Mariana e a Mayara, pela parceria e recepção ao grupo de pesquisa.

Ao professor Dr. Fábio Klamt, a Camila Dias e a professora Dra. Fátima Guma, do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelo apoio científico e realização de experimentos em seu laboratório.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia da UFRGS, especialmente a Silvia e a Terezinha, pelo auxílio e prestatividade.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma maneira me motivaram, influenciaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Microambiente tumoral.....	13
1.2 Metabolismo tumoral	15
1.3 Acidose tumoral	21
1.4 Terapias anti-metabólicas na progressão tumoral	25
1.5 Justificativas.....	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Cultivo celular e adaptação a acidose extracelular	30
3.2 Ensaio de proliferação celular e cálculo do <i>doubling time</i>	31
3.3 Imunofluorescência.....	31
3.4 Avaliação morfológica e do potencial de membrana mitocondrial	31
3.5 Ensaio de <i>wound healing</i>	32
3.6 Análise de ciclo celular.....	33
3.7 Análise de morte celular	33
3.8 Ensaio de citotoxicidade e sobrevivência com inibidores metabólicos e quimioterápicos.....	33
3.9 Ensaio de viabilidade celular e efeito de inibidores metabólicos	34
3.10 Respirometria de alta resolução	34
3.11 Transcrição reversa associada à PCR quantitativa (RT-qPCR).....	35
3.12 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Adaptação das linhagens de câncer de próstata DU-145 e LNCaP a acidose extracelular induzida.....	38
4.2 Morfologia celular alterada nas células adaptadas ao meio ácido	39
4.3 Migração celular modificada frente a condição estressora	39

4.4	Variação de ciclo celular.....	40
4.5	Variação de morte celular entre as condições e linhagens.....	43
4.6	Estado bioenergético alterado ao cultivo em meio ácido.....	43
4.7	Análise de morfologia e potencial de membrana mitocondrial	45
4.8	Expressão alterada de genes associados a via metabólica glicolítica	48
4.9	Alteração na sensibilidade celular frente a inibidores metabólicos	48
4.10	Alteração na viabilidade celular frente a drogas metabólicas.....	52
4.11	Efeitos da citotoxicidade com quimioterápicos	54
5.	DISCUSSÃO	55
6.	PERSPECTIVAS	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8.	CURRÍCULO VITAE RESUMIDO	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2DG - 2-desoxiglicose;
- 3BrP - 3-bromopiruvato;
- AKT – serino-treonino-quinase 1 (do inglês, *serine/threonine kinase 1*);
- AMPK - proteíno-quinase ativada por AMP (do inglês, *AMP-activated protein kinase*);
- Bax – proteína X associada a Bcl-2 (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*);
- Bcl-2 – Células B de linfoma 2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*);
- BSA – albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*);
- CDDP - cis-diaminodicloroplatina, cisplatina;
- CDK1 - quinase ciclina B-dependente 1;
- CMM - Centro de Microscopia e Microanálise;
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol;
- DCA – dicloroacetato;
- EMT – Transição epitelial-mesenquimal (do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*);
- EROs - Espécies reativas de oxigênio;
- FCCP – carbonil cianeto-p-trifluorometroxifenilhidrazona (do inglês, *carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*);
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*);
- G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase;
- GLUD1 – Glutamato desidrogenase 1;
- GLUT1 – Transportador de glicose 1;
- HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfônico (do inglês, *4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid*);
- HIF1 – Fator induzível por hipóxia 1 (do inglês, *hypoxia-inducible factor 1*);
- HK2 – Hexoquinase 2;
- HRR – Respirometria de alta resolução (do inglês, *High Resolution Respirometry*);
- IC50 - A metade da concentração inibitória máxima;
- LDHA – Lactato desidrogenase;
- MCT4 – Transportador de monocarboxilato 4;
- MEC - Matriz extracelular;
- MFI - Intensidade média de fluorescência;
- MMPs - Metaloproteinases de matriz;
- mTOR - Alvo de rapamicina em mamíferos;

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida;

NHE1 - Trocador Na^+/H^+ 1;

NK cell - células exterminadoras naturais (do inglês, *natural killer*);

OCR – Taxa de consumo de oxigênio (do inglês, *oxygen consumption rate*);

OXPPOS - Fosforilação oxidativa;

PBS - Salina tamponada com fosfato (do inglês, *phosphate-buffered saline*);

PDK - Piruvato quinase desidrogenase;

PDH - Piruvato desidrogenase;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

PFK1 – Fosfofrutoquinase 1;

PGC1 α - peroxissoma ativada por proliferação co-ativadora do receptor gamma 1-Alpha (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*);

pH – Potencial de hidrogênio

pHi - pH intracelular;

pHe - pH extracelular;

PI - Iodeto de propídeo (do inglês, *propidium iodide*);

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase;

PIPES – Ácido 1,4-piperazinedietanosulfônico (do inglês, *1,4-Piperazinediethanesulfonic acid*);

PKM2 – Piruvato quinase M2;

PMM – Potencial de membrana mitocondrial;

PTEN – homólogo de fosfatase e tensina (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*);

QR - Quantificação relativa;

ROX - consumo de oxigênio residual (do inglês, *residual oxygen consumption*);

SCO2 – Proteína de montagem do citocromo-C-oxidase 2;

SFB – Soro fetal bovino;

SRB - Sulforodamina B;

TCA – Ciclo do ácido tricarbóxico;

TIGAR - Regulador de glicólise e apoptose induzível por TP53;

TME – Microambiente tumoral (do inglês, *tumor microenvironment*);

UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

V-ATPases - Bomba de prótons dependentes de ATP.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

1. Introdução

- Figura 1.1. Alterações celulares e arquitetônicas no microambiente tumoral14
- Figura 1.2 As vias metabólicas ativas nas células em proliferação são diretamente controladas por vias de sinalização envolvendo oncogenes e genes supressores de tumores conhecidos17
- Figura 1.3. Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg)18
- Figura 1.4. Modelo que descreve a relação entre os níveis de O₂, as fontes de H⁺ e a ventilação em uma massa tumoral e o microambiente circundante22

3. Materiais e métodos

- Figura 3.1. Representação esquemática do cultivo e adaptação das linhagens celulares de câncer de próstata à acidose extracelular30

4. Resultados

- Figura 4.1. Proliferação de células DU-145 e LNCaP expostas de forma crônica e aguda a acidose extracelular38
- Figura 4.2. Tempo de duplicação das células expostas a acidose extracelular aguda e crônica39
- Figura 4.3. Morfologia celular diferenciada entre as linhagens DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes pHs40
- Figura 4.4. Morfologia celular avaliada por ensaio de imunofluorescência41
- Figura 4.5. Avaliação da migração em células DU-145 e LNCaP pelo ensaio de *wound healing*42
- Figura 4.6. Distribuição do ciclo celular de DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes condições de pH43
- Figura 4.7. Morte celular em células DU-145 e LNCaP cultivadas sob acidose crônica e aguda44
- Figura 4.8. Medidas de consumo de oxigênio mitocondrial pelas células DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes pHs46

Figura 4.9. Distribuição de mitocôndrias em células DU-145 e LNCaP cultivadas em pH 7,4 e sob acidose extracelular	47
Figura 4.10. Potencial de membrana mitocondrial em células DU-145 cultivadas em diferentes pHs	49
Figura 4.11. Expressão de genes envolvidos em rotas metabólicas em células DU-145.....	50
Figura 4.12. Determinação do IC50 para inibidores do metabolismo energético em células DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes condições de pH extracelular	51
Figura 4.13. Efeito de inibidores do metabolismo em células DU-145 cultivadas sob diferentes condições de pH extracelular	52
Figura 4.14. Efeito de inibidores do metabolismo em células LNCaP cultivadas sob diferentes condições de pH extracelular	53
Figura 4.15. Citotoxicidade da cisplatina em células DU-145 e LNCaP cultivadas sob diferentes condições de pH extracelular.....	54

TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR	36
Tabela 2. Valores de IC50 de inibidores metabólicos.....	51

RESUMO

As células malignas podem sofrer reprogramação metabólica para alterar seu metabolismo com base em alterações microambientais com o propósito de melhor adaptar e selecionar células mais agressivas. Estressores extrínsecos, como acidose, disponibilidade de nutrientes e baixos níveis de oxigênio, induzem uma coleção de respostas ao estresse celular que contribuem para o fenótipo metabólico distorcido das células tumorais e influenciam a progressão do tumor. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas celulares e moleculares, em especial o perfil bioenergético das células adaptadas à acidose extracelular induzida. As linhagens celulares de carcinoma prostático DU-145 e LNCaP foram adaptadas à acidose extracelular, o meio de cultura foi suplementado com reagentes tamponantes 25 mM de HEPES e PIPES e o pH ajustado para 7,4 (condição controle) ou 6,8 (condição de acidose). Após o período de adaptação as células foram avaliadas por ensaio celulares e moleculares. As linhagens foram consideradas adaptadas à acidose, pois suas taxas de crescimento coincidiam com as das células em meio padrão (pH 7,4) e diferiam da condição aguda (pH 6,8 agudo), que teve sua taxa reduzida. O cultivo em meio acidificado de forma crônica induziu a alterações morfológicas das células as quais apresentam um aspecto mais mesenquimal do que as expostas ao meio com pH 7,4. Os perfis bioenergéticos das células adaptadas ao meio ácido revelaram um aumento nas variáveis relacionadas ao consumo de oxigênio acoplado à ATP sintase, respiração máxima e capacidade reserva. Observou-se também o aumento da atividade mitocondrial das células de DU-145 expostas a acidose, através do aumento do potencial de membrana mitocondrial. Além disso, ambas as linhagens adaptadas ao meio ácido demonstraram uma sensibilização frente a inibidores metabólicos, diminuindo o IC50, bem como uma redução da viabilidade celular, o qual implica no efetivo direcionamento terapêutico desta categoria de drogas em células com tais fenótipos. Em comparação com células DU-145 cultivadas em meio com pH 7,4, as células adaptadas ao meio ácido apresentaram uma redução na expressão de genes relacionados à glicólise, enquanto as células expostas de forma aguda mostraram um aumento de tais genes. O aumento da sensibilidade aos inibidores metabólicos, sugerindo relação com a via glicolítica e o direcionamento de perfil oxidativo para células adaptadas ao meio ácido demonstram a relação da plasticidade do metabolismo e a reprogramação metabólica, visando o condicionamento de células mais adaptadas frente a condições estressoras do microambiente necessárias para a progressão tumoral.

ABSTRACT

Malignant cells can undergo metabolic reprogramming to alter their metabolism based on microenvironmental changes to better adapt and select cells more aggressive. Extrinsic stressors, such as acidosis, nutrient availability and low oxygen levels, induce a collection of responses to cellular stress that contribute to the distorted metabolic phenotype of tumor cells and influence tumor progression. This study aimed to evaluate cellular and molecular responses, especially the bioenergetic profile of cells adapted to induced extracellular acidosis. The DU-145 and LNCaP prostatic carcinoma cell lines were adapted to extracellular acidosis, the culture medium was supplemented with buffering reagents 25 mM HEPES and PIPES and the pH adjusted to 7.4 (control condition) or 6.8 (acidosis condition). After the adaptation period, the cells were evaluated by cellular and molecular assays. The cell lines were considered adapted to acidosis because their growth rates coincided with those of cells in a standard medium (pH 7.4) and differed from the acute condition (pH 6.8 acute), which had its rate reduced. Cultivation in a chronically acidified medium induced morphological changes in the cells, which have a more mesenchymal appearance than those exposed to the medium with pH 7.4. The bioenergetic profiles of cells adapted to the acidic environment revealed an increase in variables related to oxygen consumption coupled with ATP synthase, maximum respiration and reserve capacity. It was also observed an increase in the mitochondrial activity of DU-145 cells exposed to acidosis, by increasing the potential of the mitochondrial membrane. In addition, both strains adapted to the acid medium demonstrated sensitization to metabolic inhibitors, decreasing the GI50, as well as a reduction in cell viability, which implies the effective therapeutic targeting of this category of drugs in cells with such phenotypes. In comparison with DU-145 cells grown in medium with pH 7.4, cells adapted to the acid medium showed a reduction in the expression of genes related to glycolysis, while cells exposed in an acute way showed an increase in such genes. The increase in sensitivity to metabolic inhibitors, suggesting a relationship with the glycolytic pathway and targeting the oxidative profile to cells adapted to the acidic environment demonstrate the relationship between the plasticity of the metabolism and the metabolic reprogramming, aiming at conditioning cells more adapted to the stressful conditions of the microenvironment necessary for tumor progression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microambiente tumoral

O processo de tumorigênese envolve uma complexa rede de interações e etapas a serem vencidas pelas células diferenciadas, as quais sofrem influências de mutações sucessivas em genes supressores e oncogenes garantindo o seu sucesso proliferativo. Além disso, as células tumorais devem apresentar características essenciais para a sua sobrevivência, como a proliferação desordenada, aprimoramento do metabolismo energético, evasão de resposta imune, promoção de processos de invasão e metástase, entre outros (HANAHAN; WEINBERG, 2011; YUAN et al., 2016).

As células cancerígenas não atuam sozinhas na proliferação e progressão do tumor. O microambiente tumoral (TME, do inglês, *tumor microenvironment*) compreende também células não cancerígenas, abrangendo células estromais como fibroblastos e miofibroblastos, células neuroendócrinas e adiposas, células imunes e inflamatórias, e ainda aspectos não celulares como a formação de redes vasculares sanguíneas e linfáticas e a matriz extracelular (MEC) (Figura 1.1). Este conjunto proporciona interações complexas e dinâmicas garantindo profundas mudanças moleculares, celulares e físicas no tecido em que crescem (WANG et al., 2017; LANGSTEN et al., 2019; LASFAR et al., 2019). Tais interações podem ocorrer de forma direta ou ainda por sinais bioquímicos (DE LOOFF; DE JONG; KRUYT, 2019).

A complexa rede de interações presente no TME entre componentes celulares e não celulares será modulada e regulada conforme o estágio do processo de carcinogênese. Além disso, a interação entre o tumor e o TME ditará a regulação de mecanismos-chave para a sobrevivência e propagação tumoral (HANAHAN; COUSSENS, 2012; MAMAN; WITZ, 2018). Os componentes estromais respondem a interação com as células cancerígenas fornecendo metabólitos intermediários e mediadores inflamatórios (YUAN et al., 2016). Os miofibroblastos, forma ativa de fibroblastos no TME, secretam uma série de fatores, como metaloproteinases da matriz, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais remodelam a matriz do TME, fornecendo um cenário ideal para proliferação e invasão do tumor (DE WEVER et al., 2004; KALLURI; ZEISBERG, 2006; EMON et al., 2018).

De uma forma geral, as interações no ambiente tumoral, principalmente as que envolvem as células cancerígenas e estromais, têm sido relatadas por diversos estudos como um fator-chave na progressão e crescimento tumoral, influenciando na

sobrevivência, invasividade e nos processos mediadores da metástase, sem contar na resposta a terapias anti-tumorais. (JOYCE; POLLARD, 2009; QUAIL; JOYCE, 2013; CHEN et al., 2015; TURLEY; CREMASCO; ASTARITA, 2015; YUAN et al., 2016). As propriedades dinâmicas que permeiam o microambiente tumoral podem também orientar estímulos permissivos ou inibitórios à progressão do tumor, os quais estão relacionados a atividade de citocinas anti e pró-inflamatórias produzidas por componentes celulares específicos dentro deste ambiente complexo (DE LOOFF; DE JONG; KRUYT, 2019).

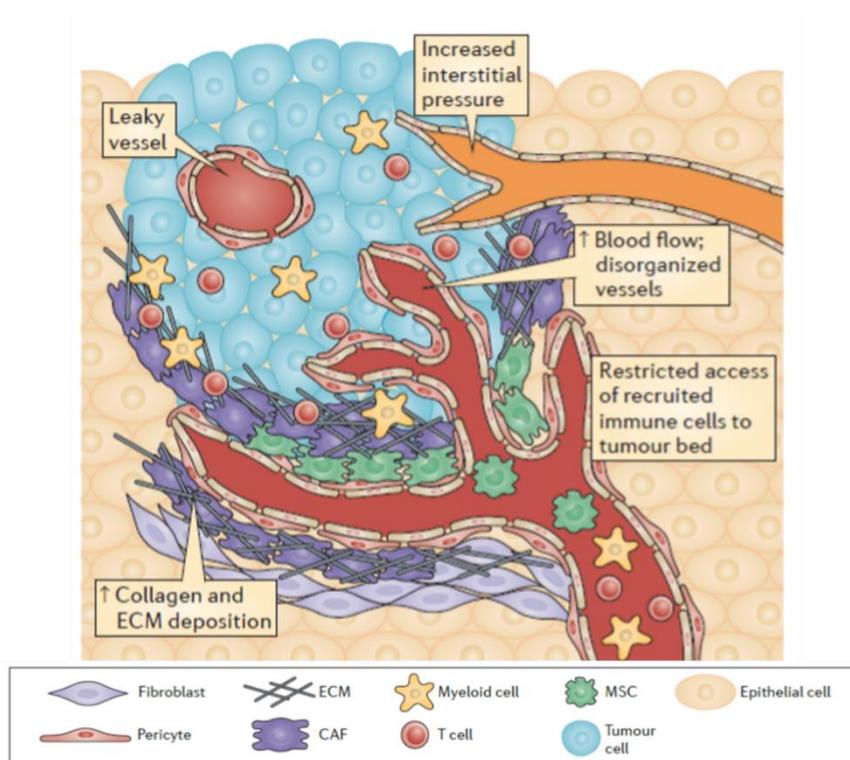


Figura 1.1. Alterações celulares e arquitetônicas no microambiente tumoral. Adaptado de TURLEY; CREMASCO; ASTARITA (2015).

Ressalta-se ainda as características não celulares presentes no TME, consistindo em pressão mecânica e alteração da MEC já mencionadas, bem como condições físico-químicas que são fatores causais importantes na modulação dos processos tumorigênicos, sendo elas a hipóxia e a acidose (QUAIL; JOYCE, 2013). Além dos efeitos na proliferação e malignidade regulados pela variabilidade de mutações genéticas, tais características mencionadas podem ser observadas em quase todos os tumores sólidos, inclusive variando regionalmente dentro de um mesmo tecido tumoral (GATENBY; GILLIES, 2008; TURLEY; CREMASCO; ASTARITA, 2015). Como resposta ao

aumento da taxa de proliferação celular, o microambiente é modificado a fim de melhor se adaptar ao estado neoplásico (SHIEH, 2011).

À medida que a massa tumoral cresce, são formadas regiões hipóxicas compreendendo zonas próximas ao limite de difusão de oxigênio (GATENBY; GILLIES, 2004). Isto ocorre porque a vasculatura tumoral se apresenta de forma imatura e caótica, não conseguindo suprir a difusão de gases e manter a homeostase no local, ocasionando também aumento da pressão intersticial e drenagem inadequada pelos vasos linfáticos (DEWHIRST; CAO; MOELLER, 2008; TURLEY; CREMASCO; ASTARITA, 2015).

As características físico-químicas adquiridas pelo microambiente tumoral, juntamente com outras forças de seleção evolutiva, atuam como cenários adaptativos que governam o crescimento e a evolução do tecido tumoral. As células tumorais passaram por processos adaptativos frente a forças seletivas, correspondentes a barreiras contra a proliferação celular. Este conceito de barreiras microambientais à proliferação é bem descrito na literatura como proposta de modelo para a carcinogênese e recentemente descrita a relação destas barreiras com as forças seletivas (GATENBY; GILLIES, 2008; GILLIES; VERDUZCO; GATENBY, 2012; MERIC-BERNSTAM; MILLS, 2012).

Estas adaptações perante as barreiras de crescimento devem seguir o princípio fundamental da dinâmica darwiniana, segundo o qual haverá evolução de células em que forças de seleção aumentam sua aptidão frente às pressões seletivas (GATENBY; GILLIES, 2008). Ao se depararem com barreiras que poderiam prejudicar o seu crescimento, como a ausência de fatores de crescimento, a falta de oxigênio e até mesmo a falta de substratos, as células tumorais encontram saídas autossuficientes contra a morte celular (GARCIA; NOVELLI; WRIGHT, 2000). Diante disso, haverá a seleção de fenótipos clonais mais bem adaptados que conduzem a informação evolutiva até as próximas forças de seleção.

1.2 Metabolismo tumoral

As células cancerígenas sofrem adaptações em processos celulares e moleculares a fim de garantir uma vantagem seletiva durante a tumorigênese. Quando comparadas as células normais, as células tumorais apresentam alterações das atividades metabólicas que melhoram a aptidão celular e conseqüentemente influenciam as propriedades malignas, já que estas células podem sobreviver a condições estressoras, reprogramando seu metabolismo para suprir as novas demandas energéticas e produção de novas células

indispensáveis para a proliferação desordenada (DE BERARDINIS; CHANDEL, 2016; LIBERTI; LOCASALE, 2016; DANHIER et al., 2017; ZHU; THOMPSON, 2019). O conceito de metabolismo reprogramado já é descrito, devido suas implicações, como uma característica do câncer (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Quando falamos em reprogramação metabólica, faz-se menção a alterações de vias metabólicas tradicionais que podem estar sendo suprimidas ou ativadas em maior grau. Estas modificações reguladas por fatores intrínsecos e extrínsecos concedem às células cancerígenas suporte para lidar com as três necessidades básicas de células em divisão. Proporcionam a absorção de nutrientes limitados e maximizam a geração rápida de ATP, alterando a bioenergética, geram precursores anabólicos de macromoléculas para sustentar a proliferação através do ganho do processo de biossíntese e por fim, reforçam os sistemas que promovem a homeostase redox frente aos estresses gerados pela alta proliferação e condições do microambiente (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; DE BERARDINIS; CHANDEL, 2016).

Nas células cancerígenas foi observada uma alta captação de glicose e taxas de glicólise aumentada para atender às altas demandas de ATP dessas células. Em situações de privação deste recurso as células se adaptam utilizando substratos de outras vias, como pelo metabolismo de glutamina e via das pentoses-fosfato, seja como fonte de energia ou ainda em momentos de poucos nutrientes. Estes recursos advindos de outras vias são utilizados para as vias biossintéticas e captação de cofatores que regulam o efeito redox (ROMERO-GARCIA et al., 2011; SCHULZE; HARRIS, 2012; WARD; THOMPSON, 2012).

Esta alteração nos mecanismos metabólicos é conduzida de forma direta por mutações oncogênicas, as quais ativam oncogenes ou inativam genes supressores de tumores, principalmente em vias de sinalização intracelular, e ainda há mutações em enzimas glicolíticas (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; YUAN et al., 2016). Porém, condições estressoras microambientais, como hipóxia, acidose e baixas concentrações de glicose contribuem indiretamente para a determinação do fenótipo metabólico das células tumorais (ROMERO-GARCIA et al., 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Além disso, o próprio metabolismo reprogramado pode modular o TME, promovendo novas pressões seletivas sobre as células cancerígenas e contribuindo para o surgimento de formas mais agressivas da doença, as quais podem evoluir para condições de resistência e metástase a sítios distantes (JUSTUS; SANDERLIN; YANG, 2015).

A via que envolve fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) juntamente com os genes a jusante, como *AKT* e o alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), conhecida como via PI3K/AKT/mTOR, regula o metabolismo celular. Quando ativada, esta via de sinalização promove um robusto programa anabólico envolvendo aumento do fluxo glicolítico através da ativação de hipóxia fator indutível-1 (*HIF-1*), além de alterar a jusante diversos genes glicolíticos e fatores de transcrição que aumentam a atividade de transportadores e enzimas metabólicas, modulando a capacidade de captação energética das células tumorais (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; HOXHAIJ; MANNING, 2020) (Figura 1.2).

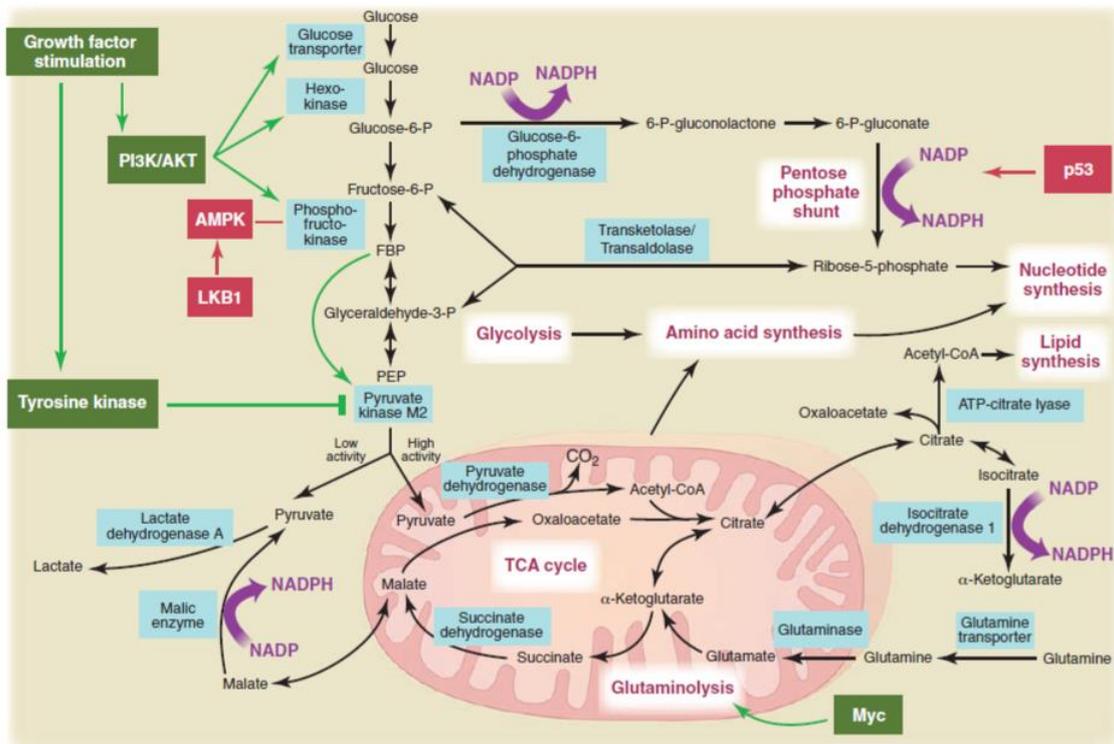


Figura 1.2. As vias metabólicas ativas nas células em proliferação são diretamente controladas por vias de sinalização envolvendo oncogenes e genes supressores de tumores conhecidos (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Fatores extrínsecos podem alterar os níveis de sinalização da via PI3K/AKT/mTOR. Este processo é estritamente regulado em células normais somente ativando a via na presença de fatores de crescimento, ao passo em que células cancerígenas evoluíram para realizar a ativação com dependência mínima da estimulação extrínseca por fatores de crescimento (YUAN; CANTLEY, 2008). A expressão de genes supressores tumorais, como p53, também podem regular o metabolismo celular, em especial através da inibição da via de sinalização por intermédio de PTEN ou ainda

estimulando a ação de fatores de transcrição, alterando a utilização da glicose (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

Oncogenes potentes como *c-Myc*, *HIF1 α* , *Ras* e *Akt* são importantes promotores de alterações metabólicas do câncer. O aumento de expressão destes genes estimula a expressão de genes glicolíticos, onde *HIF1* e *MYC* estão diretamente relacionados com a via da glicólise, pois participam da ativação de vários transportadores de glicose e enzimas glicolíticas como transportador de glicose 1 (GLUT1), hexoquinase (HK2), lactato desidrogenase A (LDHA) e o transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). Além disso, o gene *MYC* pode promover a expressão gênica mitocondrial e biogênese mitocondrial (LI et al., 2005). A sinalização AKT também atua na promoção de genes glicolíticos, suficiente para impulsionar a produção de glicólise e lactato, induzindo a glicólise aeróbica (efeito Warburg) e aumentando a biossíntese de macromoléculas (BUZZAI et al., 2005).

O fenótipo metabólico tumoral característico é dotado de adaptações frente as condições do ambiente. A alteração metabólica mais bem documentada é o efeito Warburg, no qual as células cancerígenas modulam seu metabolismo predominantemente oxidativo para a glicólise e produção de lactato mesmo na presença de oxigênio. Esta modificação do metabolismo é também evidenciada em células normais, mas neste caso só haverá a alteração para a glicólise quando o ambiente for privado de oxigênio, configurando a glicólise anaeróbica (KALYANARAMAN, 2017) (Figura 1.3).

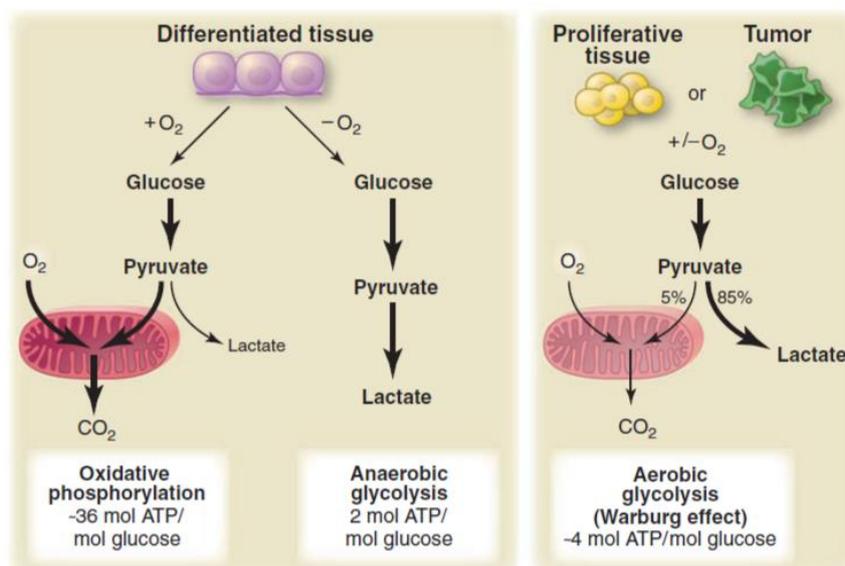


Figura 1.3. Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg). (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Diferentemente destas células normais, as células tumorais metabolizam glicose em lactato em vez de metabolizá-la na mitocôndria através da fosforilação oxidativa (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Este cenário foi evidenciado por Otto Warburg em 1920 a partir de observações com células tumorais ascíticas. Essa alteração metabólica proporciona vantagens no crescimento e migração destas células (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011).

Inicialmente, Warburg imaginou que esta modificação metabólica ocorria devido uma função mitocondrial danificada, fazendo-se necessário alternar a forma de obtenção energética (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011). Mas hoje sabe-se que o aumento do fluxo de glicólise está relacionado a obtenção de intermediários glicolíticos, os quais fornecem vias subsidiárias para atender às demandas metabólicas das células em proliferação, em especial as vias anabólicas (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011). Ou seja, a rota metabólica adotada pelas células cancerígenas fornece uma vantagem biossintética, a qual é sustentada pela alto fluxo de substrato oferecido pela glicólise, permitindo o desvio do carbono para as principais rotas biossintéticas subsidiárias (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

A desvantagem evidenciada inicialmente pela reprogramação ocorre devido a uma menor eficiência quanto ao ATP gerado por unidade de glicose consumida através da via glicolítica. Enquanto que a via alterada nas células tumorais produz somente 4 ATPs ao final do processo, a oxidação completa produz 38 ATPs por glicose (GATENBY; GILLIES, 2004). No entanto, a via alterada nas células tumorais apresenta uma maior captação de glicose, que culmina em um fornecimento energético, através da produção de lactato, mais rápido que na via convencional (LIBERTI; LOCASALE, 2016; PEPPICELLI et al., 2017a).

Os efeitos da reprogramação metabólica não estão exclusivamente atrelados ao efeito Warburg, a modulação na forma de obter energia também irá refletir nos aspectos biossintéticos das células tumorais. Devido à grande atividade proliferativa, as células cancerígenas devem aumentar as demandas anabólicas, logo necessitam gerar grandes quantidades de precursores para a biossíntese de macromoléculas (PAVLOVA; THOMPSON, 2016; DANHIER et al., 2017). A glicose e a glutamina serão os dois nutrientes principais, disponibilizando um pool de diversos intermediários de carbono, os quais serão utilizados como blocos de construção de novas células filhas (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Os processos moleculares que medeiam a transformação dos nutrientes em precursores podem ser regulados por sinalização de fatores de crescimento que regulam a atividade de enzimas glicolíticas, as quais modulam o fluxo de carbono na via da glicólise (DANHIER et al., 2017). Ainda, a glicose é utilizada para a biossíntese de ácidos graxos, enquanto a glutaminólise é regulada positivamente para satisfazer a regeneração de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), ao passo que os carbonos vindo deste aminoácido reabastecem o ciclo de Krebs, também para a sintetizar novas macromoléculas (ROMERO-GARCIA et al., 2011).

Além de proporcionar o acúmulo de biomassa em consequência aos processos anabólicos, as modificações encontradas nas células tumorais também promovem a homeostase das espécies reativas de oxigênio (EROs). O microambiente tumoral e os efeitos oncogênicos geram as EROs devido as diversas modificações que as células sofrem como, por exemplo, a proliferação excessiva, ao mesmo tempo em que as células recorrem a agentes antioxidantes para evitar a toxicidade letal das células (DE BERARDINIS; CHANDEL, 2016). Além de atuar na biossíntese, a NADPH também funciona como um antioxidante crucial, extinguindo as EROs produzidas durante a rápida proliferação, através da redução de moléculas oxidantes propriamente ditas (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

Uma característica importante das células cancerígenas junto ao TME é a flexibilidade ou plasticidade metabólica (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2015). O tipo de fenótipo metabólico adotado pelas células cancerígenas pode ser ditado pelas condições em que estas células se encontram no TME ou de acordo com os estímulos específicos que sofrem com o decorrer da tumorigênese (DANHIER et al., 2017). Geralmente apresentam o efeito Warburg apoiando o crescimento celular na presença de oxigênio e glicose, ao passo que a fosforilação oxidativa conduzido pela acidose láctica direciona as células, especialmente fibroblastos associados a tumor, a uma condição de resistência e sucesso em progressão e metástase (PEPPICELLI et al., 2017a).

A questão de heterogeneidade do tumor também configura um fator induzível para a plasticidade metabólica e esta resposta é mútua, regiões mais hipóxicas ou mais vascularizada irão responder de forma diferenciada quanto a opção metabólica vantajosa (SEMENZA, 2008; DANHIER et al., 2017). Além disso, a heterogeneidade metabólica pode estar relacionada às características do tecido de origem, logo o tipo de tumor apresenta preferências, inclusive difere conforme seu potencial metastático. Ainda, no tumor primário é possível observar que componentes do próprio microambiente tumoral

como oxigênio, pH, glicose e outros metabólitos contribuem para esta flexibilidade metabólica (ELIA et al., 2016; LEHÚEDE et al., 2016).

A plasticidade das células tumorais representa também uma vantagem que conduz a um cenário favorável durante a metástase (LEHÚEDE et al., 2016). As células que conseguem migrar e invadir outros tecidos também utilizam a condição de plasticidade para alterar a via de obtenção energética, apropriada à etapa no processo metastático. Durante a metástase, a respiração mitocondrial diminui em estados iniciais de migração e desprendimento celular enquanto o consumo a partir desta via aumenta para promover a migração efetiva e invasão a sítios distantes (SCHAFER et al., 2009; PORPORATO et al., 2014).

1.3 Acidose tumoral

O resultado do remodelamento metabólico que ocorre nas células tumorais para manter o estado proliferativo resulta na produção aumentada de lactato e íons H^+ . Sendo assim, a alta demanda metabólica das células cancerígenas leva ao acúmulo de íons H^+ no ambiente intracelular (WHITE; GRILLO-HILL; BARBER, 2017). Estas células conduzem o excesso de prótons para a MEC através de mecanismos de transporte. Devido, a uma vasculatura tumoral desorganizada, a extrusão dos íons H^+ liberados no meio extracelular é deficiente. Portanto, o microambiente será acidificado, caracterizando a acidose tumoral (JUSTUS; DONG; YANG, 2013; KOLTAI, 2016; CORBET; FERON, 2017) (Figura 1.4).

Outra fonte que contribui para o efluxo de íons H^+ é a hidratação do CO_2 produzido nas áreas tumorais mais oxidativas, através da via das pentoses-fosfato o processamento em H^+ e HCO_3^- pela atividade catalítica de anidrases carbônicas, que detém domínios catalíticos que aceleram esta hidratação (WEBB et al., 2011; KATO et al., 2013; KOLTAI, 2016; CORBET; FERON, 2017). KATO et al. (2013) mencionam a associação de alterações no microambiente contribuindo para condições de hipóxia e acidose, as quais podem se originar e atuar por processos independentes.

Devido à presença excessiva de íons H^+ , as células cancerígenas precisam se adaptar para manter a homeostase do pH. Estas células manifestam uma característica de gradiente de pH que é devidamente controlado para manter o equilíbrio e permitir a sobrevivência celular, pois o excesso de pH intracelular pode ser fatal (WEBB et al., 2011; KOLTAI, 2016). Apesar deste desfecho, as células tumorais se adaptam a essa

acidez intracelular excessiva aumentando o número e a função de mecanismos exportadores de prótons. Dessa forma, um gradiente de pH é rapidamente estabelecido com um interior normal ou levemente alcalino e um exterior ácido (SONG; GRIFFIN; PARK, 2007; CHEN et al., 2008).

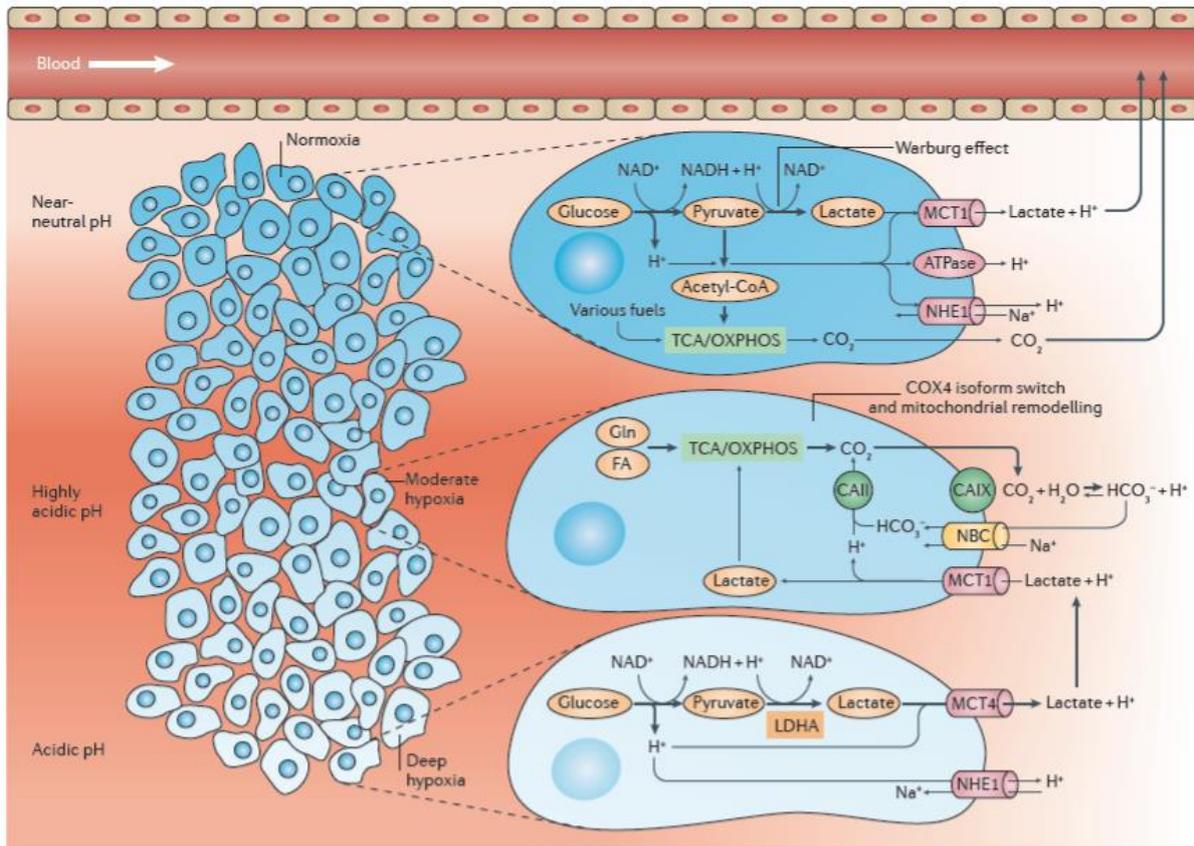


Figura 1.4. Representação esquemática da relação entre os níveis de O_2 , as fontes e o fluxo de H^+ em uma massa tumoral e o microambiente circundante (CORBET; FERON, 2017).

Nas células cancerígenas, em comparação com as células adultas normais, há um aumento do pH intracelular (pHi), geralmente algo próximo de 7,2, enquanto o pH extracelular (pHe) está diminuído, variando de 6,7-7,0 e diferindo do pH 7,4 normalmente observado neste espaço. A desregulação gerada pela condição metabólica tumoral é contornada pelas células buscando a homeostase, a qual é favorável para várias adaptações fenotípicas que mantêm o pHi numa gama ótima e ao mesmo tempo, determinam o comportamento das células tumorais em seu ambiente extracelular ácido (CORBET; FERON, 2017; WHITE; GRILLO-HILL; BARBER, 2017).

A fim de manter o equilíbrio de pH, tanto intra quanto extracelular, as células fazem uso de mecanismos complexos e especializados para exportar H^+ e manter o pH_i em níveis aceitáveis para a sobrevivência (PILLAI et al., 2019). Em resposta a sinais citoplasmáticos, as células irão regular bombas de próton de membrana e outros transportadores que realizam a retirada de metabólitos ácidos, como o íon H^+ (KOLTAI, 2016). Logo, a regulação para aumentar o pH_i se deve ao aumento de expressão e atividade destes componentes extrusores, sendo eles o trocador de Na^+/H^+ 1 (NHE1), os transportadores de HCO_3^- (Na^+/HCO_3^- co-transportadores - NBCs), as bombas de prótons dependentes de ATP (V-ATPases) e os transportadores de monocarboxilatos ligados a prótons (MCT1 e MCT4), ou seja, famílias de transportadores que agem de forma direta ou indireta no condicionamento de componentes que tornam o pH_i baixo (PARKS; CHICHE; POUYSSÉGUR, 2013) (ver Figura 1.4).

Alguns destes transportadores recém citados irão responder a estímulos ambientais, como a hipóxia, a qual proporciona a expressão de *HIF1*, que leva a super expressão de MCT4, o qual está envolvido na extrusão de lactato/ H^+ para fora da célula (DRAOUI; FERON, 2011; PARKS; CHICHE; POUYSSÉGUR, 2013). Enquanto isso, outros transportadores podem atuar independente do estado de oxigenação, este são os co-transportadores NBCs, fornecendo bicarbonato para titular o excesso de íons H^+ intracelulares (HULIKOVA et al., 2013).

A modulação do pH dentro e fora das células frente a respostas metabólicas e necessidade adaptativa de sobrevivência conduz a alterações de processos celulares importantes, levando a fenótipos que são particularmente adequados para a sobrevivência e crescimento em um ambiente ácido. A homeostase do pH no microambiente configura um cenário favorável a progressão tumoral devido ao aprimoramento de alguns processos, como a proliferação celular, evasão de apoptose (LAGADIC-GOSSMANN; HUC; LECUREUR, 2004; WEBB et al., 2011), processos envolvidos com a metástase, como a migração e invasão (MOELLERING et al., 2008; ESTRELLA et al., 2013), além de afetar o escape imunológico e a respostas a drogas quimioterápicas (KATO et al., 2013; PILON-THOMAS et al., 2016).

A proliferação e a sobrevivência celular também dependem do nível de acidez nos compartimentos celulares. Um pH_i elevado irá conduzir ao aumento das taxas proliferativas independentemente de fatores de crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011) e células tumorais ultrapassam os pontos de verificação de ciclo celular (HARGUINDEY et al., 2005). Além disso, o aumento do pH_i também promove a

sobrevivência das células limitando a apoptose através da ativação de agentes anti-apoptóticos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Verificou-se também a indução de mudanças adaptativas na expressão de enzimas glicolíticas quando há o aumento do pHi, acarretando no aumento da reprogramação metabólica, conduzindo a novos perfis metabólicos dentro do tumores sólidos (CHEN et al., 2008).

Outra adaptação conduzida pela variação do pH e que garante vantagens as células tumorais é a resposta frente a drogas, bem como o escape imunológico. Neste contexto em que o meio extracelular é acidificado, as células conseguem escapar da ação imunológica natural, suprimindo a atividade de linfócitos citotóxicos e células NK (do inglês, *Natural killer* - *NK*). Além disso, a própria liberação de lactato implica no direcionamento de células T, afetando seu metabolismo e sua função (FISCHER et al., 2007; PEPPICELLI et al., 2017a; ERRA DÍAZ; DANTAS; GEFFNER, 2018).

A resposta a agentes terapêuticos também pode ser influenciada por esta cenário acidificado. Um baixo pHe pode modular o status de carga dos medicamentos refletindo em sua captação pela membrana celular e garantindo em certas ocasiões a resistência das células tumorais às drogas (WOJTKOWIAK et al., 2011; KOLTAI, 2016). A característica química da droga é fator seletivo para a efetividade nas células. Em condição de acidez extracelular, as drogas fracamente ácidas tem sua eficácia aumentada, enquanto há um aumento da resistência através de uma menor citotoxicidade frente à drogas com característica fracamente básicas (RAGHUNAND; MAHONEY; GILLIES, 2003; VANDER LINDEN; CORBET, 2019). A acidez do meio extracelular pode também implicar na evasão de apoptose induzida pela radiação de tratamentos radioterápicos (BORON, 2004).

O pH desregulado, devido ao aumento de pHi e redução de pHe, facilita um evento primordial para o sucesso da mortalidade pelo câncer, pois contribui para a disseminação metastática, a qual deve cumprir etapas preliminares até garantir a colonização de sítios secundários. Durante a metástase, as células se liberam através da perda de contatos de adesão celular, apresentam um aumento da motilidade através de remodelamentos controlados do citoesqueleto e por fim, para realmente atingir a outro sítio deve haver a digestão e reorganização de MEC permitindo a invasão das células cancerígenas (STOCK; SCHWAB, 2009; WEBB et al., 2011).

A ativação de proteases, devido ao baixo pHe, estimula a ruptura das junções de aderência e remodela a adesão célula-MEC (MOHAMED; SLOANE, 2006; CHEN et al., 2009). A partir disso, a motilidade das células é alterada por uma montagem de novos

filamentos de actina que modifica a polaridade das células, impulsionando a protrusão de membrana em células migratórias (MEIMA et al., 2009; WEBB et al., 2011). Esta variação de pH, que acidifica o meio extracelular proporcionando a ativação destes processos celulares, é conduzida por aumento da atividade do transportador de íons NHE1 (GRILLO-HILL et al., 2015).

A bomba de íons em questão proporciona não somente a acidificação de MEC, mas também promove a polaridade direcional nestas células, por meio do acúmulo destas na borda principal do *lamellipodium* possibilitando a formação de invasipódios com um gradiente de pHe associado à migração celular (STOCK et al., 2005; STÜWE et al., 2007). A invasão destas células recém remodeladas ocorre devido a ação de metaloproteinases de matriz (MMPs), as quais são convertidas para sua forma ativa em pHe reduzido, promovendo a degradação de componentes estruturais da MEC (STOCK; SCHWAB, 2009). Associado a todos estes eventos, ocorre a estimulação do potencial metastático por meio da indução, através de uma cascata de sinalização intracelular, da expressão gênica de fatores pró-metastáticos (KATO et al., 2013).

1.4 Terapias anti-metabólicas na progressão tumoral

As alterações no metabolismo celular proporcionam uma melhor adaptação e seleção das células tumorais, logo direcionar terapias contra o metabolismo destas células parece ser um alvo atrativo, prejudicando a bioenergética e tornando-as mais suscetíveis aos estresses do ambiente (VANDER HEIDEN, 2011). Como prática mais comum em terapias anti-metabólicas há a inibição de enzimas que são essenciais e reguladas positivamente em células cancerígenas, o que ainda reduz os danos as células normais (PHAN; YEUNG; LEE, 2014). Tendo isso em mente, é possível desenvolver terapias visando o metabolismo do tumor de acordo com a presença de nutrientes ou utilizando drogas que atuam sobre reguladores ou diretamente sobre enzimas da rota metabólica.

Entre as abordagens indiretas mais relevantes direcionadas à glicólise se destaca a 2-desoxiglicose (2DG), um análogo da glicose que tem se mostrado promissor pelo seu efeito anti-tumoral. Este composto atua inibindo a HK, o que leva a uma diminuição do ATP intracelular, tendo como consequência a inibição da proliferação, do crescimento e da viabilidade das células cancerígenas (ZHANG et al., 2006, 2014). Ensaios pré-clínicos com a 2DG demonstraram uma resposta dúbia no tratamento, pois apesar de alguns resultados positivos (ZHANG et al., 2014; O'NEILL et al., 2019), esta droga favoreceu a sobrevivência das células cancerígenas, ativando rotas pró-sobrevivência via PI3K/AKT

(ZHONG et al., 2009). Além disso, seus efeitos terapêuticos se mostraram pouco eficazes como agente monoterápico, fazendo-se necessário a combinação com outros compostos, agindo por vezes como agente sensibilizador a outras terapias (GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013).

Devido aos efeitos contraditórios expostos, se faz necessário o uso de outras drogas mais eficazes que possam atuar não somente em uma enzima, mas de forma multidirecionada como é o caso da 3-bromopiruvato (3BrP), a qual tem como alvo diferentes pontos da via glicolítica (BAGHDADI, 2017) e também a função mitocondrial (SHOSHAN, 2012) gerando uma redução generalizada dos níveis de ATP (EHRKE; AREND; DRINGEN, 2015; SUN et al., 2015; VALENTI; VACCA; DE BARI, 2015). Devido as características das células normais quando comparada com as células cancerígenas, esta droga se mostrou menos tóxica para células não tumorais e ainda assim proporcionou não somente a morte por apoptose, mas também por necrose, sobrepondo os efeitos de alguns quimioterápicos e prevenindo recidivas tumorais (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003; NAKANO et al., 2011; EL SAYED et al., 2012).

A ação destes e de outros inibidores de via glicolítica também garantem novas oportunidades de terapia combinada, principalmente em relação a agentes quimioterápicos e esquemas de radiação. Estes inibidores atuam na sensibilização das células tumorais, melhorando a resposta aos eventos terapêuticos posteriores. Esta abordagem tem se mostrado bastante eficiente para o tratamento de fenótipos tumorais mais resistentes, além de contribuir para a sensibilização das células cancerígenas à imunoterapia (DWARAKARNATH; JAIN, 2009; BÉNÉTEAU et al., 2012; GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013).

O uso de inibidores de outras enzimas, como o dicloroacetato (DCA) que inibe a piruvato quinase desidrogenase (PDK), leva a uma redução da conversão do piruvato em lactato, evento condutor da acidose tumoral (PHAN; YEUNG; LEE, 2014). O DCA regula a função de uma enzima mitocondrial, a piruvato desidrogenase (PDH), associada ao ciclo TCA e indutora da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Com isso, a droga inibe o regulador de PDH promovendo o fluxo de piruvato em acetil-CoA e ainda causa uma mudança no balanço energético celular de glicólise para a ativação da OXPHOS (MICHELAKIS et al., 2010; LI et al., 2015). Seu uso têm demonstrado resultados promissores em ensaios *in vivo*, por conduzir a regressão tumoral e apoptose (MICHELAKIS et al., 2010).

O reposicionamento de fármacos visando alvos anti-metabólicos também estão sendo estudados. A metformina, um medicamento utilizado usualmente para tratar diabetes tipo II, e já clinicamente aprovado, mostrou-se uma droga eficaz na redução de síntese de ATP, pois atua no complexo mitocondrial I (WHEATON et al., 2014). Sua ação efetiva nas células cancerígenas está na ativação da AMPK e subsequente inibição da sinalização mTOR, a qual tem papel fundamental para a proliferação e ativação de vias a jusante em células tumorais (SONG et al., 2012). Apesar disso, KOLTAI (2016) refere que a metformina representa um inibidor fraco do complexo I, sendo necessário utilizar inibidores do complexo mitocondrial III para intensificar o efeito sobre o processo de OXPHOS.

A presença de mutações em transportadores de glicose devido ao alto consumo desta fonte energética, bem como o uso de transportadores de íons para aumentar o pH intracelular, são eventos básicos entre as células cancerígenas em níveis de tumorigênese avançado. Logo, direcionar inibidores de enzimas que garantem estas funções sugerem uma forte função terapêutica (WHITE; GRILLO-HILL; BARBER, 2017). Mas o bloqueio de transportadores proteicos como GLUT, o qual impediria a captação de glicose e alto fluxo glicolíticos, é considerada uma abordagem crítica já que esta enzima é expressa também em células não tumorais (GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013). Apesar disso, já existem algumas drogas com esta função demonstrando efeitos positivos em ensaio pré-clínico (LIU et al., 2012).

Outros transportadores alvo são os MCTs, que proporcionam o fluxo de lactato/ piruvato, garantindo a homeostase do pH das células, principalmente a alcalinização de pH intracelular (TENNANT; DURÁN; GOTTLIEB, 2010). Estudos *in vivo* têm demonstrado a redução do fluxo glicolíticos e do crescimento tumoral quando estes transportadores são silenciados, mas não há ainda inibidores específicos para MCT4, o qual está mais relacionado ao comportamento metastático (GALLAGHER; CASTORINO; PHILP, 2009; LE FLOCH et al., 2011).

1.5 Justificativas

A reprogramação metabólica é uma característica comum entre as células tumorais, a qual proporciona uma modulação dos caminhos de aquisição de nutrientes para atender às demandas bioenergéticas, biossintéticas e oxirredutoras das células malignas. Como consequência desta modificação metabólica o meio extracelular do TME é acidificado, fato que contribui para o ganho das propriedades malignas e condução ao estado metastático. Logo, entender os processos que medeiam esta adaptação celular ao meio ácido em linhagens tumorais nos proporciona um conhecimento das vias celulares e moleculares adotadas pelas células, bem como ocorre a escolha do perfil energético em cada tipo de célula dependendo da condição ambiental.

Apesar dos diversos estudos sobre a temática, a heterogeneidade e plasticidade tumoral ainda lançam barreiras para a compreensão completa deste assunto, tendo em vista esta problemática o presente estudo poderá agregar ao conhecimento básico, especialmente em linhagens de câncer de próstata, trazendo novos achados diante das adaptações celulares e bioenergéticas das células expostas de forma aguda e crônica ao ambiente extracelular ácido. Ainda, este conhecimento poderá também nos apresentar os potenciais alvos de aplicação terapêutica, a fim de entender as melhores estratégias na sensibilização deste grupo de células fortemente adaptado e ainda procurar estratégias visando a resistência terapêutica adquirida pelas células devido a sua adaptação ao ambiente estressor. As linhagens celulares cancerígenas utilizadas no presente estudo foram adaptadas a um meio acidificado e posteriormente junto a condições de cultivo normais, caracterizadas em nível celular e molecular, bem como testadas frente à drogas anti-metabólicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil bioenergético e respostas celulares adaptativas de células de câncer de próstata sob acidose extracelular induzida.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a adaptação de duas linhagens de câncer de próstata à acidose extracelular induzida;
- Avaliar o potencial proliferativo, sobrevivência celular e resistência a drogas das células sob acidose aguda e crônica;
- Caracterizar o perfil bioenergético das linhagens celulares de câncer de próstata sob acidose aguda e crônica;
- Avaliar o efeito de inibidores metabólicos em linhagens celulares de câncer de próstata submetidas à acidose extracelular;
- Avaliar o perfil de expressão de genes envolvidos na modulação de vias metabólicas em linhagens celulares de câncer de próstata submetidas à acidose extracelular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular e adaptação a acidose extracelular

As linhagens celulares DU-145 (ATCC/HTB-81) e LNCaP (ATCC/CRL-1740), ambas de tecido tumoral da próstata derivadas de diferentes sítios metastáticos, foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml a 37°C em atmosfera umidificada com CO₂ a 5%. O meio de cultivo foi adicionalmente suplementado com HEPES (Gibco) e PIPES (Sigma Aldrich) (25 mM de cada) e o pH ajustado para 7,4 ou 6,8, conforme a Figura 3.1. As células foram cultivadas em meio acidificado (pH 6,8) por 24 h (acidose aguda) ou por vários meses (acidose crônica). As células foram consideradas adaptadas a condição de acidose extracelular crônica após cultivo em meio acidificado por aproximadamente 30 passagens, quando atingiram taxas de crescimento semelhantes às das células cultivadas em meio de cultivo padrão (pH 7,4). As células cultivadas sob acidose crônica foram monitoradas por microscopia para avaliação da manutenção da morfologia original. As células foram testadas quanto à contaminação por micoplasma por amplificações de PCR, certificando linhagens livres de contaminação por micoplasma.

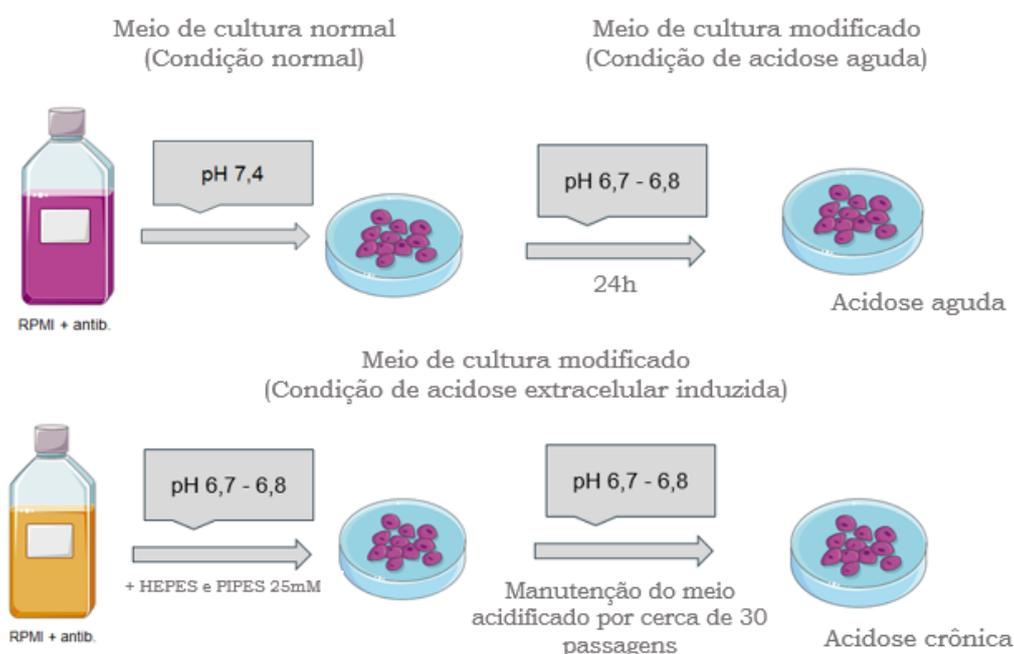


Figura 3.1. Representação esquemática do cultivo e adaptação das linhagens celulares de câncer de próstata à acidose extracelular.

3.2 Ensaio de proliferação celular e cálculo do *doubling time*

A taxa de proliferação de cada linhagem celular foi avaliada a partir de contagem com azul de Tripan. Um total de 5×10^4 células/poço de cada linhagem celular foram semeadas em placas de 24 poços em quadruplicata. As células foram coletadas e contabilizadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 h após o plaqueamento. A partir destas contagens foi também avaliado o *doubling time* das células em cada condição de cultivo. O *doubling time* foi calculado utilizando a calculadora on-line de tempo de duplicação (Roth, 2006).

3.3 Imunofluorescência

Ensaio de imunofluorescência foram realizados para avaliação da morfologia celular. Inicialmente, células DU-145 ($1,5 \times 10^5$) e LNCaP (5×10^5), adaptadas e não adaptadas a acidose extracelular, foram cultivadas sobre lamínulas adicionadas em placas de cultura de 6 poços nas condições de cultivo descritas anteriormente (seção 3.1) por 24 h. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em (PBS) por 15 min à temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, foi realizada a permeabilização das células com Triton X-100 a 0,2% por 10 min, seguido de lavagens com PBS e PBS-Tween20 (PBS-T) 0,05% e o bloqueio com (BSA) a 5% em PBS-T por 20 min. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase α (Invitrogen, 1:20) por 16-18 h a 4°C, seguido de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina (sc-2092, Santa Cruz; 1: 100) por 1 h à temperatura ambiente. Após as marcações com os anticorpos específicos foi realizada a marcação de núcleo utilizando 100 nM de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 20 min à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram montadas com o reagente Fluoromount-G (Invitrogen) e as imagens foram imediatamente captadas por microscopia confocal em microscópio Olympus FV1000 no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS. As imagens foram obtidas de cinco campos diferentes em cada lâmina e o experimento foi realizado em triplicata para cada grupo.

3.4 Avaliação morfológica e do potencial de membrana mitocondrial

Células DU-145 ($1,5 \times 10^5$) e LNCaP (5×10^5), adaptadas e não adaptadas a acidose extracelular, foram cultivadas sobre lamínulas em placas de cultura de 6 poços nas condições de cultivo descritas anteriormente (seção 3.1) por 24 h. Foram então realizadas três lavagens com PBS1X e as células foram incubadas com 30 nM do corante

MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific) diluído no meio de cultura sem soro fetal bovino por 40 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a marcação dos núcleos utilizando 100nM de DAPI por 20 min à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando o reagente Fluoromount-G (Invitrogen) e as células foram visualizadas por microscopia confocal em microscópio Olympus FV1000 no CMM da UFRGS. Imagens foram obtidas de cinco campos diferentes por lâmina.

O potencial de membrana de mitocôndrias das células de DU-145 foi avaliado a partir da marcação com MitoTracker Red-CMXRos (Thermo Fisher Scientific). As células foram cultivadas por diferentes tempos (24, 48 e 72 h), coletadas e lavadas com PBS 1X. As células foram então incubadas com 100 nM de MitoTracker Red CMXRos por 30 min a 37°C e então lavadas e ressuspensas em PBS. Para o controle positivo, as células foram tratadas por 4 h com 1 µM de FCCP, um desacoplador da fosforilação oxidativa das mitocôndrias, o qual induz o colapso do potencial de membrana nesta concentração. Os resultados obtidos foram avaliados por citometria de fluxo no equipamento BD FACSAria III (BD Biosciences). O ensaio contemplou um total de 10.000 eventos quantificados para cada triplicata técnica de todas as condições de cultivo. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo 10.6.1 e os picos de cada análise foram sobrepostos para permitir a visualização da distribuição de fluorescência. Os valores de fluorescência obtidos foram normalizados pela fluorescência intrínseca e utilizados para formulação dos gráficos.

3.5 Ensaio de *wound healing*

O ensaio de *wound healing* foi realizado de acordo com LIANG; PARK; GUAN, (2007). Células DU-145 ($1,5 \times 10^5$) e LNCaP (3×10^5), adaptadas e não-adaptadas a acidose extracelular, foram cultivadas por 24 h. Após a adesão celular, as células foram cultivadas em meio sem SFB por um período adicional de 24 h para sincronização do ciclo celular. Foi então realizado um risco na monocamada utilizando uma ponteira de 200 µL estéril, seguido de lavagens com o próprio meio para remoção de células e restos celulares. Imagens em microscopia ótica foram obtidas imediatamente (tempo 0) e 6, 24 e 48 h após o arranhão, de acordo com o fechamento da ferida. A partir das imagens obtidas foi avaliado o percentual de fechamento da área onde foi realizado o risco com o auxílio do programa ImageJ (NIH, USA), conforme cálculo descrito por (GRADA et al., 2017). O ensaio foi realizado em três experimentos independentes e em triplicata técnica.

3.6 Análise de ciclo celular

O conteúdo de DNA celular das linhagens DU-145 e LNCaP, foi avaliado por citometria de fluxo a partir da coloração com iodeto de propídeo (PI), nas condições de cultivo descritas anteriormente (seção 3.1). As células foram cultivadas durante 24, 48 e 72 h e coletadas após cada período, lavadas em PBS 1X e fixadas com etanol 70% a 4°C por pelo menos 2 h. O material fixado foi lavado com PBS, centrifugado e marcado com solução de PI (5µg/mL) acrescida de RNase (500µg/mL) por 30 min a temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS 1X e em seguida ressuspensas em PBS 1X. As células foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSAria III (BD Biosciences). Ao todo, foram avaliados 10.000 eventos para cada ensaio, os quais foram realizados em dois experimentos independentes em triplicata técnica para todas as condições e nos tempos indicados. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo 10.6.1 (<https://www.flowjo.com>).

3.7 Análise de morte celular

As células cultivadas nas três condições do estudo foram coletadas após 24 e 72 h de cultivo e submetidas a marcação com anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (PI) utilizando o kit comercial Anexina V-FITC (QuatroG), conforme as recomendações do fabricante. A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo no equipamento BD FACSAria III (BD Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicata técnica para todas as condições e tempos indicados, considerando 10.000 eventos para cada. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo 10.6.1 (<https://www.flowjo.com>).

3.8 Ensaio de citotoxicidade e sobrevivência com inibidores metabólicos e quimioterápicos

Para avaliar a inibição da proliferação celular frente aos tratamentos com drogas foi utilizado o ensaio de sulforodamina B (SRB) (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Células DU-145 e LNCaP, adaptadas ou não a acidose extracelular, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h com renovação dos meios de cultivo, em seguida, tratadas com diferentes concentrações dos inibidores metabólicos 2-desoxiglicose e 3-bromopiruvato, ou do quimioterápico cisplatina. Após 72 h de incubação, as células foram fixadas com ácido tricloacético 10% por 1 h a 4°C e os solventes foram evaporados a temperatura ambiente. Para o controle (dia 0), as células foram cultivadas por 24 h sem

nenhuma droga e em seguida fixadas. Posteriormente, as células foram coradas com SRB (0,057% em ácido acético 1% v/v) por 30 min. O excesso do corante foi removido com ácido acético 1% e o conteúdo no fundo do poço ressuspendido em 10 mM Tris sob agitação por 5 min. A absorbância foi avaliada em um comprimento de onda de 510 nm em leitor de microplacas multimodo SpectraMax i3x. (Molecular devices). As porcentagens de proliferação foram calculadas segundo VICHAI; KIRTIKARA, (2006) e uma curva de resposta à dose foi realizada para a obtenção do valor de IC50 (dose que inibe o crescimento em 50%). As análises foram realizadas em quadruplicata técnica para o ensaio com cisplatina e em triplicata técnica e duplicata biológica para o ensaio com os inibidores metabólicos, estes expressos em gráficos de colunas.

3.9 Ensaio de viabilidade celular e efeito de inibidores metabólicos

As linhagens celulares, adaptadas ou não a condição de acidose extracelular, foram plaqueadas em placas de 96 poços (DU-145, $1,5 \times 10^4$ células/poço; LNCaP, 3×10^4 células/poço). Após 4 h, para permitir a adesão celular, os inibidores metabólicos, 2-desoxiglicose (2DG) e 3-bromopiruvato (3BrP), foram adicionados nas concentrações de IC50 obtidas nos experimentos de citotoxicidade das células em meio padrão (pH 7,4), sendo 10 mM de 2DG e 42 μ M de 3BrP para DU-145 e 0,2 mM de 2DG e 13 μ M de 3BrP para LNCaP. Foi também realizado o tratamento com a combinação entre as duas drogas.

Após a incubação com as drogas por 24, 48 ou 72 h, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml em PBS) por mais 4 h. Para solubilizar o formazan, 100 μ L de tampão de lise celular (16% SDS, 40% N, N-dimetilformamida, 2% ácido acético, pH 4,7) foram adicionados a cada poço e as amostras foram incubadas durante 16-18 h a 37°C em uma incubadora umidificada. Os valores de absorbância foram determinados a 595 nm com um leitor automático de microplacas (Bio-Rad, modelo 550). A análise foi realizada para dois experimentos independentes, ambos em quadruplicata. O impacto da condição de cultivo e das drogas na viabilidade celular foi normalizado em relação às amostras controle correspondentes em cada tempo. Os valores de viabilidade celular foram expressos como porcentagens, no qual os valores do grupo controle foram definidos como 100%.

3.10 Respirimetria de alta resolução

Os ensaios de respirometria de alta resolução foram realizados em respirômetro de alta resolução Oxygraph-2 k (Oroboros Instruments) equipado com um agitador

magnético e controle de temperatura a 37°C (OLIVEIRA et al., 2008; SMOLKOVÁ et al., 2010). As células DU-145 e LNCaP, adaptadas ou não a acidose extracelular, foram tripsinizadas no momento do experimento e ressuspensas em meio de cultivo livre de soro fetal bovino. A respiração celular foi medida utilizando $0,4 \times 10^6$ de células DU-145 e $0,6 \times 10^6$ de células LNCaP.

O ensaio foi realizado em câmaras com meio depletado de soro fetal bovino. As células foram adicionadas e iniciou-se a captação dos índices respiratórios a partir do consumo basal. Outros parâmetros bioenergéticos foram determinados após a estabilização na taxa de oxigênio consumido, com adição de drogas inibitórias ou estimulantes de componentes mitocondriais primordiais. Inicialmente, foi adicionada uma solução de oligomicina (2 µg/mL) que inibe a ATP sintase e obtém-se o consumo mínimo de oxigênio (*proton leak*), em seguida, carbonilcianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) na concentração de 100 nM, um desacoplador ideal para atingir a respiração máxima induzida. Ao atingir a respiração máxima, foram adicionadas outras duas drogas atreladas a inibição dos complexos respiratórios I e III, a rotenona (0,5 µM) e a antimicina A (2,5 µM), respectivamente, para determinar o consumo de oxigênio residual ou não-mitocondrial (do inglês, *residual oxygen consumption* - ROX).

Os valores obtidos para cada parâmetro foram calculados a partir da normalização com o ROX. Os parâmetros *ATP linked* e capacidade reserva foram calculados a partir da diferença do estado basal em relação ao *proton leak* e da diferença da respiração máxima em relação a respiração basal, respectivamente. O software DatLab software (Oroboro's Instruments) foi utilizado para aquisição e análise dos dados. As análises foram realizadas a partir de quadruplicata, sendo as replicatas divididas entre as câmaras do equipamento.

3.11 Transcrição reversa associada à PCR quantitativa (RT-qPCR)

Amostras de RNA de células DU-145 e LNCaP, adaptadas ou não a acidose extracelular, foram isoladas utilizando TRIzol (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O RNA foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado por espectrofotometria. Em seguida, 1 µg de RNA foi tratado com 1 U de DNase livre de RNase (Invitrogen) por 30 min a 37°C. A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com *Random primer* como molde. As análises de PCR quantitativa foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems). As sequências dos iniciadores para

amplificação de genes de interesse e dos genes utilizados com normalizadores foram projetadas segundo YE et al. (2012) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados nos experimentos de RT-qPCR

Gene-alvo	Sequências
<i>β-actina</i>	<i>Forward 5' - CCTGGCACCCAGCACAAT -3'</i> <i>Reverse 5' - GACTCGTCATACTCCTGCTTG -3'</i>
<i>18S</i>	<i>Forward 5' - TCGGAACTGAGGCCATGATT -3'</i> <i>Reverse 5' - CCTCCGACTTTCGTTCTTGATT -3'</i>
<i>HIF1</i>	<i>Forward 5' - GACCGATTACCATGGAGGG -3'</i> <i>Reverse 5' - GTGGCAACTGATGAGCAAGC -3'</i>
<i>GLUT1</i>	<i>Forward 5' - GAACTCTTCAGCCAGGGTCC -3'</i> <i>Reverse 5' - ACCACACAGTTGCTCCACAT -3'</i>
<i>LDHA</i>	<i>Forward 5' - AGCTGTTCCACTTAAGGCC -3'</i> <i>Reverse 5' - TGGAACCAAAGGAATCGGGA -3'</i>
<i>MCT4</i>	<i>Forward 5' - ACAGCCTGGATCTCCTCCAT -3'</i> <i>Reverse 5' - ATGATGCTCCGGCAAAGGA -3'</i>
<i>PKM2</i>	<i>Forward 5' - ATCGGTCCTCACCAAGTCTGG -3'</i> <i>Reverse 5' - GAAGATGCCACGGTACAGGT -3'</i>
<i>HK2</i>	<i>Forward 5' - CCCCTGCCACCAGACTAAAC -3'</i> <i>Reverse 5' - CAAAGTCCCCTCTCCTCTGG -3'</i>
<i>G6PD</i>	<i>Forward 5' - ACGACGAAGCGCAGACAG -3'</i> <i>Reverse 5' - TCCGACTGATGGAAGGCATC -3'</i>
<i>c-Myc</i>	<i>Forward 5' - GGACCCGTTCTCTGAAAGG -3'</i> <i>Reverse 5' - TAACGTTGAGGGGCATCGTC -3'</i>
<i>TIGAR</i>	<i>Forward 5' - CTCTGACTGTTGTCCGGCAT -3'</i> <i>Reverse 5' - TGCATGGTCTGCTTTGTCCT -3'</i>
<i>SCO2</i>	<i>Forward 5' - TGGACCACTCCATTGCCATC -3'</i> <i>Reverse 5' - AGACAGGACACTGCGGAAAG -3'</i>
<i>GLUD1</i>	<i>Forward 5' - GACATCGTGCACTCTGGCT -3'</i> <i>Reverse 5' - AGGTCACACCAGCTTCATTGT -3'</i>
<i>PFK1</i>	<i>Forward 5' - TGGGACTAAAAGGACTCTACCC -3'</i> <i>Reverse 5' - CCCTGTGTAAGCCTCAAAGC -3'</i>

As condições da RT-qPCR foram utilizadas conforme as orientações do fabricante, resumidamente há uma retenção a 50 °C por 2 minutos e desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 94 °C durante 15 s, anelamento a 58 °C durante 15 s e extensão a 72 °C durante 45 s. As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata. Para a determinação dos níveis de expressão dos genes foi realizada a quantificação relativa (QR), utilizando-se a equação $QR = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Foram utilizados como referência os genes da β -actina e do rRNA de 18S.

3.12 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 2 experimentos independentes em triplicata ou quadruplicata. Os dados foram analisados por teste t de student ou ANOVA de uma via, seguidos de pós teste Tukey's Multiple Comparison Test. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$, tais testes e gráficos foram realizados em GraphPad 5.01 (Graphpad *Software* Inc.).

4. RESULTADOS

4.1 Adaptação das linhagens de câncer de próstata DU-145 e LNCaP a acidose extracelular induzida

As linhagens celulares de câncer de próstata DU-145 e LNCaP foram submetidas a adaptação em meio acidificado (pH 6,8). Após 25 passagens celulares, as células expostas de forma crônica a um meio ácido (pH 6,8) apresentaram taxa de crescimento semelhante às células controle cultivadas em pH 7,4 (Figura 4.1). Essas células foram, portanto, consideradas adaptadas ao meio ácido. As células expostas à acidose aguda (24 h) apresentaram redução no seu crescimento a partir de 72 h em comparação às células cultivadas sob acidose crônica e às células cultivadas em pH 7,4 (Figura 4.1). Porém, essa diferença só foi significativa para a linhagem DU-145. Essa diferença pode também ser observada no tempo de duplicação das células (Figura 4.2). As células DU-145 cultivadas em meio padrão e em condição de acidose crônica apresentaram tempos de duplicação semelhantes, diferindo significativamente da condição aguda, que apresentou um aumento no tempo de duplicação.

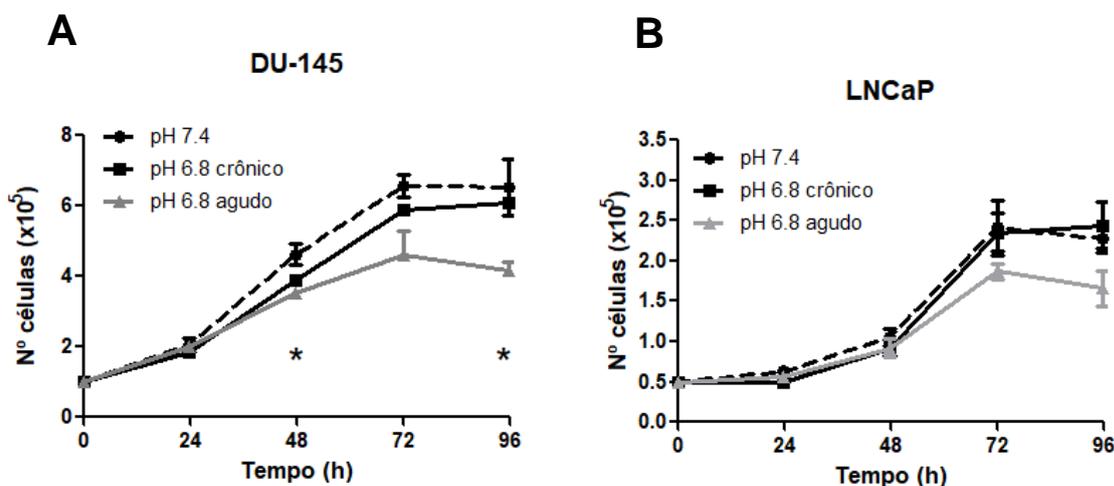


Figura 4.1. Proliferação de células de câncer de próstata expostas de forma crônica e aguda a acidose extracelular (A) DU-145, (B) LNCaP. Proliferação de células DU-145 e LNCaP sob condições de acidose pH 6,8 aguda (cinza) ou pH 6,8 crônica (preto) versus pH 7,4 fisiológico (preto tracejado). Os dados representam a média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando *p < 0,05 de 2 experimentos independentes, em triplicata técnica.

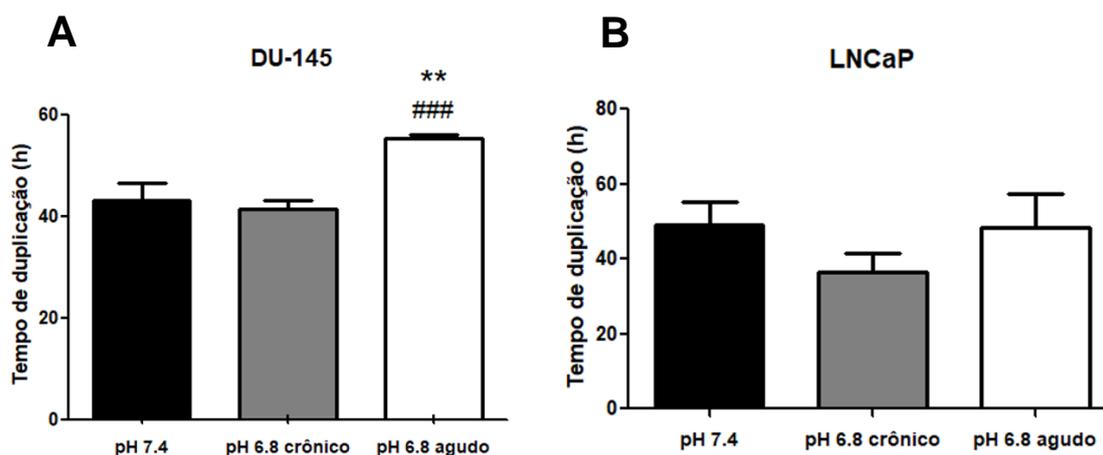


Figura 4.2. Tempo de duplicação das células expostas a acidose extracelular aguda e crônica (A) DU-145, (B) LNCaP. O tempo de duplicação das células DU-145 e LNCaP cultivadas em pH 7,4 e pH 6,8 (exposição crônica e aguda) foi avaliado em 24, 48, 72 e 96 h usando o *Doubling Time Software* (<http://www.doubling-time.com>). Gráfico mostra média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando significativo ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4 e ### $p < 0.001$ vs. pH 6,8 crônico. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.2 Morfologia celular alterada nas células adaptadas ao meio ácido

Além de alterações na proliferação e duplicação celular foram também avaliadas alterações na morfologia das células expostas a acidose extracelular. Foi possível observar que a acidose crônica (em pH 6,8) provocou alterações na morfologia e disposição das células na placa de cultivo, especialmente para a linhagem LNCaP, no qual pode-se observar um fenótipo mesenquimal nestas células adaptadas (Figura 4.3).

Para melhor evidenciar as alterações morfológicas observadas nas células sob acidose crônica, foi realizada através de marcação das células por imunofluorescência com um anticorpo anti- Na^+/K^+ -ATPase α (Figura 4.4). Foi possível notar em ambas as linhagens cultivadas sob acidose crônica um aumento no volume celular e ainda as células de DU-145 assumiram uma morfologia mais arredondada, quando comparadas às células cultivadas em pH 7,4 ou condição de cultivo de pH 6,8 agudo.

4.3 Migração celular modificada frente a condição estressora

A migração celular foi avaliada por ensaio de *wound healing* (Figura 4.5). Observamos um fechamento substancial e reprodutível da ferida em células da linhagem DU-145 cultivadas em pH 7,4 e sob pH 6,8 crônico. Porém, as células sob pH 6,8 agudo apresentaram migração reduzida, também em consequência da taxa proliferativa. Para a linhagem LNCaP foi observada uma redução na migração nas células cultivadas sob

acidose, aguda e crônica, com relação às células cultivadas em pH 7,4, mesmo que tal linhagem demonstrasse baixa capacidade migratória.

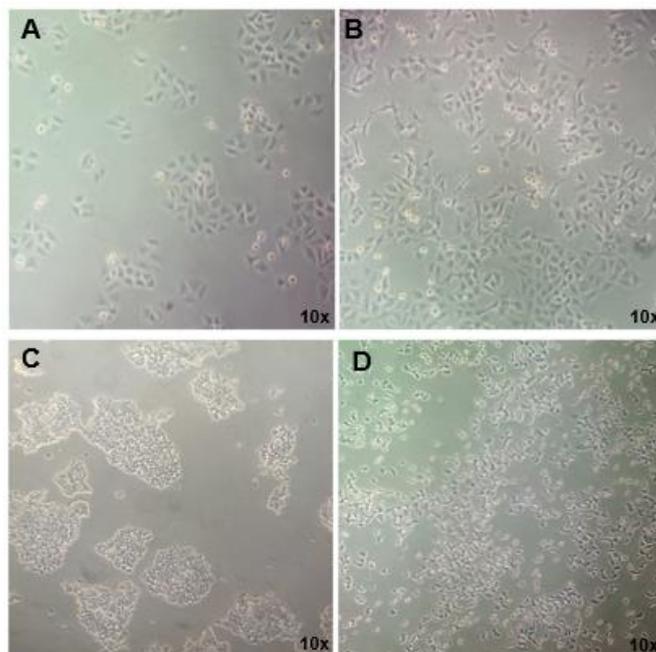


Figura 4.3. Morfologia celular diferenciada entre as linhagens DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes pHs. **A.** Células DU-145 cultivadas em pH 7,4; **B.** Células DU-145 cultivadas sob acidose crônica (pH 6,8); **C.** Células LNCaP cultivadas meio de cultura com pH 7,4; **D.** Células de LNCaP cultivadas sob acidose crônica (pH 6,8).

4.4 Variação de ciclo celular

Para avaliar o comportamento celular frente as diferentes condições de cultivo, foram realizados diversos ensaios celulares comparativos (Figura 4.6). Alterações no ciclo celular de DU-145 foram evidenciadas após 48 h de cultivo, com um aumento significativo da fase G2/M nas células adaptadas ao pH 6,8 crônico em comparação às células cultivadas em pH 7,4 (**p<0,01) e pH 6,8 agudo (##p<0,01), seguido de uma redução significativa desta fase em 72 h, novamente comparando as demais condições (***p<0,001 vs. pH 7,4 e #p<0,05 vs. pH 6,8 agudo). Essas alterações são acompanhadas, respectivamente, de uma redução (48 h) e aumento (72 h) de G1. Este cenário reflete a proliferação rápida das células de DU-145 adaptadas a acidose extracelular em relação às outras condições de cultivo em 48 h.

Enquanto isso, para LNCaP observamos em 24, 48 e 72 h de cultivo um aumento da fase G1 e uma redução da fase G2/M nas células adaptadas ao pH crônico em comparação com as células cultivadas em pH 7,4 (**p<0,01) (Figura 4.6). Em 48 h, esta diferença também foi evidenciada para a condição de pH 6,8 agudo comparada ao cultivo em pH 7,4 (*p<0,05). Estes achados podem refletir uma redução da proliferação das

células adaptadas à acidose crônica quando comparadas com as demais condições, mas este quadro não vai ao encontro da redução no tempo de duplicação celular observada anteriormente para esta condição.

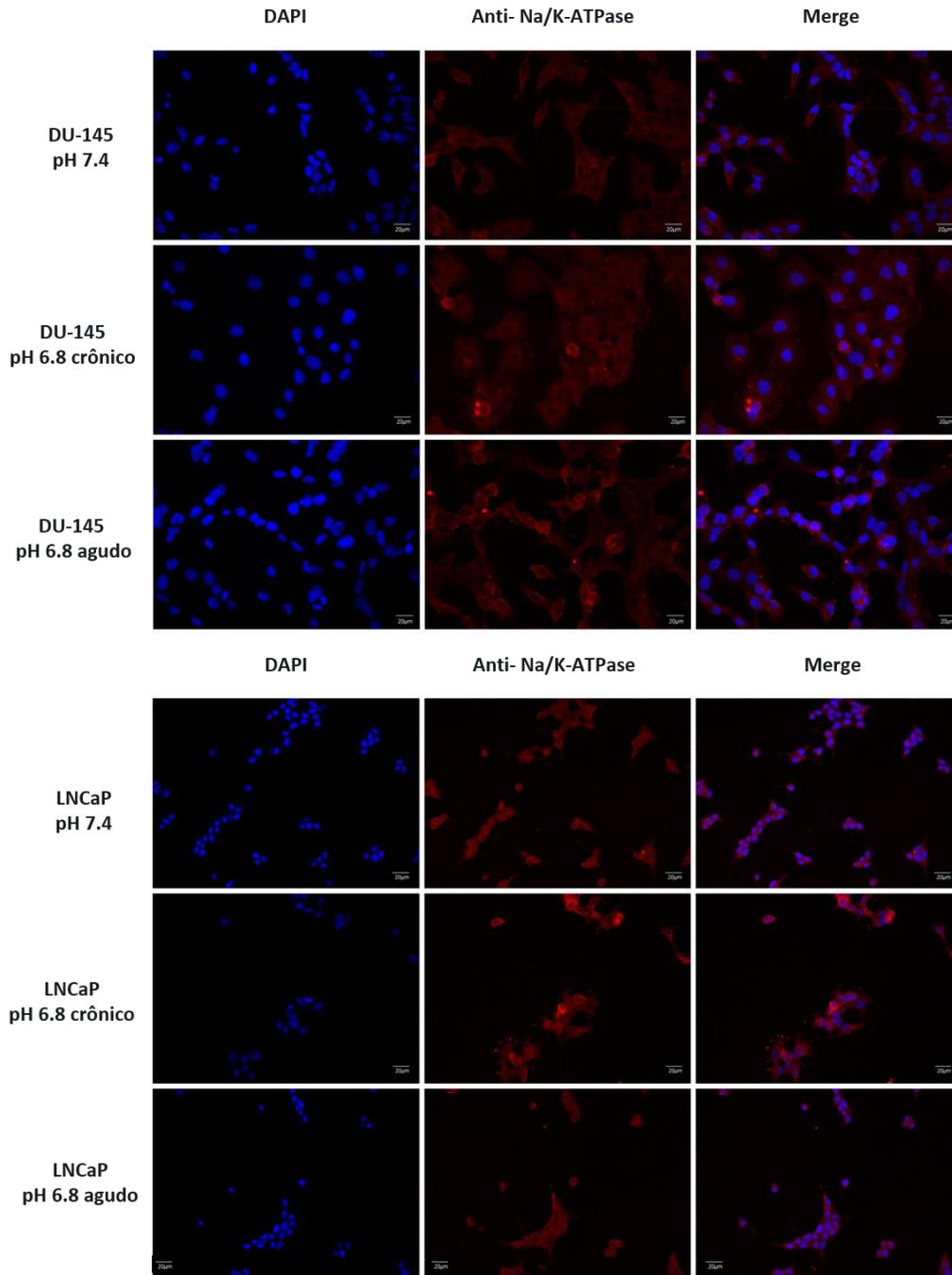


Figura 4.4. Morfologia celular avaliada por ensaio de imunofluorescência. As células DU-145 e LNCaP cultivadas em pH 7,4 e pH 6,8 (exposição crônica e aguda) foram marcadas por ensaio de dupla coloração. As membranas celulares foram marcadas com anticorpo monoclonal contra a proteína de membrana, anti- Na⁺/K⁺-ATPase α , e um anticorpo secundário conjugado com Rodamina (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). As imagens são seções ópticas medianas de pilhas z obtidas por microscopia confocal, Olympus FV1000. Barra de escala, 20 μ m.

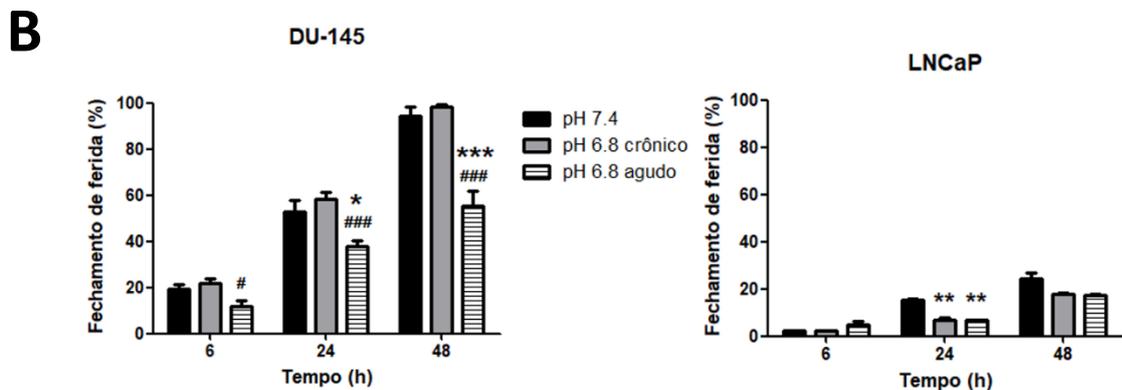
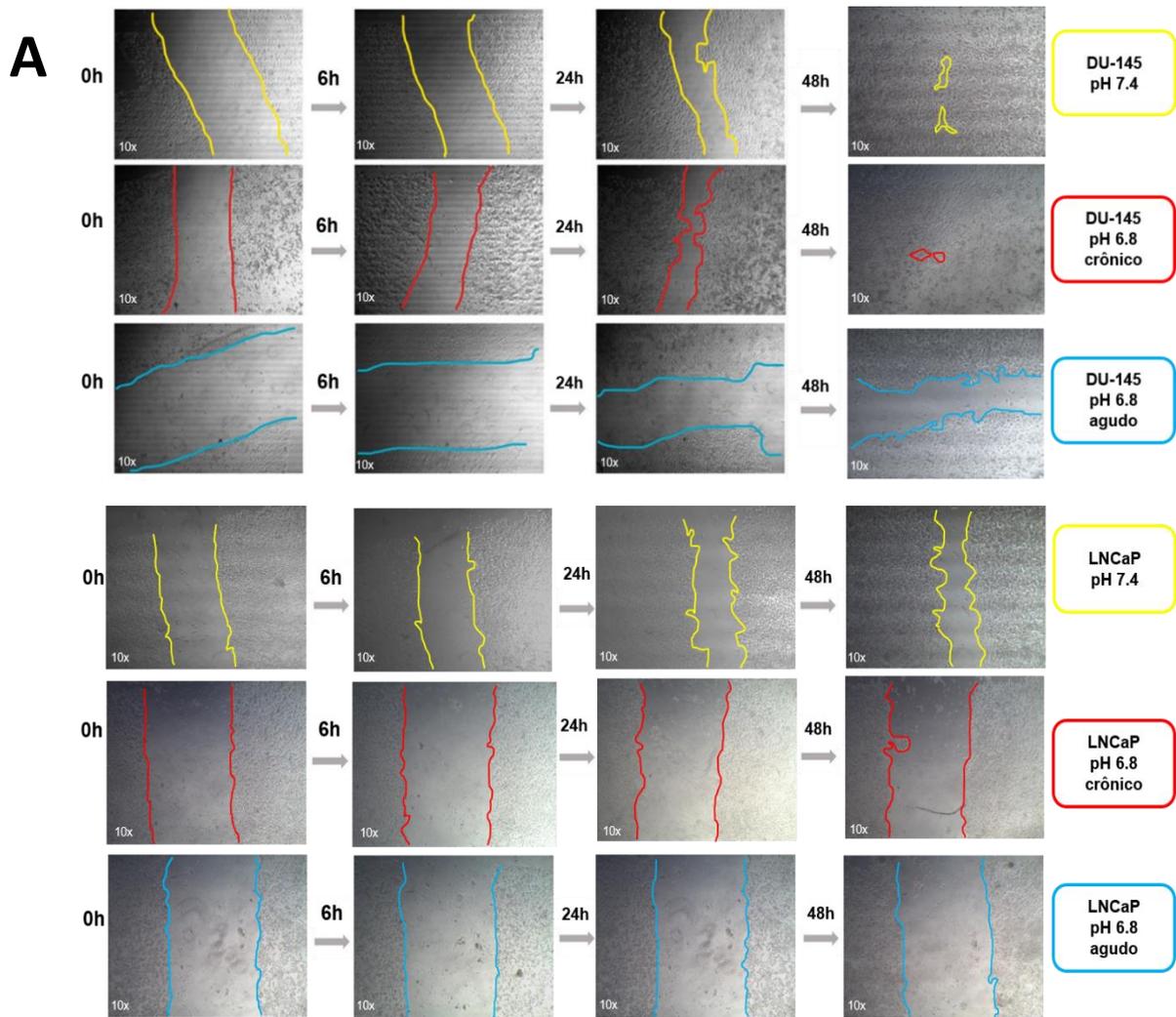


Figura 4.5. Avaliação da migração em células DU-145 e LNCaP pelo ensaio de *wound healing*. (A) Imagens das células em diferentes tempos de fechamento da ferida. (B) Percentual de fechamento da ferida para as duas linhagens e nas três condições de cultivo. Cálculo de fechamento de ferida de acordo com Grada et al. (2017), e normalizado a partir do ponto inicial (tempo 0). Os dados são apresentados como médias e desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata para DU-145 e um único experimento em triplicata técnica para LNCaP. Uma análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4 *** $p < 0.001$ vs. pH 7,4 # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico e ### $p < 0.001$ vs. pH 6,8 crônico.

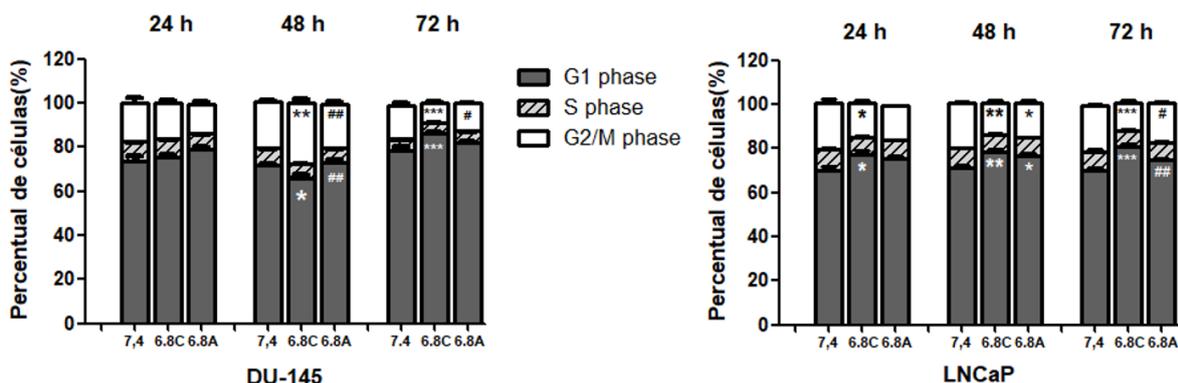


Figura 4.6. Distribuição do ciclo celular de DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes condições de pH. As células coradas com iodeto de propídeo foram analisadas por citometria de fluxo. Gráficos de barras representando porcentagens de células por fase do ciclo celular representativas de dois experimentos independentes (média \pm desvio padrão) e em triplicatas técnicas. A análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4, *** $p < 0.001$ vs. pH 7,4, # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico, ## $p < 0.01$ vs. pH 6,8 crônico. pH 7,4 (7.4), pH 6,8 crônico (6.8C) e pH 6,8 agudo (6.8A).

4.5 Variação de morte celular entre as condições e linhagens

Em 24 e 72 h de cultivo, as células DU-145 não apresentaram diferenças significativas no percentual de apoptose em nenhum grupo (Figura 4.7A e C). Não houve diferença significativa no perfil de morte celular nos diferentes tempos avaliados para esta linhagem. Enquanto isso, para a linhagem LNCaP, a variação de morte celular em relação ao tempo de análise foi bem evidente, principalmente para a condição de acidose crônica (Figura 4.7B e D). Percebeu-se uma redução considerável de células viáveis e um aumento significativo de células em apoptose em células sob acidose crônica após 72 h de cultivo, comparado tanto a condição pH 7,4 quanto a condição ácida aguda ($p < 0,001$) (Figura 4.7D). Um aumento da apoptose em células sob acidose aguda em comparação às células cultivadas em pH 7,4 também foi observado ($p < 0,05$).

4.6 Estado bioenergético alterado ao cultivo em meio ácido

Análises bioenergéticas foram realizadas por respirometria de alta resolução (HRR, do inglês, *high resolution respirometry*) (Figura 4.8A e B). No geral, foi observado um aumento no consumo basal, consumo de O₂ associada a função da ATP sintase e na respiração máxima das células DU-145 adaptadas a acidose crônica e sob acidose aguda em relação às células cultivadas em pH 7,4.

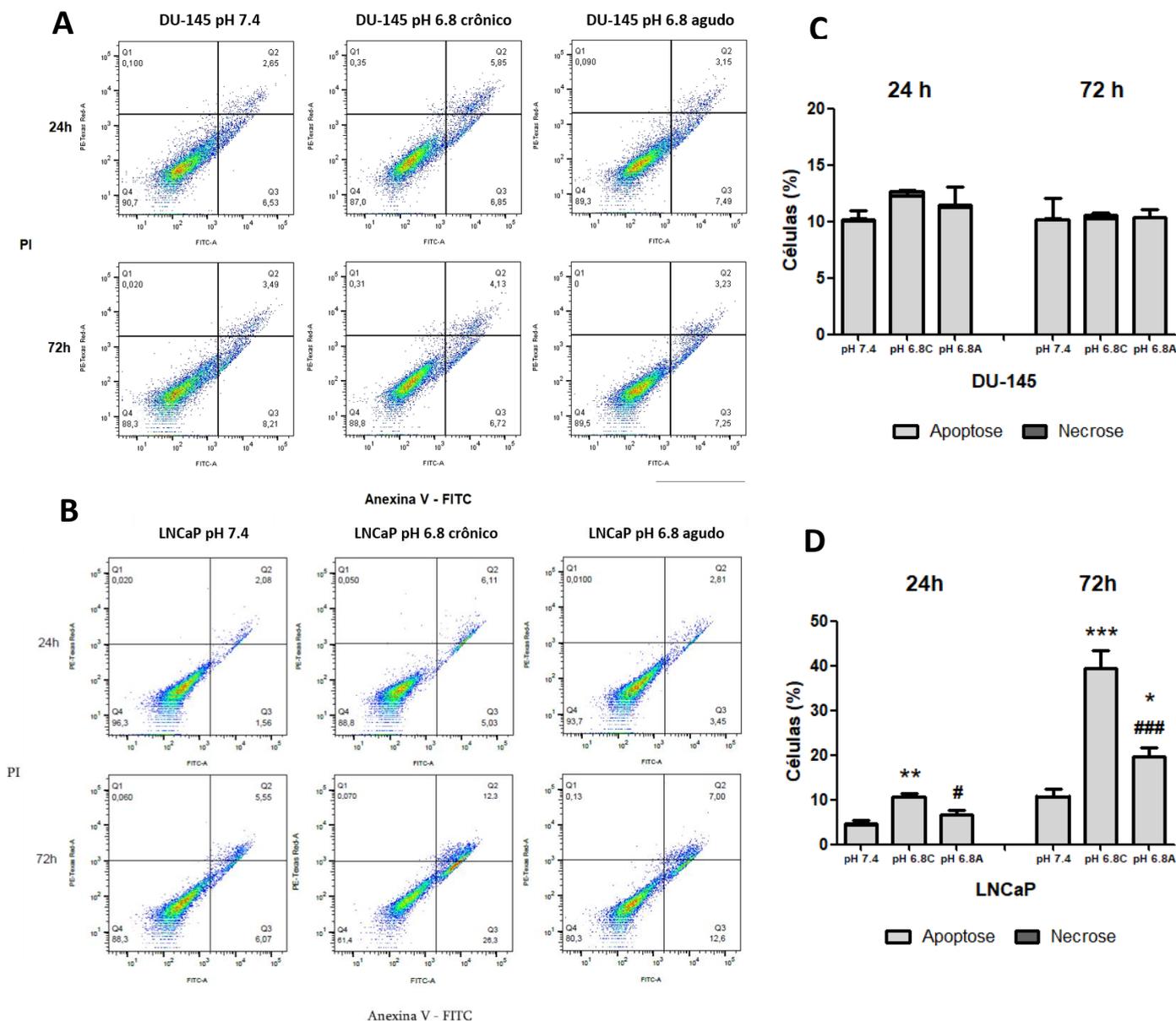


Figura 4.7. Morte celular em células DU-145 e LNCaP cultivadas sob acidose crônica e aguda. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo (Anexina V/PI) de células DU-145 e LNCaP cultivadas em pH 7,4 e pH 6,8 (acidose crônica e aguda) em 24 e 72 h. Gráficos de dispersão representativos das análises de citometria de fluxo para DU-145 (A) e LNCaP (B). PI (eixo y) vs. Anexina V (eixo x). (C e D) Gráficos de barras representando as porcentagens de células vivas, em apoptose precoce, apoptose tardia e em necrose (média \pm desvio padrão). Os ensaios foram realizado em triplicatas técnicas. A análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4, *** $p < 0.001$ vs. pH 7,4, # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico e ### $p < 0.001$ vs. pH 6,8 crônico. pH 7,4 (7.4), pH 6,8 crônico (6.8C) e pH 6,8 agudo (6.8A).

Para LNCaP, foi observado um aumento da capacidade respiratória máxima e da capacidade reserva nas células sob acidose (crônica e aguda) em comparação com as células cultivadas em pH 7,4 (Figura 4.8A e B). Tais modificações nos parâmetros avaliados demonstram que as células sob acidose, em ambas as linhagens, apresentam uma modificação em seu perfil bioenergético.

Diferentes parâmetros bioenergéticos foram avaliados, incluindo respiração basal, *proton leak*, *ATP linked*, respiração máxima, capacidade reserva e ROX (Figura 4.8B). Foi observado um aumento da respiração basal das células em condições de cultivo modificado, principalmente para DU-145. O consumo acoplado à síntese de ATP oxidativa (*ATP linked*) aumentou significativamente nas células DU-145 sob acidose crônica e aguda em relação às células cultivadas em pH 7,4 (* $p < 0.05$). A respiração máxima de ambas as linhagens em condições de acidose mostrou um aumento significativo (# $p < 0.05$ e # $p < 0.01$) em relação às células cultivadas em pH 7,4 (Figura 4.8B). Esse aumento reflete em outro parâmetro respiratório avaliado, a capacidade reserva, indicando quantas vezes acima do estado basal o consumo pode ser elevado, o qual se mostrou aumentado nas células LNCaP sob acidose (aguda e crônica) (## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$, respectivamente). A partir destes dados pode-se inferir um perfil mais oxidativo por parte da condição ácida em ambas as linhagens.

Por fim, o consumo de oxigênio atrelado ao extravasamento de íons (*proton leak*) e independente da via da cadeia transportadora de elétrons (ROX) permaneceram estáveis independente da linhagem celular ou condição de cultivo. Este estado de estabilidade para tais variáveis pode refletir a condição das mitocôndrias das células sob acidose extracelular, as quais mesmo com o efeito estressor conseguem modificar seu estado bioenergético.

4.7 Análise de morfologia e potencial de membrana mitocondrial

A quantidade e distribuição de mitocôndrias foram avaliadas nas diferentes células e condições de cultivo. As diferenças na distribuição mitocondrial são bem sutis, com uma pequena dispersão de mitocôndrias em células DU-145 sob acidose crônica, enquanto as demais condições desta linhagem apresentam mitocôndrias mais agrupadas (Figura 4.9). Este aspecto se repete ao avaliar a distribuição mitocondrial na linhagem LNCaP, embora a observação seja prejudicada pelo tamanho das células (Figura 4.9). Outro fator em ambas as linhagens celulares é a presença de um espaço citoplasmático com a ausência de mitocôndrias nas células cultivadas em pH 7,4.

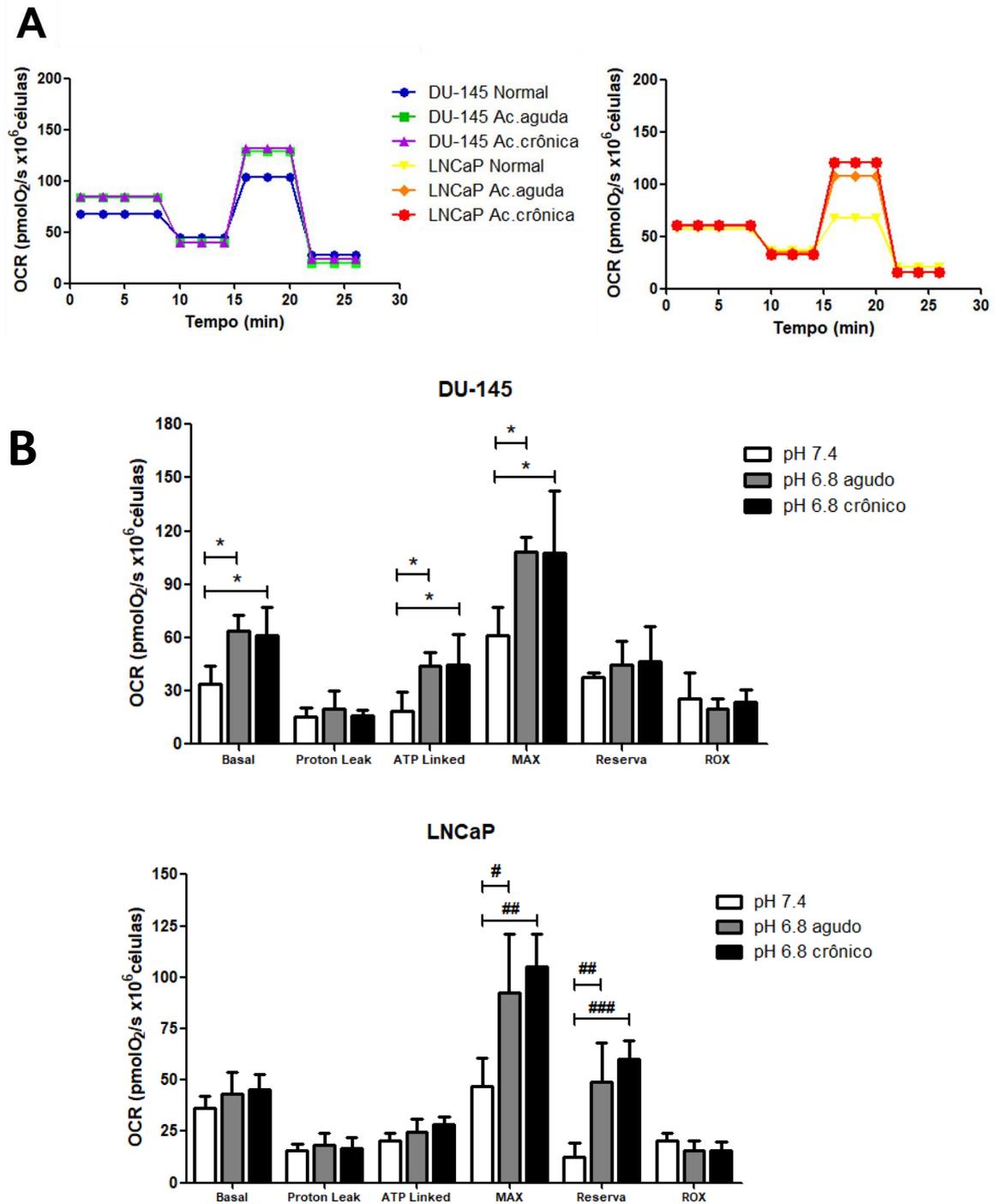


Figura 4.8. Medidas de consumo de oxigênio mitocondrial pelas células DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes pHs. (A) Análise representativa do consumo de oxigênio das linhagens DU-145 e LNCaP em diferentes condições de cultivo. (B) Parâmetros respiratórios avaliados por respirometria de alta resolução: Consumo Basal; Proton leak - consumo de oxigênio não associado à síntese de ATP; ATP Linked - consumo associado à síntese de ATP; Consumo máximo (MAX.); Capacidade de reserva - aumento relativo do consumo após a dissociação; ROX - Consumo independente da via da cadeia de transporte de elétrons. Média \pm DP; N = 4; Os dados representam a média \pm desvio padrão e para análise estatística utilizou-se ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando significativo * $p < 0.05$ vs. DU-145 pH 7,4, # $p < 0.05$ vs. LNCaP pH 7,4, ## $p < 0.01$ vs. LNCaP pH 7,4 e ### $p < 0.01$ vs. LNCaP pH 6,8 crônico.

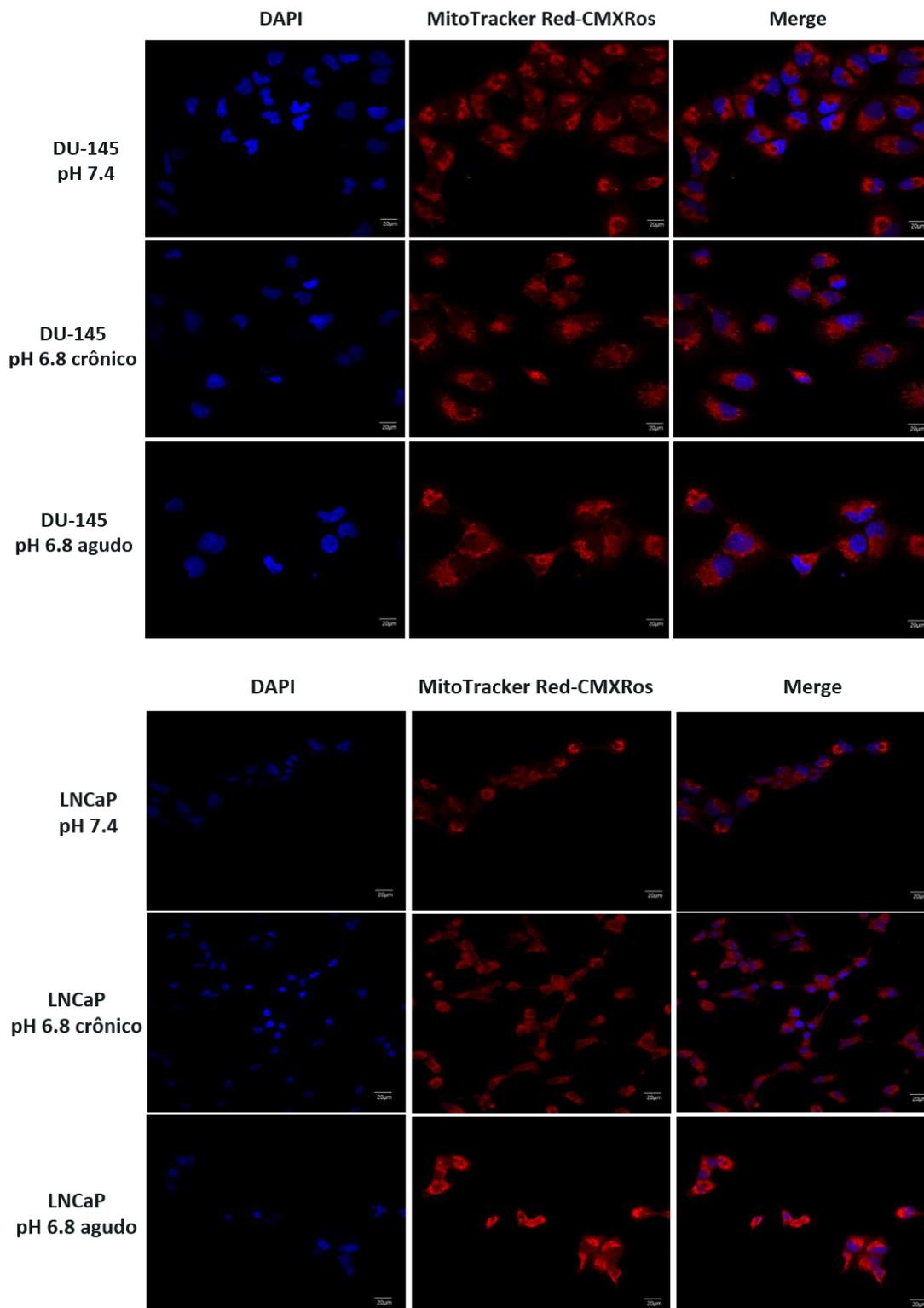


Figura 4.9. Distribuição de mitocôndrias em células DU-145 e LNCaP cultivadas em pH 7,4 e sob acidose extracelular. As mitocôndrias foram marcadas com o corante MitoTracker Red CMXRos e os núcleos com DAPI. As imagens são seções ópticas medianas de pilhas z obtidas por microscopia confocal, Barra de escala, 20 μm .

Além de avaliar qualitativamente a distribuição mitocondrial os níveis de potencial da membrana mitocondrial foram também avaliados por citometria de fluxo para as células DU-145. É possível observar uma maior atividade mitocondrial, através e um aumento no potencial de membrana das mitocôndrias, nas células sob acidose (crônica e aguda) a partir de 48 h de cultivo quando comparadas as células cultivadas em pH 7,4 (Figura 4.10). Um aumento gradual e significativo no potencial de membrana pode ser observado em células cultivadas cronicamente em pH 6,8, por até 72 h, mesmo em comparação à condição aguda.

4.8 Expressão alterada de genes associados à via metabólica glicolítica

A expressão de genes da via glicolítica foi avaliada por RT-qPCR para as células DU-145 nas diferentes condições de cultivo. Genes diretamente envolvidos com a via glicolítica, como *GLUT1*, *MCT4*, *HK2*, *PKM2*, *G6PD* apresentaram menor expressão nas células cultivadas cronicamente em pH 6,8, diferindo significativamente das células cultivadas em pH 7,4 e em pH 6,8 de forma aguda (Figura 4.11). No entanto, o gene *LDHA* apresentou maior expressão nas células cultivadas cronicamente em pH 6,8 em comparação com os demais grupos ($p < 0,001$).

Dessa forma, os genes associados à glicólise estão regulados negativamente nas células adaptadas ao cultivo crônico em pH 6,8, enquanto se apresentaram aumentados nas células expostas de forma aguda ao meio ácido. Além disso, genes codificadores de fatores de transcrição e proteínas que atuam de forma direta e indireta na regulação dos genes anteriormente mencionados, como os genes *HIF1* e *c-Myc*, também se mostraram aumentados nas células expostas de forma aguda ao meio ácido (Figura 4.11).

4.9 Alteração na sensibilidade celular frente a inibidores metabólicos

Tendo em vista o perfil bioenergético e a resposta transcricional apresentada pelas células em acidose crônica, foi avaliado o efeito de inibidores metabólicos que atuam diretamente em enzimas chave da via glicolítica na sobrevivência celular (Figura 4.12). Foi realizado um ensaio de citotoxicidade utilizando dois inibidores que atuam principalmente sobre a hexoquinase 2 (HK2), 2-deosoxiglicose (2DG) e 3-bromopiruvato (3BrP), para a obtenção dos valores de IC50 para cada linhagem celular e condição de cultivo. Observamos que, para ambas as linhagens, a condição de acidose crônica foi mais sensível independente da droga (menor IC50) com diferença estatística significativa quando comparada a condição normal.

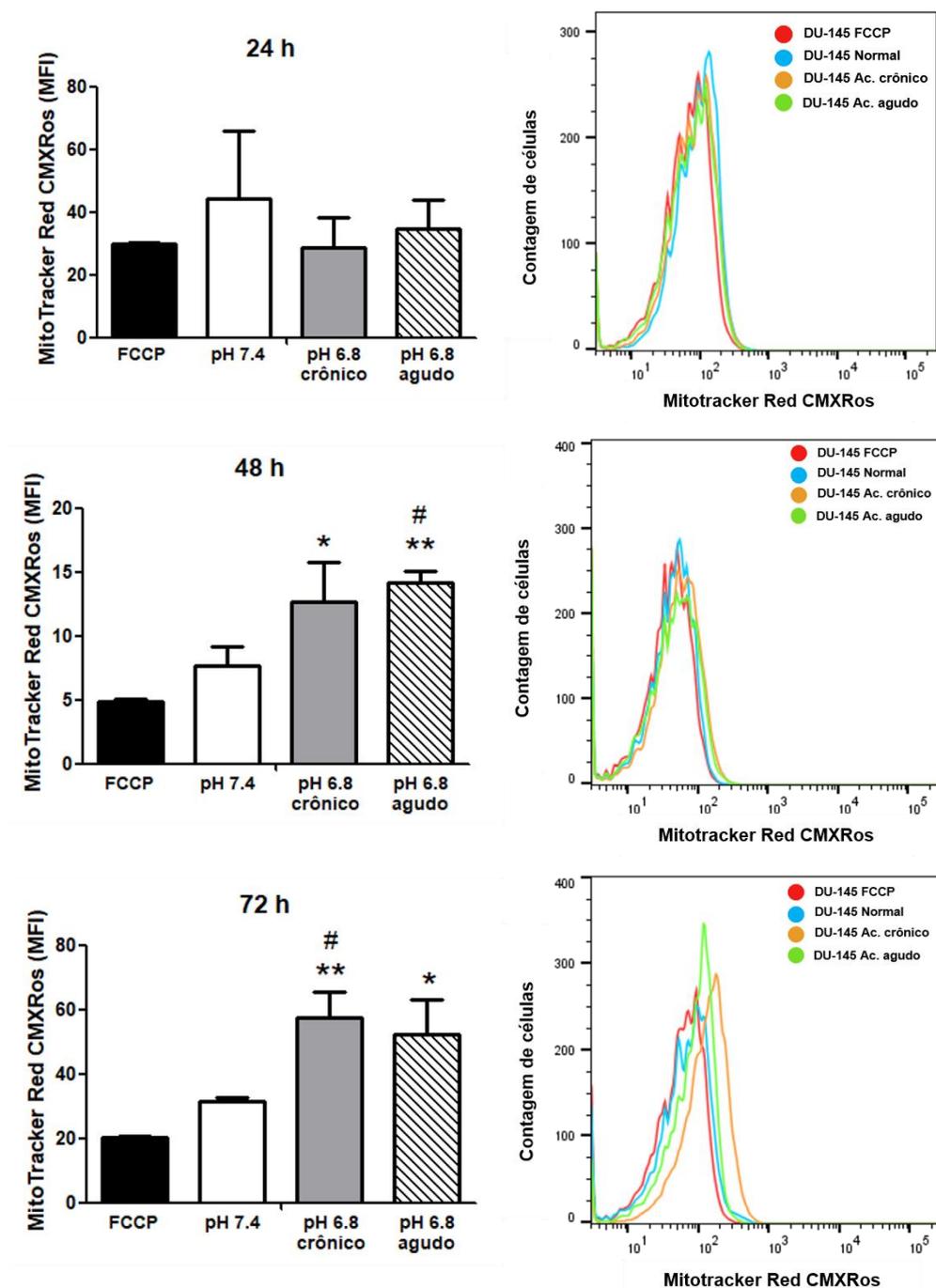


Figura 4.10. Potencial de membrana mitocondrial em células DU-145 cultivadas em diferentes pHs. Caracterização funcional das mitocôndrias através da mensuração do potencial de membrana mitocondrial com MitoTracker Red CMXRos por citometria de fluxo. FCCP (1 μ M) foi utilizado como controle positivo para a despolarização da membrana mitocondrial. À direita, o histograma representativo da citometria de fluxo com Mitotracker Red CMXRos e à esquerda gráficos de barra de MFI (intensidade média de fluorescência). Os dados representam a média \pm desvio padrão em triplicata técnica. Uma análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4 e # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico.

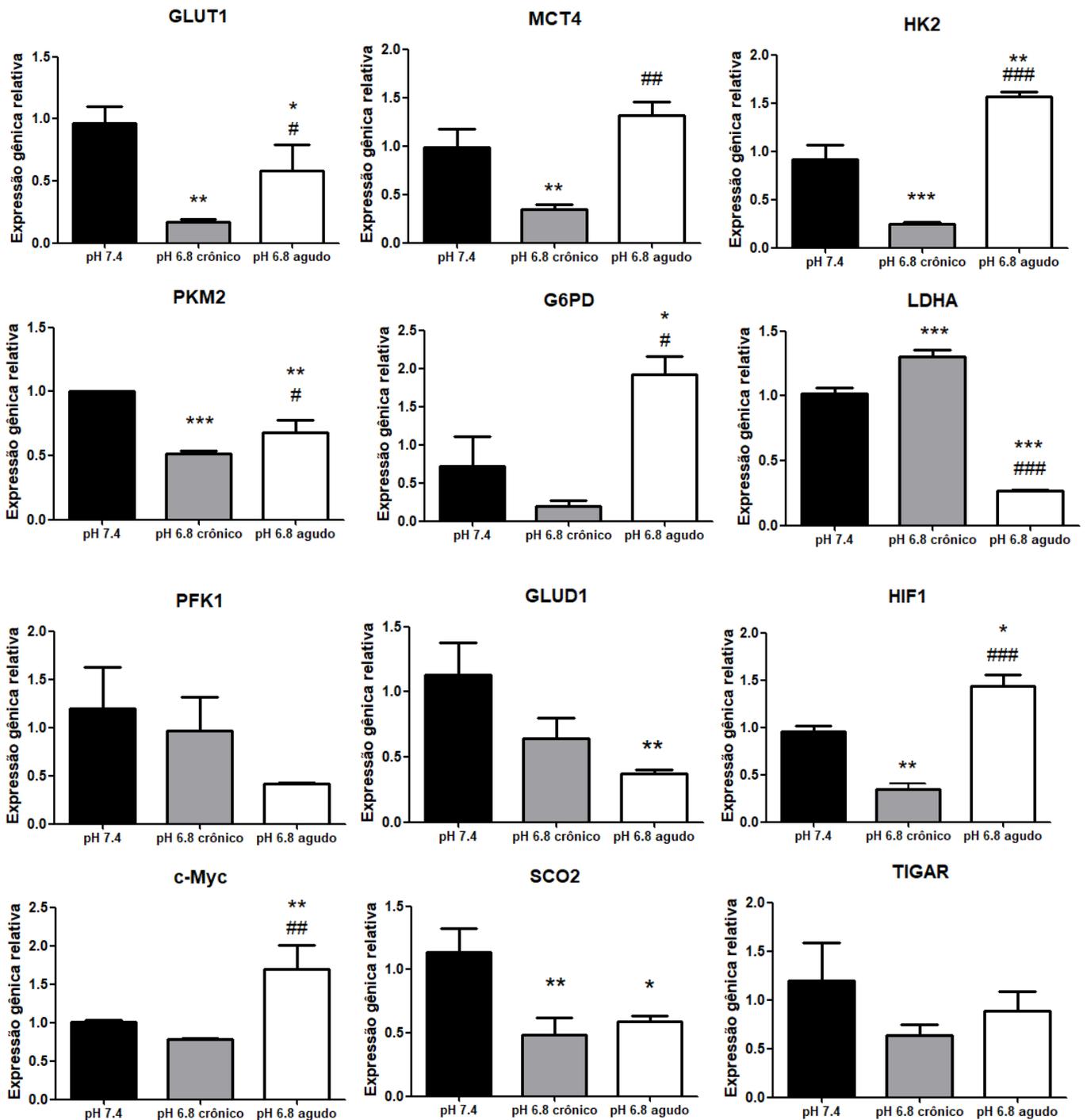


Figura 4.11. Expressão de genes envolvidos em rotas metabólicas em células DU-145. c-Myc - proto-oncogene MYC; G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase; GLUD1 - Glutamato Desidrogenase 1; GLUT1 – Transportador de glicose 1; HIF1 – Fator induzível por hipóxia 1; HK2 – Hexoquinase 2; LDHA – Lactato desidrogenase; MCT4 – Transportador de monocarboxilato 4; PFK1 – Fosfofrutoquinase 1; PKM2 – Piruvato quinase M2; SCO2 – Proteína de montagem do citocromo C oxidase 2; TIGAR - Regulador de glicólise e apoptose induzível por TP53. Os dados representam a média \pm desvio padrão da análise em triplicata técnica. A análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4, *** $p < 0.001$ vs. pH 7,4, # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico, ## $p < 0.01$ vs. pH 6,8 crônico e ### $p < 0.001$ vs. pH 6,8 crônico.

Ainda, a condição de acidose aguda demonstrou valores similares a condição de cultivo em pH 7,4 (Figura 4.12). Os valores de IC50 para cada droga e cada linhagem celular estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de IC50 de inibidores metabólicos.

Linhagem	Condição	IC50 – 2DG (mM)	IC50 – 3BrP (µM)
DU-145	pH 7,4	12,30	41,83
	pH 6,8 crônico	2,52	13,77
	pH 6,8 agudo	14,65	47,74
LNCaP	pH 7,4	0,2618	11,85
	pH 6,8 crônico	0,0665	2,74
	pH 6,8 agudo	0,3273	11,60

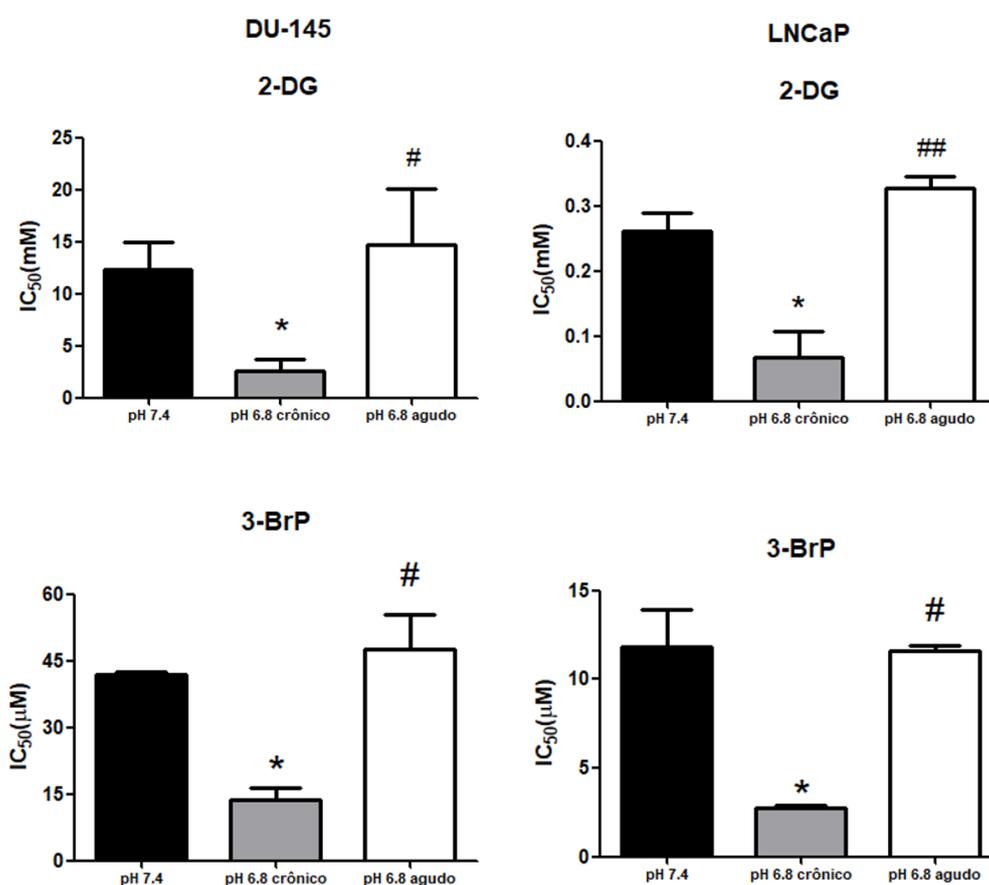


Figura 4.12. Determinação do IC50 para inibidores do metabolismo energético em células DU-145 e LNCaP cultivadas em diferentes condições de pH extracelular. Ambas as linhagens celulares foram tratadas com diferentes doses de cada composto. A partir da curva de crescimento celular foi calculada a dose que inibe o crescimento de 50% das células (IC50). 2DG – 2-deosoxiglicose; 3-BrP – 3- bromopiruvato. Os dados representam a média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós-teste de Tukey considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico, ## $p < 0.01$ vs. pH 6,8 crônico de 2 experimentos independentes, em triplicata técnica para cada composto.

4.10 Alteração na viabilidade celular frente a drogas metabólicas

Diante dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, o efeito dos inibidores metabólicos (2DG e 3BrP) e das condições de cultivo sobre a viabilidade celular foram avaliados, o valor de IC50 obtido para as células cultivadas em pH 7,4, além de incluir uma condição com as duas drogas combinadas. Os resultados mostraram uma diminuição na viabilidade celular de células DU-145 cronicamente expostas ao meio ácido em comparação com o grupo de pH 7,4 e o grupo de exposição aguda após 48 h (Figura 4.13). O tratamento com os inibidores foi eficaz na redução da viabilidade das células de todos os grupos, em menor grau para a condição de exposição aguda ao pH 6,8. A 2DG diminuiu significativamente após 24 h a viabilidade das células em pH 7,4 e o grupo adaptado ao pH 6,8.

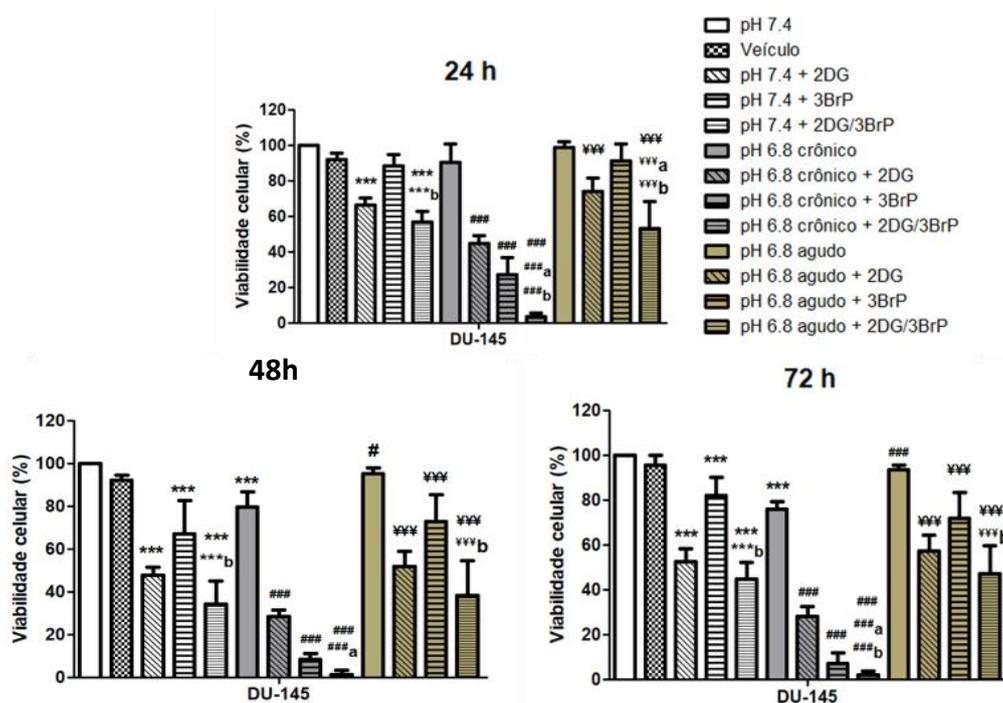


Figura 4.13. Efeito de inibidores do metabolismo em células DU-145 cultivadas sob diferentes condições de pH extracelular. Avaliação de viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT em três diferentes tempos de tratamento com os inibidores 2-deosoxiglicose (2DG) e 3-bromopiruvato 3-BrP. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes, em triplicata técnica para cada condição. Uma análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós teste de Tukey considerando significativo * $p < 0.05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0.01$ vs. pH 7,4, *** $p < 0.001$ vs. pH 7,4, # $p < 0.05$ vs. pH 6,8 crônico, ## $p < 0.01$ vs. pH 6,8 crônico e ### $p < 0.001$ vs. pH 6,8 crônico. ¥ $p < 0.05$ vs. pH 6,8 agudo, ¥¥ $p < 0.01$ vs. pH 6,8 agudo, ¥¥¥ $p < 0.001$ vs. pH 6,8 agudo, ***a: $p < 0.001$ vs. 2DG/pH 7,4, ###a: $p < 0.001$ vs. 2DG/pH 6,8 crônico, ¥¥¥a: $p < 0.001$ vs. 2DG/pH 6,8 agudo, ***b: $p < 0.001$ vs. 3BrP/pH 7,4, ###b: $p < 0.001$ vs. 3BrP/pH 6,8 crônico, ¥¥¥b: $p < 0.01$ vs. 3BrP/pH 6,8 agudo e ¥¥¥b: $p < 0.001$ vs. 3BrP/pH 6,8 agudo.

O efeito do inibidor 3BrP foi muito eficaz e significativo para a redução de células viáveis em condição adaptada ($####b < 0,001$). O efeito redutor das células viáveis foi ainda maior quando drogas combinadas foram usadas em comparação com células não tratadas ou células tratadas com apenas uma das drogas, para todas as condições e novamente mais expressiva para a condição adaptada a pH 6,8 (Figura 4.13).

Em contrapartida, o efeito dos inibidores na linhagem LNCaP foi proporcional ao tempo de tratamento. Após 72 horas na presença destas drogas podemos observar uma redução da viabilidade celular para todas as condições de cultivo, exceto para a droga 3BrP (Figura 4.14). Uma resposta mais eficaz de tratamento foi com a droga 2DG, a qual proporciona a redução de célula viáveis independente da condição de pH em que as células foram cultivadas e esta resposta reflete na influência da condições de drogas combinadas (2DG+3BrP), a qual parece ser a efetora do tratamento, já que não difere da condição com apenas 2DG (Figura 4.14).

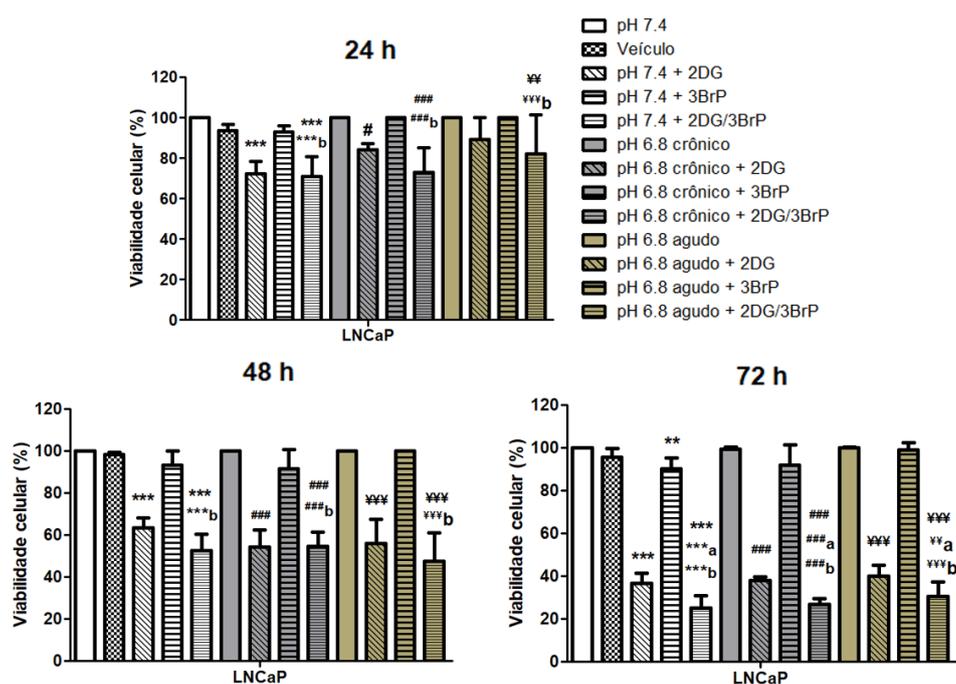


Figura 4.14. Efeito de inibidores do metabolismo em células LNCaP cultivadas sob diferentes condições de pH extracelular. Avaliação de viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT em três diferentes tempos de tratamento com os inibidores 2-deosoxiglicose (2DG) e 3-bromopiruvato 3-BrP. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes, em triplicata técnica para cada condição. Uma análise estatística foi realizada usando ANOVA com pós teste de Tukey considerando significativo * $p < 0,05$ vs. pH 7,4, ** $p < 0,01$ vs. pH 7,4, *** $p < 0,001$ vs. pH 7,4, # $p < 0,05$ vs. pH 6,8 crônico, ## $p < 0,01$ vs. pH 6,8 crônico e ### $p < 0,001$ vs. pH 6,8 crônico. ¥ $p < 0,05$ vs. pH 6,8 agudo, ¥¥ $p < 0,01$ vs. pH 6,8 agudo, ¥¥¥ $p < 0,001$ vs. pH 6,8 agudo, ***a: $p < 0,001$ vs. 2DG/pH 7,4, ###a: $p < 0,001$ vs. 2DG/pH 6,8 crônico, ¥¥¥a: $p < 0,001$ vs. 2DG/pH 6,8 agudo, ***b: $p < 0,001$ vs. 3BrP/pH 7,4, ###b: $p < 0,001$ vs. 3BrP/pH 6,8 crônico, ¥¥b: $p < 0,01$ vs. 3BrP/pH 6,8 agudo e ¥¥¥b: $p < 0,001$ vs. 3BrP/pH 6,8 agudo.

4.11 Efeitos da citotoxicidade com quimioterápicos

A resposta citotóxica frente ao quimioterápico cisplatina (CDDP) foi avaliada através do ensaio de sulforodamina B (SRB). A partir desses dados foi determinado o IC50 de cada linhagem celular e em cada condição de cultivo. As células em condição de acidose crônica se mostraram mais sensíveis ao fármaco (2,34 μM para DU-145 e 0,064 μM para LNCaP) quando comparadas às células cultivadas em pH 7,4 (9,09 μM para DU-145 e 0,178 μM para LNCaP) e sob acidose aguda (18,52 μM para DU-145 e 0,489 μM para LNCaP). As células sob acidose aguda se mostraram mais resistentes (maior IC50) ao quimioterápico que as células cultivadas em pH 7,4. Sendo assim, as linhagens adaptadas ao meio ácido podem ser cerca de três a quatro vezes mais sensíveis a ação da droga quando comparadas as células cultivadas em pH 7,4, dependendo da linhagem. Por outro lado, as células sob acidose aguda são cerca de duas vezes mais resistentes quando comparadas às células cultivadas em pH 7,4 (Figura 4.15).

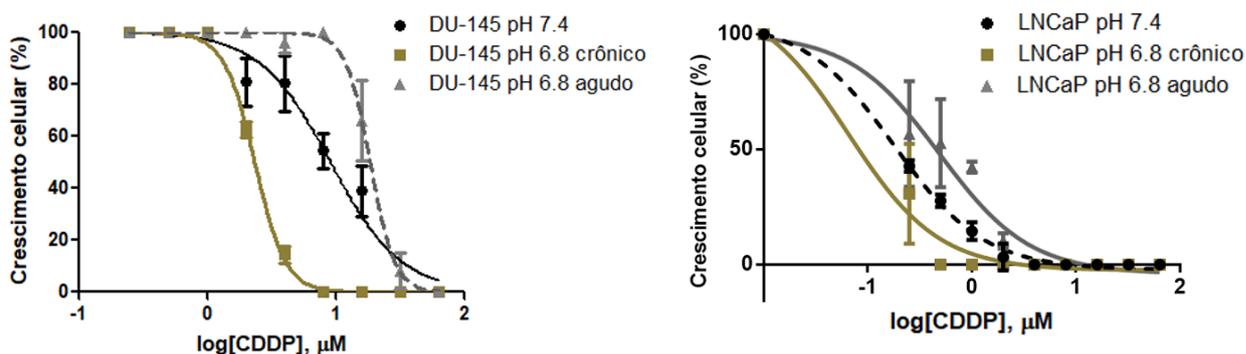


Figura 4.15. Citotoxicidade da cisplatina em células DU-145 e LNCaP cultivadas sob diferentes condições de pH extracelular. A partir de uma curva de regressão linear foi obtido o valor de IC50. Dados representativos foram mostrados para cada condição de cultivo para ambas as linhagens. O gráfico mostra a média \pm desvio padrão e o ensaio foi realizado em quadruplicata.

5. DISCUSSÃO

A reprogramação metabólica é um aspecto diferencial nas células cancerígenas, mas a escolha de captação energética adotada pelas células apresenta consequências no ambiente do próprio tumor, o meio extracelular será acidificado e somente células bem adaptadas sobreviverão, ao passo que este agente estressor proporciona vantagens a estas células adaptadas, garantindo benefícios para a progressão tumoral (KATO et al., 2013). Neste estudo propusemos avaliar as respostas bioenergéticas das células que se adaptam a esta condição de acidose tumoral, visando as alterações no perfil energético e modificações celulares que beneficiam as células tumorais em ambiente ácido, bem como a resposta destes grupos adaptados a drogas inibidoras de metabolismo glicolítico.

Nesse trabalho, linhagens celulares de câncer de próstata foram adaptadas ao cultivo sob acidose extracelular. Os achados do nosso trabalho estão de acordo com outros estudos que realizaram a adaptação de células em meio extracelular ácido (CORBET et al., 2014; DAMAGHI et al., 2015), nos quais as células inicialmente não se adaptam ao meio modificado e a manutenção do cultivo por longos períodos em meio ácido é necessária para que as células atinjam taxas de crescimento iguais às células normais.

A influência da acidose extracelular no desenvolvimento do câncer é amplamente investigada e a condição de exposição aguda e crônica deve ser levada em consideração. A resposta biológica nos ajuda a entender o processo de adaptação celular a uma condição estressora. A redução das taxas de crescimento celular sob acidose aguda durante o período adaptativo pode ser interpretada como uma resposta natural da população a um ambiente adverso e à seleção de fenótipos resistentes (MOELLERING et al., 2008), e essa condição induzirá processos apoptóticos (SMALLBONE; MAINI; GATENBY, 2010; JUSTUS; SANDERLIN; YANG, 2015; DONG et al., 2018).

Cronicamente, o ambiente acidificado atua como um agente estressor que seleciona as células resistentes a essa condição, as quais recuperam as taxas de crescimento (JUSTUS; SANDERLIN; YANG, 2015). Para alguns autores, a acidose crônica atua como uma pressão de seleção darwiniana, modificando a estabilidade genômica, induzindo a evolução somática dessas células (XIAO et al., 2003; WOJTKOWIAK et al., 2012). Outro fator que reforça este cenário adaptativo, em especial para a linhagem DU-145, é o tempo de duplicação das células. Quando expostas de forma crônica ao ambiente ácido ocorre uma seleção das células mais resistentes, proporcionando a recuperação das

taxas proliferativas, reduzindo ou se assemelhando ao tempo de duplicação de células cultivadas em pH 7,4 (JUSTUS; DONG; YANG, 2013).

A adaptação ao meio ácido foi acompanhada de modificações morfológicas em ambas as linhagens do estudo. Em comparação com as linhagens parentais cultivadas em pH 7,4, as células cultivadas em meio ácido adotaram um morfotipo mais mesenquimal. Esta mudança fenotípica, como consequência de estados adaptativos ao ambiente acidificado, vai ao encontro de outros trabalhos que induziram células à acidose extracelular observando uma alteração morfológica (DAMAGHI; GILLIES, 2017; PELLEGRINI et al., 2018).

A remodelação celular para um fenótipo mesenquimal traz à tona o conceito de “transição epitelial-mesenquimal”. Modificações no estado morfológico das células garantem mudanças na motilidade, proliferação e interações com o ambiente. Neste cenário, há a perda de um estado de menor motilidade para um cenário com remodelação citoesquelética e ganho de mobilidade e capacidade para invadir, devido ao morfotipo fusiforme e projeções de longos pseudópodes. Este processo está intimamente relacionado as propriedades invasivas e migratórias necessárias para o desfecho metastático (KALLURI; WEINBERG, 2009; YE; WEINBERG, 2015; THOMSON; BALCELLS; CASCANTE, 2019). Em contrapartida, as células DU-145 visualizadas por imunofluorescência apresentam outra dinâmica morfológica que não corrobora com os achados da microscopia óptica.

Ainda como consequência do estado proliferativo e morfológico das células cultivadas em meio ácido, observamos um perfil migratório diferenciado entre as linhagens e as condições de cultivo. As células DU-145 cultivadas em pH 7,4 e 6,8 crônico apresentaram maior motilidade quando comparadas a condição de pH 6,8 agudo. Estes achados vão ao encontro de outros estudos que investigaram a relação de ambientes ácidos e o aumento da migração celular, inclusive com características morfológicas semelhante às descritas neste estudo, as quais conduziram a um fenótipo metastático (DAMAGHI; GILLIES, 2017; LI et al., 2017; VANDER LINDEN; CORBET, 2019).

Enquanto isso, a migração das células de LNCaP se mostrou reduzida para todas as condições, especialmente para as células cultivadas em meio ácido, fato já evidenciado por estudos com outras linhagens celulares, que também apresentam características celulares responsivas aos hormônios andrógenos para promoção de processos proliferativos, ao passo que a linhagem DU-145 é andrógeno independente (CORCORAN et al., 2012; CUNNINGHAM; YOU, 2015).

A condição de acidificação do meio extracelular estimula processos relacionados a migração celular, como a ativação de enzimas que degradam e remodelam o MEC, estas são principalmente as MMPs e catepsinas, ou seja, proteases ativadas por pH ácido que dissolvem as aderências do substrato celular proporcionando a liberação de células invasivas (BROWN; MURRAY, 2015; YAMAMOTO; MURPHY; TROEBERG, 2015; BÅNG-RUDENSTAM; CEREZO-MAGAÑA; BELTING, 2019).

O fenótipo metabólico adquirido pelas células expostas à acidose confere uma vantagem proliferativa significativa, fornecendo biomassa para duplicação celular (PEPPICELLI et al., 2017a). O microambiente estimula alterações na resposta celular possibilitando a progressão do câncer, promovendo proliferação, evasão de apoptose, adaptação metabólica, migração e invasão, além de regulação do ciclo celular (ROMERO-GARCIA et al., 2011; WEBB et al., 2011; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

Em relação ao ciclo celular, as linhagens do estudo apresentaram diferentes resultados. O efeito do meio acidificado sob o ciclo celular é bem documentado pela literatura como um fator-chave para a proliferação celular (WEBB et al., 2011; PEPPICELLI et al., 2017a; WHITE; GRILLO-HILL; BARBER, 2017). A linhagem LNCaP apresentou pouca variação entre condições de cultivo, enquanto as células DU-145 tiveram alterações nas fases de duplicação celular ao longo do tempo, especialmente a condição adaptada ao pH 6,8. Esta promoção de entrada em fase G2/M ficou explícita para a condição adaptada de DU-145 após 48 horas de cultivo, este fenômeno é conduzido pelo aumento do pH intracelular, devido a atividade de transportadores de próton H⁺ para o meio extracelular. Esta alteração no ciclo celular pode também estar relacionada a função do complexo regulador de mitose frente ao ambiente modificado (RESHKIN et al., 2000; PUTNEY; BARBER, 2003).

A exposição ao meio ácido leva a uma diminuição do pH intracelular, gerando uma redução da atividade da ciclina B dependente quinase 1 (CDK1), por manter a fosforilação inibitória de CDK1 em Tyr15 (Cdk1-pTyr15) (PUTNEY; BARBER, 2003). Em contrapartida, a exposição prolongada ao ambiente ácido, juntamente com a ação de extrusão de prótons por alguns transportadores, leva a um aumento nos níveis da fosfatase CDC25, a qual desfosfolira Tyr25, conduzindo novamente ao aumento da quantidade de CDK1 ativa para promover a progressão de fase G2/M (PUTNEY; BARBER, 2004; WHITE; GRILLO-HILL; BARBER, 2017).

Em relação a morte celular, nossos achados diferem dos trabalhos encontrados na literatura, nos quais existem uma relação do baixo pH extracelular com a resistência à apoptose, apesar das células cancerígenas serem mais suscetíveis à apoptose devido constante ao estresse (RYDER et al., 2012; PEPPICELLI et al., 2014, 2019). Também foi possível observar uma resposta diferenciada entre as linhagens, principalmente quanto a condição de cultivo e tempo de exposição, ocorrendo maior taxa de apoptose nas células LNCaP adaptadas. Esta grande variação nas taxas de morte celular observada nas células LNCaP expostas ao meio ácido, pode estar relacionado a escassez de ATP, devido à falta de adaptação energética ou um ambiente hipóxico estressor (PEPPICELLI et al., 2017a).

Enquanto isso, as células DU-145 também modificaram sua resposta à sobrevivência quando expostas de forma crônica no meio ácido. Ao passo que, não há uma variação de morte celular em relação ao tempo de cultivo pode ser reflexo da ação de expressão gênica de alvos importante na sensibilização à apoptose, que juntamente a outros genes irão equilibrar a produção de espécies reativas de oxigênio (BENSAAD et al., 2006), as quais induzem a apoptose quando em altos níveis devido a permeabilização da mitocôndria e liberação de citocromo c, também sustentada por proteínas da família Bcl2 (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; DANHIER et al., 2017).

Outro fator que pode promover a morte celular de ambas as linhagens é a desregulação da via intrínseca de morte celular, a qual é mediada pelas mitocôndrias (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019). Sabe-se que membros da família Bcl-2 regulam esta via, onde em tecidos tumorais há uma regulação positiva desta proteína anti-apoptótica inibido o processo através da supressão de duas proteínas desencadeantes pró-apoptóticas (Bax e Bak) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; RYDER et al., 2012; RUSSO et al., 2018). A expressão da proteína Bax na linhagem DU-145 é amplamente discutida na literatura (CUNNINGHAM; YOU, 2015), enquanto alguns trabalhos comentam sua expressão (MU et al., 2013), outros grupos indicam sua ausência (NUTT et al., 2002), o que implicaria nos níveis baixos de apoptose mesmo com o passar do tempo de exposição.

Ao analisar a taxa de consumo de oxigênio (OCR), observamos que as células cultivadas em meio ácido aumentaram o consumo de oxigênio em parâmetros respiratórios importantes. Nossos achados vão ao encontro dos resultados obtidos por Khacho et al. (2014), os quais também evidenciam um aumento de parâmetros como, consumo basal e respiração máxima, além da capacidade reserva em células tumorais cultivadas em meio com pH 6,8, estes autores relacionam este cenário com a manutenção da função mitocondrial em ambientes hipóxicos, sendo conduzidos pelo estímulo da

acidose. As variáveis elevadas ou que se mantem estáveis refletem as condições adaptativas das células quando expostas ao meio ácido, configurando o aumento da demanda de ATP, ao mesmo tempo que demonstram o uso parcial da sua capacidade respiratória máxima o que conduz a uma capacidade reserva elevada (CHACKO et al., 2014; VAYALIL, 2019).

Este perfil bioenergético apresentado em nosso estudo, atrelado ainda a uma estabilização no vazamento de próton e no consumo não mitocondrial, realça a condição saudável das mitocôndrias e a ausência de estressores nestas células (CHACKO et al., 2014). A capacidade extra disponível nas células para produzir energia em resposta ao aumento do estresse está diretamente relacionada à sobrevivência celular, mesmo na privação de energia, aumentando sua viabilidade (NICHOLLS, 2009; PFLEGER; HE; ABDELLATIF, 2015). Em nosso estudo, os resultados obtidos nas análises de respirometria sugerem um estado mais oxidativo por parte das células sob acidose, mesmo que esse perfil mais oxidativo esteja geralmente associada a perfis não proliferativos ou que a acidose conduza a um estado mais glicolítico, o que vem sendo discutido por diversos estudos (XIE et al., 2014; VAYALIL; LANDAR, 2015).

O padrão oncobioenergético adotado pelas mitocôndrias pode variar conforme os estágios do desenvolvimento tumoral (VAYALIL; LANDAR, 2015). Foi observado que os fenótipos invasivos agressivos de câncer de próstata apresentam um perfil mais glicolítico enquanto um aumento na OXPHOS está associado a um estado pré-maligno. Em contrapartida, outras evidências estão moldando este conceito, esboçando uma escolha metabólica dual pelas células cancerígenas conforme as condições microambientais. Uma dessas condições é a acidose láctica, uma consequência do efeito Warburg que condiciona as células em estado glicolítico para outro mais oxidativo (XIE et al., 2014).

Apesar deste cenário menos glicolítico, muitas enzimas reguladoras deste perfil persistem sendo expressas (XIE et al., 2014; WU; YING; HU, 2016). Logo a condição de acidose traz outras vantagens a estas células, pois confere uma utilização de glicose de forma econômica e assim certa resistência à morte induzida por privação de glicose (WU; YING; HU, 2016). Levando em consideração estes conceitos, nossos achados revelam uma condição oxidativa das células tumorais em meio ácido, corroborando com os preceitos desenvolvidos por estudos atuais, os quais denominam o tecido tumoral neste estado como “tumores oxidativos” (LEHÚEDE et al., 2016). Este estado de maior OXPHOS e o metabolismo mitocondrial aumentado inclusive é relacionado ao

condicionamento de fenótipo metastático (LEBLEU et al., 2014; PISKOUNOVA et al., 2015).

O aumento do potencial de membrana mitocondrial (PMM) em ambas as condições ácidas corroboram com o perfil mais oxidativo observado para as células DU-145. O aumento da atividade mitocondrial, mesmo em ambiente ácido, demonstrando a atuação de um componente chave no armazenamento de energia durante a OXPHOS em condições estressoras (ZOROVA et al., 2018). O PMM reflete a condição da cadeia transportadora de elétrons, logo a eficiência na produção de ATP. Além disso, esta manutenção e alteração de atividade das mitocôndrias está diretamente atrelada ao apoio a proliferação de células cancerígenas (MARTÍNEZ-REYES et al., 2016). Em modelos animais, a atividade mitocondrial aumentada avaliada a partir do PMM correlacionou-se positivamente com o potencial tumorigênico e representa o perfil da maior parte da células iniciadoras de tumor (VIALE; CORTI; DRAETTA, 2015).

O aumento gradativo de PMM observado em nosso estudo reflete a resposta de células tumorais a acidose, a qual conduz as células a aumentar a atividade mitocondrial devido à queda no fornecimento de ATP, pois o potencial de membrana fornece a força motriz para a síntese de ATP nas mitocôndrias (ZOROVA et al., 2018). Assim como descrito por Khacho et al. (2014), PMM elevada, apesar da condição ácida, manifesta que a função respiratória mitocondrial foi preservada ou mantida pela ação da ATP sintase, o que resultaria em consumo de ATP. A reestruturação mitocondrial conduzida pela condição estressora também é modulada para evitar a fragmentação mitocondrial e morte celular induzida por hipóxia, promovendo a fusão mitocondrial e a remodelação da crista (KHACHO et al., 2014).

Os resultados das análises de expressão gênica (RT-qPCR) sugerem uma adaptação metabólica diferencial para as células cultivadas em meio ácido de forma aguda e crônica. Embora ambas as células cultivadas em meio ácido tenham apresentado um aumento no perfil oxidativo de acordo com os ensaios de respirometria, as células adaptadas ao cultivo crônico em meio ácido mostraram uma diminuição na expressão de genes associados a glicólise, enquanto as células expostas de forma aguda ao meio ácido apresentaram um aumento da expressão desses genes. Estes achados estão de acordo com trabalhos prévios, os quais mencionam a reprogramação metabólica sofrida pelas células tumorais adaptadas a um microambiente ácido com redução na glicólise e aumento da OXPHOS (CHEN et al., 2008; XIE et al. 2014; PEPPICELLI et al., 2017b).

Além disso, nossos resultados demonstram que as células expostas de forma aguda possuem metabolismo diferente das células adaptadas ao meio ácido. O estado hipóxico é uma condição conhecida por favorecer a expressão de diversos genes glicolíticos pela indução de HIF1, o qual encontra-se elevado nas células expostas de forma aguda ao meio ácido e diminuído em células adaptadas ao cultivo em meio ácido.

CORBET & FERON (2017) comentam o papel de mediador de *HIF1*, gene sensível a condições de O₂, regulando positivamente genes que também se apresentam elevados em nosso estudo, como *HK2*, *G6PD*, *PKM2* e *MCT4*. Logo, as células apresentam um cenário favorável à captação e fosforilação de glicose, favorecendo o fluxo glicolítico, mas acidificando o ambiente, devido a liberação de lactato pelos transportadores MCT4, o qual se mostrou fortemente expresso nas células DU-145 com exposição aguda a acidose extracelular induzida. Além disso, a superexpressão desse gene caracteriza tumores agressivos (GATENBY et al., 2006; ROMERO-GARCIA et al., 2011).

De acordo com diversos trabalhos publicados e revisados por CORBET & FERON (2017), este quadro de expressão de *HIF1* reflete um estado de hipóxia do ambiente, o qual utiliza de artifícios moleculares para induzir a captação de recursos, proporcionando o efeito Warburg. Outro fator transcricional com expressão elevada nas células expostas de forma aguda ao meio ácido é o *c-Myc*, também relacionado com a ativação de genes da via glicolítica, principalmente *HK2* e *PKM2*, contribuindo para a produção de energia através da glicólise, mas ao mesmo tempo está envolvido na transcrição de alvos que aumentam a biogênese mitocondrial e a função mitocondrial. Ainda assim, *c-Myc* é o principal responsável pela utilização de glutamina pelas células em proliferação (WANG et al., 2011).

Em contrapartida, um estado de acidose crônica parece conduzir à respiração mitocondrial nas células cancerígenas, com uma concomitante redução da glicólise como por intermédio da acidose láctica, gerando um aumento da dependência pela respiração aeróbica (CHEN et al., 2008; XIE et al., 2014), o que pode caracterizar o estado das células adaptadas a exposição crônica em ambiente ácido. Por outro lado, a expressão do gene *LDHA* se mostrou aumentada nas células adaptadas ao meio ácido, ao passo que este alvo está menos expresso nas células expostas de forma aguda ao meio com pH 6,8.

DEBERARDINIS et al. (2008) e XIE et al (2014) comentam a importância do gene *LDHA* na conversão de piruvato para lactato em células metastáticas, bem como regenerando o NAD⁺ em favor de um fluxo glicolítico. Sua expressão diferencial em células adaptadas ao meio ácido pode estar relacionada a ativação de vias alternativas de

captação energética, como o uso de lactato na geração de intermediários do ciclo TCA e seu papel como molécula reguladora da incorporação e metabolismo da glutamina (DE LA CRUZ-LÓPEZ et al., 2019).

O aumento no metabolismo deste aminoácido ocorre em situações de privação de glicose em que as células se adaptam utilizando substratos de outras vias, especialmente para alimentar o ciclo de Krebs, e em consequência da estabilização do HIF1- α pelo lactato (WARD; THOMPSON, 2012; RAJENDRAM; PREEDY; PATEL, 2015; DE LA CRUZ-LÓPEZ et al., 2019). Quando chega na mitocôndria, a glutamina passa por diversas conversões enzimáticas até ser incorporada no ciclo TCA na forma de α -cetoglutarato, e por fim gerando malato. Este último é exportado para o citoplasma onde é convertido em piruvato e posteriormente em lactato pela LDHA (RAJENDRAM; PREEDY; PATEL, 2015; DE LA CRUZ-LÓPEZ et al., 2019).

Apesar disso, as células expostas de forma crônica e aguda ao pH 6,8 apresentam uma redução de *GLUD1*, sendo significativo para a condição aguda. Tais achados vão ao encontro do estado de proliferação das células cancerígenas. O metabolismo de glutamina, em especial do glutamato derivado deste aminoácido é utilizado para gerar aminoácidos não essenciais, no entanto o estado celular irá variar o conjunto enzimático responsável pela metabolização. As células altamente proliferativas utilizam enzimas transaminases glutâmico-oxaloacéticas (GOT1 e GOT2), enquanto as células quiescentes metabolizam o glutamato através do *GLUD1*, para posteriores reações de descarboxilação no ciclo TCA (ABREGO et al., 2017; CRAZE et al., 2019).

Ao avaliar os aspectos bioenergéticos e transcricionais que descrevem opções metabólicas diferentes para as células DU-145 devemos levar em consideração a característica de heterogeneidade de fenótipos metabólicos, que ocorre tanto entre tumores como em regiões distintas do mesmo tumor, e ainda de acordo com o tecido de origem (ELIA et al., 2016; HENSLEY et al., 2016). Estudos recentes demonstram uma forte relação entre a acidose local e a aquisição de plasticidade metabólica conduzindo a reprogramação metabólica do tumor, mais especificamente ao obter um fenótipo híbrido entre glicólise e OXPHOS ou ainda ter a tendência para uma das vias (PEPPICELLI et al., 2016; SHIN; CHEONG, 2019). Este cenário de alternância entre vias garante a melhora na sobrevivência em condições adversas, fornecendo vantagens de crescimento na presença de substrato, no caso da glicólise, ao passo que proporciona o uso de substratos alternativos e resistência sob privação de glicose, devido ao fenótipo OXPHOS (DAR et al., 2017; PEPPICELLI et al., 2017b).

O perfil metabólico empregado pode diferir também de acordo com o ganho de potencial metastático das células tumorais. As células tumorais metastáticas fazem uso desta flexibilidade metabólica com o intuito de responder com eficiência as demandas que estão sob constantes mudanças no ambiente e optar pela via metabólica que garantirá sua sobrevivência (LEHÚEDE et al., 2016). Como diferencial, o metabolismo mitocondrial oxidativo tem se mostrado com um importante regulador da metástase tumoral, proporcionando em algumas linhagens celulares o aumento gradativo de características metastáticas conforme a atividade mitocondrial aumenta (MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007).

As células epiteliais prostáticas normais, diferentemente das maioria dos outros tecidos, utilizam mais a via da glicólise. No entanto, ao aparecer as lesões iniciais neste tecido ocorre a mudança progressiva para o metabolismo dependente de OXPHOS, resultando em um fenótipo metabólico misto ao decorrer do processo metastático, devido ao metabolismo extremamente energético em cada etapa (ELIA et al., 2016). Desta forma, este cenário é evidenciado em nossos achados para as células cultivadas em meio ácido, com o perfil das células expostas de forma crônica ao meio ácido lembrando o de células em estado inicial da doença ou já em estado metastático, enquanto as células expostas de forma aguda ao meio ácido apresentam perfil mais semelhante ao de células em um estado mais avançado de progressão do tumor.

A reprogramação metabólica atuará nas células cancerígenas como um meio de processo adaptativo no contexto do microambiente seletivo do tumor. O TME, as linhagens celulares e as interações com células benignas determinam a especificidade metabólica das células cancerígenas. Os estresses metabólicos conduzirão a adaptações metabólicas para o desenvolvimento das características malignas das células tumorais (SHIN; CHEONG, 2019).

Ambas as linhagens adaptadas em ambiente ácido demonstraram uma sensibilidade significativa a inibidores metabólicos específicos para a via da glicólise, os quais atuam principalmente inibindo a hexoquinase 2. Os inibidores, 2DG e 3BrP, representam drogas já em fase de implementação clínica visando o tratamento de tumores com metabolismo glicolítico (VANDER HEIDEN, 2011; LI; ZHANG, 2016). Este efeito de sensibilização a drogas anti-metabólicas pode estar relacionado com os baixos níveis de transcrição do gene codificador desta enzima nas células adaptadas ao meio ácido. Conforme Sullivan et al. (2014), o efeito dos inibidor 2DG é mais pronunciado em linhagens celulares com

baixa expressão de hexoquinase, devido a relação inibitória competitiva da glicose para os sítios catalíticos em HK.

Devido as modificações metabólicas em resposta a necessidade de sustentar altas taxas proliferativas, as células tumorais são altamente dependentes da via da glicólise (SEYFRIED; SHELTON, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esta resposta é extremamente relevante para o direcionamento de novas abordagens terapêuticas, permitindo uma potencial abordagem sobre enzimas importantes na glicólise (ATTIA et al., 2015). Os efeitos das drogas 2DG e 3BrP observados em nosso trabalho corroboram com a literatura, na qual uma diminuição significativa da viabilidade celular, principalmente de células adaptadas ao meio ácido, foi reportada (ATTIA et al., 2015). PICHLA et al. (2019) comentam ainda a relação dos efeitos da 3BrP com a mobilidade em células câncer de próstata metastático, no qual esta droga estaria sensibilizando e atuando como inibidor de metástase. Estes achados também são observados no presente trabalho, onde as células adaptadas apresentam uma alta capacidade migratória e sofrem drástica redução de viabilidade frente ao agente alquilante.

As modificações no TME conduzidas pela atividade das células cancerígenas favorecem a acidose tumoral que está intimamente relacionada a progressão do processo de tumorigênese, além de representar um importante mecanismo na assimilação ou absorção de drogas quimioterápicas (TRÉDAN et al., 2007; KOLOSENKO et al., 2017; LASFAR et al., 2019). Segundo WOJTKOWIAK et al. (2011), a resistência à terapia pode não estar somente relacionada a resistência bioquímica, conduzida por mutações em transportadores, mas também a uma condição fisiológica, no caso o pH, como reflexo de modificações microambientais do tumor.

Em nossos achados, as células adaptadas ao meio ácido apresentaram um aumento na sensibilidade à cisplatina e um aumento na resistência das células expostas de forma aguda ao pH ácido. Esta resposta em relação a droga pode estar relacionada a um mecanismo já descrito na literatura, chamado aprisionamento de íons (WOJTKOWIAK et al., 2011; KOLTAI, 2016). Este fenômeno é caracterizado por formar uma barreira fisiológica para quimioterápicos de acordo com sua característica ionizável, impedindo absorção de drogas de base fraca (KOLTAI, 2016; PELLEGRINI et al., 2018). Logo, o aprisionamento de íons ocorre quando há uma grande diferença de permeabilidade entre os elementos ionizados e não ionizadas de uma droga, que são impermeáveis e permeáveis à membranas, respectivamente (WOJTKOWIAK et al., 2011).

Como já mencionado, a resposta das drogas fracamente alcalinas são prejudicadas pelo ambiente ácido que impedem a entrada de componentes ionizáveis nas células conferindo resistência a tais drogas (PELLEGRINI et al., 2018). Em contrapartida, as drogas com aspecto fracamente ácido têm sua absorção favorecida por tal mecanismo, quando em pH baixo, isto por se tratar de uma droga não protonada, a qual terá a sua permeabilidade facilitada em microambiente ácido (GERWECK; VIJAYAPPA; KOZIN, 2006; KOLTAI, 2016).

A resposta das células sob cultivo ácido diferiram quanto à sensibilidade a CDDP. O mecanismo de aprisionamento de íons pode não ser o único responsável pela resposta à terapia, ao invés disso ser uma consequência do aspecto bioenergético. Isto porque sabe-se que a cisplatina pode afetar a função mitocondrial das células (GARRIDO et al., 2008; MARULLO et al., 2013; CHOI et al., 2015), afetando ainda mais as células adaptadas ao meio ácido que demonstram um perfil mais oxidativo e maior atividade mitocondrial.

O presente estudo evidenciou os processos adaptativos das células tumorais a um agente estressor, a acidose extracelular. A partir desta seleção foi possível observar modificações nas respostas celulares, em especial a proliferação e viabilidade das células. Ainda que houvesse diferenças nas respostas celulares entre linhagens de câncer de próstata, o cultivo nesta condição ácida conferiu também uma seleção de células com perfil bioenergético específico e diferenciado em resposta adaptativa em condições desfavoráveis, seja aguda ou crônica. Além de demonstrar um perfil mais oxidativo, as células em meio ácido, em especial as cultivadas de forma crônica, apresentaram uma resposta sensibilizadora a inibidores metabólicos. Diante desta resposta as drogas e o perfil de expressão de genes associados a via glicolítica podemos especular conceitos de plasticidade metabólica e ao mesmo tempo pensar em modulação destas vias a fim de propor alvos terapêuticos específicos para os grupos celulares que apresentam este perfil de acidose e modulação bioenergética, em uma tentativa para eliminar as células já em estado avançado da tumorigênese.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular com inibidores da rota de fosforilação oxidativa;
- Realizar ensaio com marcadores de massa mitocondrial e expressão gênica referente a biogênese de mitocôndrias (PGC1 α);
- Realizar ensaio com marcadores gênicos de vias alternativas, como da glutamina e fosforilação de ácidos graxos;
- Avaliar o potencial de membrana para a linhagem LNCaP, bem como realizar os ensaios de expressão dos genes de enzimas metabólicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREGO, J., GUNDA, V., VERNUCCI, E., SHUKLA, S. K., KING, R. J., DASGUPTA, A., ... & SINGH, P. K. GOT1-mediated anaplerotic glutamine metabolism regulates chronic acidosis stress in pancreatic cancer cells. *Cancer letters*, 400, 37-46, 2017.
- ATTIA, Y. M., EL-ABHAR, H. S., AL MARZABANI, M. M., & SHOUMAN, S. A. Targeting glycolysis by 3-bromopyruvate improves tamoxifen cytotoxicity of breast cancer cell lines. *BMC cancer*, 15(1): 838, 2015.
- BAGHDADI, H. H. Targeting cancer cells using 3-bromopyruvate for selective cancer treatment. *Saudi journal of medicine & medical sciences*, 5(1): 9, 2017.
- BÃNG-RUDENSTAM, A., CEREZO-MAGAÑA, M., & BELTING, M. Pro-metastatic functions of lipoproteins and extracellular vesicles in the acidic tumor microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(1-2): 79-92, 2019.
- BÉNÉTEAU, M., ZUNINO, B., JACQUIN, M. A., MEYNET, O., CHICHE, J., PRADELLI, L. A., ... & RICCI, J. E. Combination of glycolysis inhibition with chemotherapy results in an antitumor immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49): 20071-20076, 2012.
- BENSAAD, K., TSURUTA, A., SELAK, M. A., VIDAL, M. N. C., NAKANO, K., BARTRONS, R., ... & VOUSDEN, K. H. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126(1): 107-120, 2006.
- BORON, W. F. Regulation of intracellular pH. *Advances in physiology education*, 28(4): 160-179, 2004.
- BOROUGHES, L. K., & DEBERARDINIS, R. J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature cell biology*, 17(4): 351-359, 2015.
- BROWN, G. T.; MURRAY, G. I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *The Journal of pathology*, 237(3): 273-281, 2015.
- BUZZAI, M., BAUER, D. E., JONES, R. G., DEBERARDINIS, R. J., HATZIVASSILIOU, G., ELSTROM, R. L., & THOMPSON, C. B. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid β -oxidation. *Oncogene*, 24(26): 4165-4173, 2005.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2): 85-95, 2011.
- CHACKO, B. K., KRAMER, P. A., RAVI, S., BENAVIDES, G. A., MITCHELL, T., DRANKA, B. P., ... & HARDY, R. W. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clinical science*, 127(6): 367-373, 2014.
- CHEN, F., ZHUANG, X., LIN, L., YU, P., WANG, Y., SHI, Y., ... & SUN, Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC medicine*, 13(1): 45, 2015.
- CHEN, J. L. Y., LUCAS, J. E., SCHROEDER, T., MORI, S., WU, J., NEVINS, J., ... & CHI, J. T. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS genetics*, 4(12), 2008.

- CHOI, Y. M., KIM, H. K., SHIM, W., ANWAR, M. A., KWON, J. W., KWON, H. K., ... & KIM, H. S. Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *PloS one*, 10(8), 2015.
- CORBET, C., DRAOUI, N., POLET, F., PINTO, A., DROZAK, X., RIAN, O., & FERON, O. The SIRT1/HIF2 α axis drives reductive glutamine metabolism under chronic acidosis and alters tumor response to therapy. *Cancer research*, 74(19): 5507-5519, 2014.
- CORBET, C.; FERON, O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nature Reviews Cancer*, 17(10): 577, 2017.
- CORCORAN, C., RANI, S., O'BRIEN, K., O'NEILL, A., PRENCIPE, M., SHEIKH, R., ... & O'DRISCOLL, L. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PloS one*, 7(12), 2012.
- CRAZE, M. L., EL-ANSARI, R., ALESKANDARANY, M. A., CHENG, K. W., ALFARSI, L., MASISI, B., ... & GREEN, A. R. Glutamate dehydrogenase (GLUD1) expression in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 174(1): 79-91, 2019.
- CUNNINGHAM, D., & YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *Journal of biological methods*, 2(1): 17, 2015.
- DAMAGHI, M., TAFRESHI, N. K., LLOYD, M. C., SPRUNG, R., ESTRELLA, V., WOJTKOWIAK, J. W., ... & GILLIES, R. J. Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane. *Nature communications*, 6(1): 1-13, 2015.
- DAMAGHI, M.; GILLIES, R. Phenotypic changes of acid-adapted cancer cells push them toward aggressiveness in their evolution in the tumor microenvironment. *Cell Cycle*, 16(19): 1739-1743, 2017.
- DANHIER, P., BAŃSKI, P., PAYEN, V. L., GRASSO, D., IPPOLITO, L., SONVEAUX, P., & PORPORATO, P. E. Cancer metabolism in space and time: beyond the Warburg effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1858(8): 556-572, 2017.
- DAR, S., CHHINA, J., MERT, I., CHITALE, D., BUEKERS, T., KAUR, H., ... & RATTAN, R. Bioenergetic adaptations in chemoresistant ovarian cancer cells. *Scientific reports*, 7(1): 1-17, 2017.
- DE LA CRUZ-LÓPEZ, D., GRISELDA, K., CASTRO-MUÑOZ, L. J., REYES-HERNÁNDEZ, D. O., GARCÍA-CARRANCÁ, A., & MANZO MERINO, J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in oncology*, 9, 1143, 2019.
- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G., & THOMPSON, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7(1): 11-20, 2008.
- DEBERARDINIS, R. J., & CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), e1600200, 2016.
- DE LOOFF, M.; DE JONG, S.; KRUYT, F. A. E. Multiple interactions between cancer cells and the tumor microenvironment modulate TRAIL signaling: Implications for

- TRAIL receptor targeted therapy. *Frontiers in Immunology*, 10: 1–15, 2019.
- DE WEVER, O., NGUYEN, Q. D., VAN HOORDE, L., BRACKE, M., BRUYNEEL, E., GESPACH, C., & MAREEL, M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB Journal*, 18(9): 1016-1018, 2004.
- DEWHIRST, M. W.; CAO, Y.; MOELLER, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer*, 8(6): 425-437, 2008.
- DONG, B., ZHANG, X., FAN, Y., CAO, S., & ZHANG, X. Acidosis promotes cell apoptosis through the G protein-coupled receptor 4/CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein pathway. *Oncology letters*, 16(5): 6735-6741, 2018.
- DRAOUI, N.; FERON, O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease models & mechanisms*, 4(6), 727-732, 2011.
- DWARAKARNATH, B. S.; JAIN, V. Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. *Future oncology*, 5(5): 581-585, 2009.
- EHRKE, E.; AREND, C.; DRINGEN, R. 3-bromopyruvate inhibits glycolysis, depletes cellular glutathione, and compromises the viability of cultured primary rat astrocytes. *Journal of neuroscience research*, 93(7): 1138-1146, 2015.
- EL SAYED, S. M., EL-MAGD, R. A., SHISHIDO, Y., CHUNG, S. P., SAKAI, T., WATANABE, H., ... & FUKUI, K. D-amino acid oxidase gene therapy sensitizes glioma cells to the antiglycolytic effect of 3-bromopyruvate. *Cancer gene therapy*, 19(1): 1-18, 2012.
- ELIA, I., SCHMIEDER, R., CHRISTEN, S., & FENDT, S. M. Organ-specific cancer metabolism and its potential for therapy. In In: Herzig S. (eds) *Metabolic Control. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 233. Springer, Cham. 321-353, 2016.
- EMON, B., BAUER, J., JAIN, Y., JUNG, B., & SAIF, T. Biophysics of tumor microenvironment and Cancer metastasis-a mini review. *Computational and structural biotechnology journal*, 16: 279-287, 2018.
- ERRA DÍAZ, F.; DANTAS, E.; GEFFNER, J. Erra Díaz, F., Dantas, E., & Geffner, J. Unravelling the Interplay between Extracellular Acidosis and Immune Cells. *Mediators of inflammation*, 2018, 2018.
- ESTRELLA, V., CHEN, T., LLOYD, M., WOJTKOWIAK, J., CORNNELL, H. H., IBRAHIM-HASHIM, A., ... & JOHNSON, J. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer research*, 73(5): 1524-1535, 2013.
- FISCHER, K., HOFFMANN, P., VOELKL, S., MEIDENBAUER, N., AMMER, J., EDINGER, M., ... & RENNERT, K. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9): 3812-3819, 2007.
- GALLAGHER, S. M.; CASTORINO, J. J.; PHILP, N. J. Interaction of monocarboxylate transporter 4 with β 1-integrin and its role in cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(3): C414-C421, 2009.
- GANAPATHY-KANNIAPPAN, S.; GESCHWIND, J. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular cancer*, 12:152, 2013

- GARCIA, S. B.; NOVELLI, M.; WRIGHT, N. A. The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *International journal of experimental pathology*, 81(2): 89-116, 2000.
- GARRIDO, N., PÉREZ-MARTOS, A., FARO, M., LOU-BONAFONTE, J. M., FERNÁNDEZ-SILVA, P., LÓPEZ-PÉREZ, M. J., ... & ENRÍQUEZ, J. A. Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *Biochemical Journal*, 414(1): 93-102, 2008.
- GATENBY, R. A., GAWLINSKI, E. T., GMTRO, A. F., KAYLOR, B., & GILLIES, R. J. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer research*, 66(10): 5216-5223, 2006.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature reviews cancer*, 4(11): 891-899, 2004.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(1): 56-61, 2008.
- GERWECK, L. E.; VIJAYAPPA, S.; KOZIN, S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Molecular cancer therapeutics*, 5(5): 1275-1279, 2006.
- GILLIES, R. J.; VERDUZCO, D.; GATENBY, R. A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nature Reviews Cancer*, 12(7): 487-493, 2012.
- GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews Drug discovery*, 12(12): 931-947, 2013.
- GRADA, A., OTERO-VINAS, M., PRIETO-CASTRILLO, F., OBAGI, Z., & FALANGA, V. Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2): e11-e16, 2017.
- GRILLO-HILL, B. K., CHOI, C., JIMENEZ-VIDAL, M., & BARBER, D. L. Increased H⁺ efflux is sufficient to induce dysplasia and necessary for viability with oncogene expression. *Elife*, 4, e03270, 2015.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3): 309–322, 2012.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646–74, 2011.
- HARGUINDEY, S., ORIVE, G., PEDRAZ, J. L., PARADISO, A., & RESHKIN, S. J. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin—one single nature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1756(1): 1-24, 2005.
- HEIDEN, M. G. VANDER; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930): 1029–1033, 2009.
- HENSLEY, C. T., FAUBERT, B., YUAN, Q., LEV-COHAIN, N, JIN, E... & WODZAK, M. Metabolic heterogeneity in human lung tumors. *Cell*, 164(4): 681-694, 2016.

- HOXHAI, G.; MANNING, B. D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 1-15, 2019.
- HULIKOVA, A., HARRIS, A. L., VAUGHAN-JONES, R. D., & SWIETACH, P. Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 228(4): 743-752, 2013.
- JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9(4): 239–252, 2009.
- JUSTUS, C. R.; DONG, L.; YANG, L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Frontiers in Physiology*, 4: 1–9, 2013.
- JUSTUS, C. R.; SANDERLIN, E. J.; YANG, L. V. Molecular connections between cancer cell metabolism and the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5): 11055–11086, 2015.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428, 2009.
- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 392-401, 2006.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biology*, 12: 833–842, 2017.
- KATO, Y., OZAWA, S., MIYAMOTO, C., MAEHATA, Y., SUZUKI, A., MAEDA, T., & BABA, Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer cell international*, 13(1): 89, 2013.
- KHACHO, M., TARABAY, M., PATTEN, D., KHACHO, P., MACLAURIN, J. G., GUADAGNO, J., ... & SLACK, R. S. Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nature communications*, 5: 3550, 2014.
- KOLOSENKO, I., AVNET, S., BALDINI, N., VIKLUND, J., & DE MILITO, A. Therapeutic implications of tumor interstitial acidification. *In Seminars in cancer biology* (Vol. 43, pp. 119-133). Academic Press, 2017.
- KOLTAI, T. Cancer: Fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *OncoTargets and Therapy*, 9: 6343–6360, 2016.
- KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(5): 325–337, 2011.
- LAGADIC-GOSSMANN, D.; HUC, L.; LECUREUR, V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death & Differentiation*, 11(9): 953-961, 2004.
- LANGSTEN, K. L., KIM, J. H., SARVER, A. L., DEWHIRST, M., & MODIANO, J. F. Comparative approach to the temporo-spatial organization of the tumor microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 9: 1–18, 2019.
- LASFAR A., BALAN M., COHEN SOLAL K.A., & ZLOZA A. Tumor microenvironment and resistance to current therapies. *Frontiers in Oncology*, 9: 1131, 2019.

- LE FLOCH, R., CHICHE, J., MARCHIQ, I., NAIKEN, T., ILC, K., MURRAY, C. M., ... & POUYSSÉGUR, J. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40): 16663-16668, 2011.
- LEBLEU, V. S., O'CONNELL, J. T., HERRERA, K. N. G., WIKMAN, H., PANTEL, K., HAIGIS, M. C., ... & ASARA, J. M. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature cell biology*, 16(10): 992-1003, 2014.
- LEHUÉDÉ, C., DUPUY, F., RABINOVITCH, R., JONES, R. G., & SIEGEL, P. M. Metabolic plasticity as a determinant of tumor growth and metastasis. *Cancer research*, 76(18): 5201-5208, 2016.
- LI, C., MENG, G., SU, L., CHEN, A., XIA, M., XU, C., ... & WEI, J. Dichloroacetate blocks aerobic glycolytic adaptation to attenuated measles virus and promotes viral replication leading to enhanced oncolysis in glioblastoma. *Oncotarget*, 6(3), 1544, 2015.
- LI, F., WANG, Y., ZELLER, K. I., POTTER, J. J., WONSEY, D. R., O'DONNELL, K. A., ... & DANG, C. V. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 25(14): 6225-6234, 2005.
- LI, X., LU, J., KAN, Q., LI, X., FAN, Q., LI, Y., ... & WANG, J. Metabolic reprogramming is associated with flavopiridol resistance in prostate cancer DU145 cells. *Scientific reports*, 7(1): 1-20, 2017.
- LI, Z.; ZHANG, H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2): 377–392, 2016.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2): 329–333, 2007.
- LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3): 211–218, 2016.
- LIU, Y., CAO, Y., ZHANG, W., BERGMEIER, S., QIAN, Y., AKBAR, H., ... & HINES, J. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 11(8): 1672-1682, 2012.
- LUNT, S. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1): 441–464, 2011.
- MAMAN, S.; WITZ, I. P. A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer*, 18(6): 359–376, 2018.
- MARTÍNEZ-REYES, I., DIEBOLD, L. P., KONG, H., SCHIEBER, M., HUANG, H., HENSLEY, C. T., ... & DUFOUR, E.. TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Molecular Cell*, 61 (2): 199–209, 2016.
- MARULLO, R., WERNER, E., DEGTYAREVA, N., MOORE, B., ALTAVILLA, G., RAMALINGAM, S. S., & DOETSCH, P. W. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and

bioenergetic functions. *PloS one*, 8(11), 2013.

MEIMA, M. E., WEBB, B. A., WITKOWSKA, H. E., & BARBER, D. L. The sodium-hydrogen exchanger NHE1 is an Akt substrate necessary for actin filament reorganization by growth factors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39): 26666-26675, 2009.

MERIC-BERNSTAM, F., & MILLS, G. B. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 9(9): 542, 2012.

MICHELAKIS, E. D., SUTENDRA, G., DROMPARIS, P., WEBSTER, L., HAROMY, A., NIVEN, E., ... & ABDULKARIM, B. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Science translational medicine*, 2(31): 31ra34-31ra34, 2010.

MOELLERING, R. E., BLACK, K. C., KRISHNAMURTY, C., BAGGETT, B. K., STAFFORD, P., RAIN, M., ... & GILLIES, R. J. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clinical and Experimental Metastasis*, 25(4): 411–425, 2008.

MOHAMED, M. M., & SLOANE, B. F. Multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(10): 764-775, 2006

MORENO-SÁNCHEZ, R., RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S., MARÍN-HERNÁNDEZ, A., & SAAVEDRA, E. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*, 274(6): 1393-1418, 2007.

MU, D., GAO, Z., GUO, H., ZHOU, G., & SUN, B. Sodium butyrate induces growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer DU145 cells by up-regulation of the expression of annexin A1. *PLoS One*, 8(9), 2013.

NAKANO, A., TSUJI, D., MIKI, H., CUI, Q., EL SAYED, S. M., IKEGAME, A., ... & FUJII, S. Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. *PloS one*, 6(11), 2011.

Nicholls, D. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. *Biochemical Society Transactions*, 37(6): 1385, 2009.

NUTT, L. K., CHANDRA, J., PATAER, A., FANG, B., ROTH, J. A., SWISHER, S. G., ... & MCCONKEY, D. J. Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23): 20301-20308, 2002.

O'NEILL, S., PORTER, R. K., MCNAMEE, N., MARTINEZ, V. G., & O'DRISCOLL, L. 2-Deoxy-D-Glucose inhibits aggressive triple-negative breast cancer cells by targeting glycolysis and the cancer stem cell phenotype. *Scientific Reports*, 9(1); 1–11, 2019.

OLIVEIRA, K. A., ZECCHIN, K. G., ALBERICI, L. C., CASTILHO, R. F., & VERCESI, A. E. Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(4): 307-314, 2008.

PARKS, S. K., CHICHE, J., & POUYSSÉGUR, J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(9): 611, 2013.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1): 27–47, 2016.

PELLEGRINI, P., SERVISS, J.T., LUNDBÄCK, T., BANCARO, N., MAZURKIEWICZ, M., ... & DE MILITO, A.A drug screening assay on cancer cells

chronically adapted to acidosis. *Cancer cell international*, 18(1): 1-15, 2018.

PEPPICELLI, S., BIANCHINI, F., TORRE, E., & CALORINI, L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 31(4): 423–433, 2014.

PEPPICELLI, S., TOTI, A., GIANNONI, E., BIANCHINI, F., MARGHERI, F., DEL ROSSO, M., & CALORINI, L. Metformin is also effective on lactic acidosis-exposed melanoma cells switched to oxidative phosphorylation. *Cell Cycle*, 15(14): 1908-1918, 2016.

PEPPICELLI, S., ANDREUCCI, E., RUZZOLINI, J., LAURENZANA, A., MARGHERI, F., FIBBI, G., ... & CALORINI, L. The acidic microenvironment as a possible niche of dormant tumor cells. *Cellular and molecular life sciences*, 74(15): 2761-2771, 2017a.

PEPPICELLI, S., ANDREUCCI, E., RUZZOLINI, J., MARGHERI, F., LAURENZANA, A., BIANCHINI, F., & CALORINI, L. Acidity of microenvironment as a further driver of tumor metabolic reprogramming. *J Clin Cell Immunol*, 8(485): 2, 2017b.

PEPPICELLI, S., RUZZOLINI, J., BIANCHINI, F., ANDREUCCI, E., NEDIANI, C., LAURENZANA, A., ... & CALORINI, L. Anoikis resistance as a further trait of acidic-adapted melanoma cells. *Journal of oncology*, 2019, 2019.

PFLEGER, J.; HE, M.; ABDELLATIF, M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death and Disease*, 6,(7): 1–14, 2015.

PHAN, L. M.; YEUNG, S. C. J.; LEE, M. H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biology and Medicine*, 11(1): 1–19, 2014.

PICHLA, M., SROKA, J., PIENKOWSKA, N., PIWOWARCZYK, K., MADEJA, Z., BARTOSZ, G., & SADOWSKA-BARTOSZ, I. Metastatic prostate cancer cells are highly sensitive to 3-bromopyruvic acid. *Life sciences*, 227: 212-223, 2019.

PILLAI, S. R., DAMAGHI, M., MARUNAKA, Y., SPUGNINI, E. P., FAIS, S., & GILLIES, R. J. Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(1-2): 205-222, 2019.

PILON-THOMAS, S., KODUMUDI, K.N., EL-KENAWI, A.E., RUSSELL, S., WEBER, A.M., LUDDY, K.,... & GILLIES, R.J. Neutralization of tumor acidity improves antitumor responses to immunotherapy. *Cancer research*, 76(6): 1381-1390, 2016.

PISKOUNOVA, E., AGATHOCLEOUS, M., MURPHY, M.M., HU, Z., HUDDLESTUN, S. E., ZHAO, Z.,... & MORRISON, S.J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, 527(7577): 186-191, 2015.

PORPORATO, P. E., PAYEN, V. L., PÉREZ-ESCUREDO, J., DE SAEDELEER, C. J., DANHIER, P., COPETTI, T., ... & FERON, O. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell reports*, 8(3), 754-766, 2014.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental cell research*, 283(1), 1-16, 2003.

- PUTNEY, L. K.; BARBER, D. L. Na-H Exchange-dependent Increase in Intracellular pH Times G2/M Entry and Transition. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45): 44645-44649, 2003.
- PUTNEY, L. K.; BARBER, D. L. Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1. *BMC genomics*, 5(1): 46, 2004.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11): 1423–1437, 2013.
- RAGHUNAND, N.; MAHONEY, B. P.; GILLIES, R. J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochemical Pharmacology*, 66(7): 1219–1229, 2003.
- RAJENDRAM, R., PREEDY, V. R., & PATEL, V. B. (Eds.). Glutamine in clinical nutrition. Springer New York. Ed.1, p. 551, 2015.
- RESHKIN, S. J., BELLIZZI, A., CALDEIRA, S., ALBARANI, V., MALANCHI, I., POIGNEE, M., ... & TOMMASINO, M. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *The FASEB Journal*, 14(14): 2185-2197, 2000.
- ROMERO-GARCIA, S., LOPEZ-GONZALEZ, J. S., B´EZ-VIVEROS, J. L., AGUILAR-CAZARES, D., & PRADO-GARCIA, H. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer biology & therapy*, 12(11): 939-948, 2011.
- ROTH V. 2006 Doubling Time Computing, Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>, 2006.
- RUSSO, A., CARDILE, V., GRAZIANO, A. C., AVOLA, R., BRUNO, M., & RIGANO, D. Involvement of Bax and Bcl-2 in induction of apoptosis by essential oils of three Lebanese Salvia species in human prostate cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 19(1): 292, 2018.
- RYDER, C. ET AL. RYDER, C., MCCOLL, K., ZHONG, F., & DISTELHORST, C. W. Acidosis promotes Bcl-2 family-mediated evasion of apoptosis: Involvement of acid-sensing G protein-coupled receptor GPR65 signaling to MEK/ERK. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33): 27863-27875, 2012.
- SCHAFFER, Z. T., GRASSIAN, A. R., SONG, L., JIANG, Z., GERHART-HINES, Z., IRIE, H. Y., ... & BRUGGE, J. S. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461(7260): 109-113, 2009.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101–1108, 2008.
- SCHULZE, A.; HARRIS, A. L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*, 491(7424): 364–373, 2012.
- SEMENZA, G. L. Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate. *Journal of Clinical Investigation*, 118(12): 3835–3837, 2008.
- SEYFRIED, T. N., & SHELTON, L. M. Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism*, 7(1): 7., 2010.

- SHARMA, A.; BOISE, L. H.; SHANMUGAM, M. Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. *Cancers*, 11(8): 1–20, 2019.
- SHIEH, A. C. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(5): 1379–1389, 2011.
- SHIN, M. K.; CHEONG, J. H. Mitochondria-centric bioenergetic characteristics in cancer stem-like cells. *Archives of Pharmacal Research*, 4(2): 113–127, 2019.
- SHOSHAN, M. C. 3-bromopyruvate: Targets and outcomes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(1): 7–15, 2012.
- SMALLBONE, K.; MAINI, P. K.; GATENBY, R. A. Episodic, transient systemic acidosis delays evolution of the malignant phenotype: Possible mechanism for cancer prevention by increased physical activity. *Biology Direct*, 5(1), 22, 2010.
- SMOLKOVÁ, K., BELLANCE, N., SCANDURRA, F., GÉNOT, E., GNAIGER, E., PLECITÁ-HLAVATÁ, L.,... & ROSSIGNOL, R. Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 42(1): 55-67, 2010.
- SONG, C. W., LEE, H., DINGS, R. P., WILLIAMS, B., POWERS, J., DOS SANTOS, T., ... & PARK, H. J. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Scientific reports*, 2: 362, 2012.
- SONG, C. W.; GRIFFIN, R.; PARK, H. J. Influence of Tumor pH on Therapeutic Response. In: *Cancer drug resistance* (pp. 21-42). Humana Press, 2006.
- SULLIVAN, E. J., KURTOGLU, M., BRENNEMAN, R., LIU, H., & LAMPIDIS, T. J. Targeting cisplatin-resistant human tumor cells with metabolic inhibitors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 73(2), 417-427, 2014.
- STOCK, C., GASSNER, B., HAUCK, C. R., ARNOLD, H., MALLY, S., EBLE, J. A., ... & SCHWAB, A. Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *The Journal of physiology*, 567(1): 225-238, 2005.
- STOCK, C.; SCHWAB, A. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 458(5): 981–992, 2009.
- STÜWE, L., MÜLLER, M., FABIAN, A., WANING, J., MALLY, S., NOËL, J., ... & STOCK, C. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *The Journal of physiology*, 585(2): 351-360, 2007.
- SUN, Y., LIU, Z., ZOU, X., LAN, Y., SUN, X., WANG, X., ... & LIU, H. Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 47(4): 319-329, 2015.
- TENNANT, D. A.; DURÁN, R. V.; GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 10(4): 267–277, 2010.
- THOMSON, T. M.; BALCELLS, C.; CASCANTE, M. Metabolic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of clinical medicine*, 8(7): 967, 2019.
- TRÉDAN, O., GALMARINI, C. M., PATEL, K., & TANNOCK, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19): 1441-1454, 2007.

- TURLEY, S. J.; CREMASCO, V.; ASTARITA, J. L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 15(11): 669–682, 2015.
- VALENTI, D.; VACCA, R. A.; DE BARI, L. 3-Bromopyruvate induces rapid human prostate cancer cell death by affecting cell energy metabolism, GSH pool and the glyoxalase system. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 47(6): 493-506, 2015.
- VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9): 671–684, 2011.
- VANDER LINDEN, C.; CORBET, C. Therapeutic targeting of cancer stem cells: Integrating and exploiting the acidic niche. *Frontiers in Oncology*, 9: 1–12, 2019.
- VAYALIL, P. K. Mitochondrial oncobioenergetics of prostate tumorigenesis (Review). *Oncology Letters*, 18(5): 4367–4376, 2019.
- VAYALIL, P. K.; LANDAR, A. Mitochondrial oncobioenergetic index: A potential biomarker to predict progression from indolent to aggressive prostate cancer. *Oncotarget*, 6(40): 43065–43080, 2015.
- VIALE, A.; CORTI, D.; DRAETTA, G. F. Tumors and mitochondrial respiration: a neglected connection. *Cancer research*, 75(18): 3685–3686, 2015.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3): 1112–1116, 2006.
- WANG, M., ZHAO, J., ZHANG, L., WEI, F., LIAN, Y., WU, Y., ... & LI, X. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5): 761, 2017.
- WANG, R., DILLON, C. P., SHI, L. Z., MILASTA, S., CARTER, R., FINKELSTEIN, D., ... & GREEN, D. R. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 35(6): 871-882, 2011.
- WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*, 21(3): 297–308, 2012.
- WEBB, B.A., CHIMENTI, M., JACOBSON, M.P., & BARBER, D.L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 11(9): 671-677, 2011.
- WHEATON, W. W., WEINBERG, S. E., HAMANAKA, R. B., SOBERANES, S., SULLIVAN, L. B., ANSO, E., ... & CHANDEL, N. S. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *elife*, 3: e02242, 2014.
- WHITE, K. A.; GRILLO-HILL, B. K.; BARBER, D. L. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(4): 663–669, 2017.
- WOJTKOWIAK, J. W., VERDUZCO, D., SCHRAMM, K. J., & GILLIES, R. J. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Molecular pharmaceutics*, 8(6): 2032-2038, 2011.
- WOJTKOWIAK, J.W., ROTHBERG, J.M., KUMAR, V., SCHRAMM, K. J., HALLER, E., PROEMSEY, J.B., ... & GILLIES, R.J. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. *Cancer research*, 72(16): 3938-3947, 2012.
- WU, H.; YING, M.; HU, X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget*, 7(26): 40621–40629, 2016.

- XIAO, H., LI, T. K., YANG, J. M., & LIU, L. F. Acidic pH induces topoisomerase II-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9): 5205-5210, 2003.
- XIE, J., WU, H., DAI, C., PAN, Q., DING, Z., HU, D., ... & HU, X. Beyond Warburg effect—dual metabolic nature of cancer cells. *Scientific reports*, 4: 4927, 2014.
- YAMAMOTO, K.; MURPHY, G.; TROEBERG, L. Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biology*, 44: 255-263, 2015.
- YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S., & MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1): 134, 2012.
- YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial–mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in cell biology*, 25(11): 675-686, 2015.
- YUAN, T. L., & CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41): 5497-5510, 2008.
- YUAN, Y., JIANG, Y. C., SUN, C. K., & CHEN, Q. M. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications. *Oncology reports*, 35(5): 2499-2515, 2016.
- ZHANG, D., LI, J., WANG, F., HU, J., WANG, S., & SUN, Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer letters*, 355(2): 176-183, 2014.
- ZHANG, X. D., DESLANDES, E., VILLEDIEU, M., POULAIN, L., DUVAL, M., GAUDUCHON, P., ... & ICARD, P. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer research*, 26(5A): 3561-3566, 2006.
- ZHONG, D., XIONG, L., LIU, T., LIU, X., LIU, X., CHEN, J., ... & ZHOU, W. The glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose activates multiple prosurvival pathways through IGF1R. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35): 23225-23233, 2009.
- ZHU, J.; THOMPSON, C. B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(7): 436–450, 2019.
- ZOROVA, L. D., POPKOV, V. A., PLOTNIKOV, E. Y., SILACHEV, D. N., PEVZNER, I. B., JANKAUSKAS, S. S., ... & SOLLITT, S. J. Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552: 50-59, 2018.

8. CURRÍCULO VITAE RESUMIDO

WEBER, A. F.; WEBER, AUGUSTO FERREIRA; WEBER, AUGUSTO F

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Augusto Ferreira Weber

Local e data de nascimento: Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 11/11/1993.

Endereço profissional:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia

Avenida Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 salas 206/204

91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: (051) 33086070

E-mail: augustof.weber@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

2018- Atual

Mestrado em Biologia Celular e Molecular;

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil;

Título: Adaptação e reprogramação metabólica em células de câncer de próstata sob acidose extracelular induzida;

Orientadores: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira e Dra. Karina Mariante Monteiro;

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2013 - 2017

Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado;

Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Santa Cruz Do Sul, Brasil;

Título: Análise de expressão de marcadores genéticos de metástase via transição epitelial-mesenquimal em pacientes com câncer de pulmão

Orientador: Dra. Lia Gonçalves Possuelo, Dra. Luciana de Souza Nunes (Co-orientador);

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

3. ESTÁGIOS:

2013 - 2016

Bolsista de Iniciação científica (Carga horária: 20 h)

Agência de Fomento: Programa UNISC de Bolsas de Iniciação Científica (PUIC);

Instituição: UNISC, Laboratório de Genética e Biotecnologia;

Orientador: Profa. Dra. Lia Gonçalves Possuelo;

Atividades desenvolvidas: Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade, além de discriminação alélica em indivíduos com doença pulmonar.

2016 - 2017

Bolsista de Iniciação científica (Carga horária: 20 h)

Agência de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);

Instituição: UNISC, Laboratório de Genética e Biotecnologia;

Orientador: Profa. Dra. Lia Gonçalves Possuelo;

Atividades desenvolvidas: Discriminação alélica utilizando o sistema TaqMan (PCR em tempo real) em indivíduos com doença pulmonar, além de expressão gênica de mRNA e miRNA em amostras de tecido pulmonar.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2016 - Most influential articles of 2015 (Multidisciplinary Respiratory Medicine) "Da Silva, A. L. G. et al. DNA damage and cellular abnormalities in tuberculosis (...)", According to Altmetric.com;

2015 - Prêmio Destaque na Iniciação Científica - UNISC 2015, Universidade de Santa Cruz do Sul.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

SCHNEIDER, M. R.; DA SILVA, A.L.G.; GOULART, C.L.; SCHNEIDERS, P.B.; **WEBER, A.F.**; POSSUELO, L.G.; VALIM, A.R.M. Deoxyribonucleic acid damage and repair response in the chemotherapy of lung cancer: cross-sectional study. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3):e20180655, 2019.

WEBER, A.F.; BRESCIANI, M.J.; KARNOPP, T.E.; VALIM, A.R.M.; DA SILVA, A.L.G.; POSSUELO, L.G. Avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único em gene promotor da citocina inflamatória IL6 quanto à susceptibilidade em doenças pulmonares. *Revista Jovens Pesquisadores*, 6:60 - 71, 2016.

DA SILVA, A.L.G.; KARNOPP, T.E.; **WEBER, A.F.**; GOULART, C.L.; SCHNEIDERS, P.B.; CARDOSO, D.M.; CARVALHO, L.L.; ELLWANGER, J.H.; POSSUELO, L.G.; VALIM, A.R.M. DNA damage and repair capacity in lymphocyte of chronic obstructive pulmonary diseases patients during physical exercise with oxygen supplementation. *Multidisciplinary respiratory medicine*, 11:1-7, 2016.

DA SILVA, A.L.G.; BRESCIANI, M.J.; KARNOPP, T.E.; **WEBER, A.F.**; ELLWANGER, J.H.; HENRIQUES, J.A.P.; VALIM, A.R.M.; POSSUELO, L.G. DNA

damage and cellular abnormalities in tuberculosis, lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. *Multidisciplinary respiratory medicine*, 10:38, 2015.

SCHNEIDERS, P. B.; KARNOPP, T. E.; **WEBER, A. F.**; GOULART, C. L.; VALIM, A. R. M.; POSSUELO, L. G.; SILVA, A. L. G. Perfil tabágico e clínico dos portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica que participam de pesquisa clínica, em Santa Cruz do Sul - RS. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 5:37-41, 2015.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ALLGAYER, M. F.; **WEBER, A. F.**; BRESCIANI, M. J.; VALIM, ANDREIA R.M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Analysis of Genetic Polymorphisms and Its Relationship as Susceptibility Tuberculosis, a Case-Control Study In: Reunion de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB), 2016, Rosario, Santa Fe, Argentina, 2016.

DRUMM, M. E. G. O.; POSSUELO, L. G.; RENNEN, J. D. P.; **WEBER, A. F.** Caracterização de pacientes notificados com SRAG no Rio Grande do Sul, 2014-2016 In: II Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Promoção da Saúde, Santa Cruz do Sul – RS, 2016.

WEBER, A. F.; BRESCIANI, M. J.; POSSUELO, L. G.; SEHABIAGUE, M. P. C.; VALIM, A. R. M.; MONTEIRO, K. M.; HEIN, R. I. O impacto da expressão de E-caderina no prognóstico do câncer de pulmão de não pequenas células em humanos In: II Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Promoção da Saúde, Santa Cruz do Sul – RS, 2016.

WEBER, A. F.; BRESCIANI, M. J.; SCHNEIDER, M. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Polimorfismo em VDR FokI (rs2228570) e a relação com susceptibilidade ao câncer de pulmão In: II Congresso Brasileiro Interdisciplinar de Promoção da Saúde, Santa Cruz do Sul – RS, 2016.

KARNOPP, T. E.; **WEBER, A. F.**; BRESCIANI, M. J.; POSSUELO, L. G.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G. Avaliação do Dano e Capacidade de Reparação do DNA de Portadores de Câncer de Pulmão em Santa Cruz do Sul RS In: 19º Congresso Brasileiro de Oncologia Clínica, Foz do Iguaçú, Paraná – Brasil, 2015.

BRESCIANI, M. J.; **WEBER, A. F.**; KARNOPP, T. E.; ROSA, D. N.; MORAIS, F.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Avaliação no Dano do DNA em Pacientes com Câncer de Pulmão Através do Teste de Micronúcleo no Município de Santa Cruz do Sul In: 19º Congresso Brasileiro de Oncologia Clínica, Foz do Iguaçú, Paraná – Brasil, 2015.

BRESCIANI, M. J.; **WEBER, A. F.**; KARNOPP, T. E.; ROSA, D. N.; ELLWANGER, J. H.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Avaliação no Dano do DNA Através do Teste de Micronúcleo em Portadores de Doenças Pulmonares, do Município de Santa Cruz do Sul, RS In: XIX Congresso Brasileiro de Infectologia, 2015, Gramado - RS, 2015.

SILVA, A. L. G.; BRESCIANI, M. J.; KARNOPP, T. E.; **WEBER, A. F.**; ELLWANGER, J. H.; HENRIQUES, J. A. P.; VALIM, A. R. M.; POSSUELO, L. G. DNA damage and cellular abnormalities detected by micronucleus assay in patients with COPD, tuberculosis and lung cancer In: 46th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases (The Union), Cape Town - South Africa, 2015.

REIS, A. J.; **WEBER, A. F.**; PUNTEL, M. A.; NUNES, L. S.; VALIM, A. R. M.; POSSUELO, L. G. Perfil Clínico e Epidemiológico de Pacientes Diagnosticados com Tuberculose em uma Unidade Prisional In: XIX Congresso Brasileiro de Infectologia, Gramado, RS, 2015.

WEBER, A. F.; KARNOPP, T. E.; BRESCIANI, M. J.; ROSA, D. N.; MORAIS, F.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Polimorfismos em Citocinas Pró-Inflamatórias e a susceptibilidade ao Câncer de Pulmão In: 19º Congresso Brasileiro de Oncologia Clínica, Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil, 2015.

WEBER, A. F.; BRESCIANI, M. J.; ROSA, D. N.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Polimorfismos em Genes de Citocinas Pró-Inflamatória e o Risco a Tuberculose no Sul do Brasil In: XIX Congresso Brasileiro de Infectologia, Gramado, RS, 2015.

REIS, A. J.; **WEBER, A. F.**; SCAINI, J.; VALENCA, M.; NUNES, L. S.; VON GROLL, A.; ALMEIDA, P.; POSSUELO, L. G. Transmissão Recente de Cepas em Duas Unidades Prisionais do Rio Grande do Sul In: XIX Congresso Brasileiro de Infectologia, Gramado, RS, 2015.

WEBER, A. F.; SILVA, A. L. G.; VALIM, A. R. M.; POSSUELO, L. G.; KARNOPP, T. E.; BRESCIANI, M. J.; CARVALHO, L. L. Análise do Polimorfismo -174G>C (rs1800795) Quanto a Susceptibilidade a Tuberculose, Um Estudo Caso-Controlle In: VII meeting of the Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB), Canela – RS, 2014.

BRESCIANI, M. J.; KARNOPP, T. E.; **WEBER, A. F.**; CARVALHO, L. L.; VALIM, A. R. M.; SILVA, A. L. G.; POSSUELO, L. G. Avaliação no Dano do DNA Através do Teste de Micronúcleo em Portadores de Tuberculose, No Município de Santa Cruz Do Sul In: VII meeting of the Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB), Canela – RS, 2014.

SCHNEIDERS, P. B.; KARNOPP, T. E.; **WEBER, A. F.**; BRESCIANI, M. J.; VALIM, A. R. M.; POSSUELO, L. G.; SILVA, A. L. G. História Tabágica dos Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) que Participam de Pesquisa Clínica In: IX Congresso Brasileiro de Epidemiologia, Vitória – ES, 2014.