

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**O PAPEL DA UPR (UNFOLDED PROTEIN
RESPONSE) NA RESISTÊNCIA A DROGAS DE
CÉLULAS ENDOTELIAIS EM RESPOSTA AO
ESTRESSE CAUSADO PELO pH ÁCIDO
TUMORAL**

Fernanda Visioli

Porto Alegre, agosto de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**O PAPEL DA UPR (UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) NA RESISTÊNCIA A
DROGAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM RESPOSTA AO ESTRESSE
CAUSADO PELO pH ÁCIDO TUMORAL**

Fernanda Visioli

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Tese apresentada como parte dos pré-requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Patologia Bucal.

Porto Alegre, agosto de 2011.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Co-orientador: Prof. Dr. Peter J. Polverini

CIP - Catalogação na Publicação

Visioli, Fernanda

O PAPEL DA UPR (UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) NA
RESISTÊNCIA A DROGAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM
RESPOSTA AO ESTRESSE CAUSADO PELO pH ÁCIDO TUMORAL /
Fernanda Visioli. -- 2011.

92 f.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Coorientador: Peter J Polverini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2011.

1. Câncer bucal. 2. angiogênese tumoral. 3.
unfolded protein response. 4. células endoteliais.
5. acidez tumoral. I. Rados, Pantelis Varvaki,
orient. II. Polverini, Peter J, coorient. III. Título.

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

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos."

Charles Chaplin

A Marcos Denardin, quem esteve ao meu lado desde o início desta caminhada, e mesmo antes que ela começasse.

Tu me deste todo o apoio que eu precisava para tomar até as decisões mais difíceis. Tu estiveste sempre do meu lado,

me ouvindo, me dando força, me incentivando na busca pelos meus ideais, sempre com muito amor e carinho para

me confortar. Por tudo isso, por seres quem és, te agradeço

muito e te dedico este trabalho.

Aos meus pais, Silvana e Sérgio Visioli, por todo amor, por serem meu porto seguro, por estarem sempre presentes e sempre dispostos a ajudar. Porque me indicaram caminhos, mostraram-me como andar pelas próprias pernas e, assim, deram-me meios para escolher e trilhar o caminho que escolhi! Obrigado por sempre acreditarem na minha capacidade!

Agradecimentos

No decorrer desta jornada pude contar com o apoio direto e indireto de muitas pessoas, o que foi fundamental para a realização desse trabalho. Meu profundo agradecimento a todas elas e, em especial:

Ao meu irmão Bruno Marco pela amizade, companheirismo e paciência, pelo teu jeito divertido que torna minha vida mais alegre. A todos os meus familiares, que sempre me deram amor e força, acreditando no meu potencial. À família Denardin, que me acolheu e me recebeu, por toda atenção e carinho.

Ao Professor Pantelis Varvaki Rados por sempre me incentivar na busca do conhecimento, sendo exemplo de conduta profissional, caráter, determinação e disciplina, mas principalmente pela amizade construída ao longo desses anos. Obrigado por tudo, sempre!

Ao Professor Manoel Sant'Ana Filho pelas sábias idéias, ensinamentos e empenho no intuito de chegar à excelência. Pelas oportunidades de discussão e aprendizagem, sempre intensas e repletas de possibilidades.

À Isabel da Silva Lauxen, pela tua competência incomum e tua disponibilidade em todos os momentos. Por ter contribuído tanto e ter participado do meu crescimento e do meu aprendizado, eu te agradeço muito sinceramente.

Ao Professor Peter Polverini, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e acima de tudo pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Jacques E. Nör por abrir portas e oportunidades a muitos estudantes. Pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, auxílio e incentivo nos momentos mais difíceis.

À Chris Krebs Danilecvickz e à Alessandra Magnusson pela parceria e convivência maravilhosas. Mas principalmente pela amizade e pela força que me deram em todos os momentos.

Ao Professor Vinícius Coelho Carrard, pelo ombro e ouvidos sempre disponíveis, obrigado pela amizade e apoio constantes durante toda a pós-graduação.

Ao Professor Marcelo Lamers, amigo de longa data. Desde a época do cursinho pré-vestibular e da graduação, tua inteligência e dedicação me inspiram a me empenhar mais. Obrigado especialmente pela revisão técnica deste trabalho.

À Professora Anna Christina Medeiros Fossati, pela oportunidade de estágio como professora substituta, pelo bom humor constante e pelo exemplo de dedicação e amor ao que faz.

À Professora Manoela Domingues Martins, pelo entusiasmo contagiante e exemplo de profissional extremamente competente e dedicada.

Às Professoras Márcia Gaiger de Oliveira e Anna Cecília Chaves pela convivência e ensinamentos compartilhados durante o mestrado e doutorado.

Aos novos amigos feitos durante o estágio no exterior, Yugang Wang, Goleeta Alam, Yu Ning, Sudha Krishnamurthy, Kristy Warner, Zhizhong Dong, Zhaocheng

Zhang e Atsushi Imai, pela hospitalidade, pela paciência no meu aprendizado e pela inestimável colaboração na realização deste trabalho.

À Adriana Feres de Aguiar, agradeço o companheirismo, a convivência e todo o auxílio prestado.

Às minhas colegas de doutorado Ana Luisa Saraiva Homem de Carvalho, Laura de Campos Hildebrand e Francinne Miranda por todo o apoio e companheirismo durante este período. Vocês ajudaram a manter um ótimo astral durante todo esse tempo!

Às pessoas que fazem grande diferença na minha vida, meus inestimáveis amigos: Marina Azevedo, Ana Carolina Amorim Pellicoli, Juliana Scalco, Adriana Jou, Lisiane Bernardi, Leandro Nunes, Eliane Ferlin, Sara Cioccarri Oliveira, Márcia Payeras, Tenille Dal Bosco, Carolina Dubois; obrigado pela amizade incondicional e, por ao longo dos últimos três anos, compreenderem minhas frequentes ausências. Apesar disto, sempre estiveram por perto, me incentivando e apoiando minhas escolhas. Obrigado pela força de todas as horas!

A todos os outros funcionários, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

À CAPES e à 'Fundação Sharon and Larry Daniels Cancer Biology' pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract	14
Antecedentes e Justificativa	16
Angiogênese Tumoral	16
O Microambiente Tumoral	21
Estresse do Retículo Endoplasmático e A Unfolded Protein Response	24
A Unfolded Protein Response e o Câncer	30
Objetivos	34
Referências	38
Artigo Científico	45
Introduction.....	47
Methods	50
Results	56
Discussion.....	68
References	73
Conclusões	80
Considerações Finais	81
Referências	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bFGF	basic fibroblast growth factor
BiP	binding protein
CD31	PECAM-1
CEN	célula endotelial normal
CET	célula endotelial associada a tumores
CHOP	C/EBP homologous protein
DR5	death receptor 5
EGF	epidermal growth factor
EGM2	endothelial growth medium 2
Eif2α	eukaryotic initiation factor 2
ERAD	endoplasmic reticulum-associated degradation
FDA	food and drug administration
FGF-2	fibroblast growth factor-2
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRP78	glucose regulated protein 78
HCL	ácido clorídrico
HDMEC	células endoteliais humanas primárias microvasculares de derme

HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1 α
IRE1α	inositol requiring enzyme 1 α
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LCM	laser capture microdissection
MEF	mouse embryonic fibroblasts
mRNA	RNA mensageiro
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
p-Elf2α	eukaryotic initiation factor 2 phosphorylated
PERK	pancreatic ER eIF2 α kinase
PI	iodeto de propídio
RE	retículo endoplasmático
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
ShRNA	small harpain RNA
SiRNA	small interfering RNA
SRB	sulforodamina B
TGF-α	transforming growth factor alpha
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
UPR	unfolded protein response
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
XBP1	X-binding protein 1

RESUMO

A terapia antiangiogênica surgiu como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer. No entanto, evidências recentes mostram que as células endoteliais isoladas diretamente de um tumor maligno são mais resistentes a diferentes drogas do que as células endoteliais presentes no mesmo tecido normal. Essas diferenças podem ser atribuídas em parte à adaptação das células endoteliais ao microambiente tumoral. Uma característica singular do microambiente tumoral é a consistente acidificação do meio extracelular, cujos efeitos nas células endoteliais não são conhecidos. Acidez extracelular pode alterar múltiplas funções biológicas, causar estresse do retículo endoplasmático (RE) e ativação da Unfolded Protein Response (UPR). Células endoteliais humanas primárias de derme (HDMEC) cultivadas em pH 6.4, ajustado tanto com ácido láctico quanto com ácido clorídrico, apresentaram aumento da expressão de proteínas relacionadas à UPR, como GRP78, ATF4, elf2 α fosforilada e aumento na clivagem do mRNA de XBP1. Nessas condições massiva morte celular ocorreu após 48 horas. Em contrapartida, quando as células endoteliais eram expostas à acidez crônica não-letal com pH 7.0 durante sete dias, essas foram capazes de se adaptar coincidentemente com um aumento da expressão da proteína GRP78. Após sete dias sob pH 7.0, as células HDMEC apresentaram maior resistência à morte celular quando tratadas com as drogas Etoposide, Adriamicina e Sunitinib em doses que variavam entre 0.0025 μ M a 100 μ M. O silenciamento do gene GRP78 com ShRNA reverteu esse fenótipo resistente. Para determinar os níveis de UPR *in vivo* utilizou-se captura por microdissecção à laser de células endoteliais em lâminas histológicas de

carcinomas espinocelulares bucais. Observou-se um aumento significativo dos níveis de mRNA de GRP78, ATF4 e CHOP em células endoteliais dos tumores quando comparadas a células endoteliais primárias (HDMEC). Além do mais, células endoteliais tumorais apresentaram intensa imunomarcação para GRP78 comparativamente a células endoteliais de mucosa bucal normal. A acidez, uma importante fonte de estresse no microambiente tumoral, pode ativar uma UPR adaptativa em células endoteliais. Aumento da expressão de GRP78 em células endoteliais é associado com maior resistência a drogas quimioterápicas. Os resultados sugerem que a resistência mediada pela UPR pode contribuir com o insucesso terapêutico na resposta a drogas antitumorais.

Palavras-chave: célula endotelial; angiogênese; acidez tumoral; Unfolded Protein Response; GRP78; carcinoma espinocelular bucal.

ABSTRACT

Antiangiogenic therapy has emerged as a promising alternative for cancer treatment. However, growing evidence has shown that endothelial cells isolated directly from malignant tumors are more resistant to different drugs than endothelial cells from normal tissues. These differences may be due to the adaptation of endothelial cells to the tumor microenvironment. A unique feature of tumor microenvironment is the consistent acidification of the extracellular environment, whose effects on endothelial cells are not known. Extracellular acidity can alter multiple biological functions, including endoplasmic reticulum stress and activation of the Unfolded Protein Response (UPR). Primary human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) cultured at medium pH 6.4, adjusted with either lactic acid or either hydrochloric acid, showed strong up-regulation of the UPR-related proteins: GRP78, ATF4, phospho-elf2 α and increased XBP1 mRNA splicing. However massive cell death occurred after 48 hours. In contrast, when endothelial cells were exposed to chronic nonlethal acidic stress at pH 7.0 for up to seven days, cells were able to adapt, coincidental with a marked increase in GRP78 protein expression. After 7 days at pH 7.0, HDMEC cells showed increased resistance to cell death when exposed to Etoposide, Adriamycin and Sunitinib at doses ranging from 0.0025 μ M to 100 μ M. Knockdown of GRP78 by shRNA reversed the resistance phenotype. To determine the levels of UPR *in vivo*, laser capture microdissection of endothelial cells from oral squamous cell carcinomas biopsies was done. There is a significant increase in mRNA levels of GRP78, ATF4 and CHOP on endothelial cells of tumors compared to untreated primary endothelial cells (HDMEC). Moreover, tumor

endothelial cells showed strong GRP78 immunostaining compared to endothelial cells from normal oral mucosa. Low pH, an important source of cellular stress in the tumor microenvironment, can activate an adaptive UPR response in endothelial cells. Increased expression of GRP78 in endothelial cells is associated with chemoresistance. The results suggest that UPR-mediated resistance may contribute to therapeutic failures in response to anticancer drugs.

Key-words: endothelial cell; angiogenesis; tumor acidity; Unfolded Protein Response; GRP78; oral squamous cell carcinoma.

Angiogênese Tumoral

Na década de 1970 o médico norte-americano Judah Folkman lançou a teoria da angiogênese tumoral. Teoria, hoje comprovada, relata que as células tumorais secretam moléculas sinalizadoras para a formação de novos vasos sanguíneos para sua nutrição, pois suas demandas metabólicas são muito superiores aos tecidos normais. Na mesma publicação, surgiu também o conceito da terapia antiangiogênica, sugerindo que o bloqueio da formação desses novos vasos sanguíneos poderia controlar o crescimento tumoral, dessa forma “matando de fome as células cancerígenas” (Folkman, 1971).

Desde então se comprovou que o processo de angiogênese é controlado por um balanço entre moléculas que regulam positivamente a formação de novos vasos sanguíneos e por moléculas que inibem esse processo. Portanto, para que haja o crescimento tumoral é necessário que ocorra o *angiogenic switch*, ou seja, as células tumorais devem ser aptas a secretar fatores angiogênicos, que se sobreponham aos fatores antiangiogênicos, levando à formação de novos vasos sanguíneos para aumentar o acesso a nutrientes, caso contrário estes tumores permaneceriam “dormentes”. O *angiogenic switch* durante a progressão tumoral cada vez mais é reconhecido como um evento limitante na carcinogênese e, o crescimento tumoral passou a ser considerado como angiogênese-dependente (Hanahan, Weinberg, 2000). A angiogênese é induzida surpreendentemente cedo durante a carcinogênese. A

análise de lesões cancerizáveis, incluindo displasias epiteliais e carcinomas *in situ*, já revela sinais de ativação do *angiogenic switch* (Hanahan, Folkman, 1996).

A regulação da angiogênese em neoplasias é um processo complexo que envolve a interação entre as células tumorais e as células endoteliais através de diferentes fatores de crescimento. Para adquirir e manter um suporte sanguíneo adequado, as células tumorais secretam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas que regulam a angiogênese, a sobrevivência das células endoteliais e por conseqüência, a progressão tumoral. Em torno de 30 fatores angiogênicos já foram identificados: VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor-2), TGF- α e β (transforming growth factor alpha and beta), PDGF (platelet derived growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor alpha), EGF (epidermal growth factor), angiogenina, interleucinas 1, 6, 8 e 12 e angiopoietinas, entre outros. Da mesma forma fatores antiangiogênicos endógenos já foram descritos: angiostatina, endostatina e trombospondina entre outros (Ribatti, Vacca, 2008).

Dos muitos fatores angiogênicos já identificados, o VEGF é considerado o mais potente e é secretado pelas células tumorais em resposta à hipóxia através do fator de transcrição HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α). VEGF ativa a proliferação das células endoteliais, bem como sua migração em direção ao tumor (Mizukami, Kohgo, Chung, 2007).

Durante a embriogênese o desenvolvimento vascular envolve o surgimento de novas células endoteliais e a sua ligação em forma de tubos, processo chamado de vasculogênese, em adição ao brotamento de novos vasos a partir dos pré-existentes. Após sua formação a vasculatura normal se torna quiescente. No adulto, como parte de

processos fisiológicos na cicatrização de feridas e durante o ciclo reprodutivo feminino, a angiogênese é ativada, mas apenas de forma temporária. Em contraste, durante a progressão tumoral o *angiogenic switch* permanece constantemente ativo, fazendo com que a vasculatura normalmente quiescente gere novos vasos que ajudam a sustentar o crescimento tumoral (Hanahan, Folkman, 1996).

A ativação crônica da angiogênese, com a secreção desbalanceada de fatores angiogênicos faz com que os vasos sanguíneos recém-formados nos tumores sejam significativamente diferentes em relação à morfologia e função quando comparados aos vasos presentes em tecidos normais. Enquanto que a vasculatura normal apresenta um padrão de ramificação hierárquica de artérias, veias e capilares, os vasos tumorais são desorganizados. Células endoteliais associadas ao tumor não formam monocamadas regulares e dessa forma não desempenham a função normal de barreira. As membranas basais e os pericitos dos vasos nos tumores são anormais, apresentando uma ligação frouxa com as células endoteliais, e os últimos estendem seus processos citoplasmáticos profundamente no tecido tumoral. Todas essas alterações resultam em maior permeabilidade dos vasos sanguíneos, ao contrário dos vasos normais que apresentam uma permeabilidade seletiva, além disso, vasos sanguíneos no tumor são usualmente tortuosos apresentando fluxo sanguíneo caótico. Alta pressão intersticial muitas vezes causa o colapso do vaso impedindo o fluxo sanguíneo. Essas são algumas das razões pelas quais o microambiente tumoral apresenta constantemente áreas de hipóxia (Baluk, Hashizume, McDonald, 2005; Huang, Chen, 2008).

Considerando que a angiogênese é um fator chave no crescimento tumoral, porém um processo limitado em adultos saudáveis, o desenvolvimento de inibidores de angiogênese se tornou uma linha de pesquisa importante no combate ao câncer, uma vez que poucos efeitos colaterais seriam esperados quando comparados aos efeitos da quimioterapia e radioterapia convencionais (Karamysheva, 2008; Cook, Figg, 2010). Além do mais, células endoteliais são usualmente reconhecidas como geneticamente estáveis, ou seja, não apresentam a instabilidade genética que normalmente leva ao desenvolvimento de resistência a drogas nas células tumorais (Baluk, Hashizume, McDonald, 2005).

Nos últimos 20 anos a terapia antiangiogênica surgiu como uma alternativa terapêutica promissora e diversos ensaios clínicos estão em andamento, sendo que algumas drogas já foram aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) para uso terapêutico em tumores específicos. Por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-VEGF Bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche) foi aprovado desde março de 2008 para o tratamento de câncer de cólon, mama e de pulmão associado à quimioterapia, e as drogas Sorafenib (Nexavar, Bayer) e Sunitinib (Sutent, Pfizer), que são inibidores dos receptores tirosina quinases, PDGFR e VEGFR2, foram aprovadas para tratamento de carcinomas renais, hepatocarcinoma (apenas Sorafenib) e gastrintestinal (Sunitinib apenas) (Berger, Hanahan, 2008; Ebos et al., 2009, Paèz-Ribes et al., 2009).

No entanto, os inibidores de angiogênese estão falhando em produzir uma resposta clínica duradoura para a maioria dos pacientes. O que se observa é que a introdução da terapia antiangiogênica resulta em melhora transitória, na forma de estabilização do tumor ou na sua diminuição de tamanho, mas sem aumento

significativo da sobrevida. Inevitavelmente, no entanto, os tumores voltam a crescer e progredir. Além do mais, em muitos casos nenhum benefício é observado durante o tratamento (Berger, Hanahan, 2008; Paèz-Ribes et al., 2009).

Quando Folkman (1971) postulou que tumores poderiam encolher eliminando-se os vasos sanguíneos que o alimentam, assumia-se que o endotélio tumoral era “normal” e assim seria improvável o desenvolvimento de resistência às terapias antiangiogênicas. Entretanto, estudos têm documentado alterações tanto morfológicas quanto moleculares em células endoteliais associadas a tumores (CET) quando comparadas às presentes no tecido correspondente normal - CEN (Akino et al., 2009; Aird, 2009). Duas formas de resistência foram descritas: primeiro, as CETs desenvolveriam resistência evasiva, ou seja, adaptando-se a um inibidor antiangiogênico específico aumentando de forma compensatória outra via de sinalização através de outro receptor; segundo, para os pacientes nos quais não há nenhum benefício tangível observado nota-se que existe uma resistência intrínseca para os inibidores angiogênese, assim há diferenças intrínsecas e inerentes às CETs quando comparadas com suas contrapartes normais, diferenças que poderiam alterar a eficácia de tratamentos antiangiogênicos. Essas diferenças inerentes seriam adquiridas em resposta às pressões seletivas e frente ao estresse gerado pelo microambiente criado pela massa crescente de células tumorais durante a progressão maligna (Dudley, Klagsbrun, 2009).

Xiong et al. (2009) utilizaram esferas magnéticas acopladas a anticorpos para isolar células endoteliais viáveis a partir de tecidos tumorais de fígado e dos tecidos normais adjacentes. Utilizando esta técnica os autores observaram que as CETs

apresentavam maior resistência à apoptose, maior motilidade e propriedades angiogênicas exacerbadas (maior capacidade de brotamento *in vitro*) quando comparadas às células endoteliais do tecido normal (CEN). Além do mais, CETs eram menos sensíveis ao tratamento com as drogas antineoplásicas Adriamicina, 5-Fluoracil, e à droga antiangiogênica Sorafenib.

Evidências de que existem interações complexas entre células endoteliais, células tumorais e o microambiente tumoral poderiam contribuir para esta resistência à terapia (Kaneko et al., 2007). Além do mais, células endoteliais são particularmente sensíveis ao microambiente em que vivem. Dessa forma, é importante avaliar os efeitos do microambiente tumoral no fenótipo das células endoteliais.

O Microambiente Tumoral

O termo microambiente tumoral usualmente é interpretado como um conjunto de características metabólicas e fisiológicas observadas em tumores sólidos (Gillies et al., 2002). O processo de múltiplas etapas da carcinogênese é freqüentemente descrito como similar ao processo de evolução somática, devido a semelhanças com o processo Darwiniano, onde características fenotípicas são mantidas ou perdidas em função de vantagens adaptativas. De acordo com este modelo, certas condições que são observadas em tumores invasivos surgem como mecanismos adaptativos à alta atividade proliferativa deste tecido e tais condições tornam único este que é conhecido como microambiente tumoral (Gatenby, Gillies, 2004).

Uma característica comum dos tumores invasivos sólidos é um metabolismo alterado de glicose. A glicose é inicialmente metabolizada pela glicólise, onde geram-se piruvato, ATP e oxida-se NAD⁺ para NADH. Em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase e o NADH é reduzido a NAD⁺. Em condições aeróbicas, o piruvato é convertido em acetil CoA dentro da mitocôndria, sendo completamente oxidado a CO₂ e H₂O. Otto Warburg foi o primeiro a descrever o anômalo, mas característico metabolismo energético da célula cancerosa: mesmo em presença de oxigênio as células cancerosas reprogramam seu metabolismo glicolítico, e assim sua produção energética, limitando seu metabolismo de energia em grande parte à glicólise, levando a um estado conhecido como “glicólise aeróbica” ou “Efeito Warburg”, sendo esta uma característica singular observada em cânceres (Warburg, 1956).

O “Efeito Warburg” indica que a glicólise nos tumores invasivos já bem estabelecidos pode ser uma característica inerente das células tumorais, sem uma relação direta com os níveis de oxigenação (Gillies et al., 2002). Uma possível explicação é que as células tumorais residem em um ambiente com ciclos de exposição à hipóxia seguida de normóxia com periodicidades de minutos. Tais ciclos se devem às flutuações de hemodinâmica dos vasos sanguíneos do tumor, que possuem notavelmente fluxo sanguíneo instável. Dessa forma, células adaptadas à sobrevivência em situações de hipóxia, ou seja, com metabolismo anaeróbico aumentado, são selecionadas ao longo do tempo (Kimura et al., 1996).

Estudos onde células extraídas de tumores primários são cultivadas em condições de normóxia demonstram que as células malignas tipicamente mantêm o

mesmo fenótipo metabólico de glicólise, indicando que a glicólise é constitutivamente aumentada através de alterações genéticas ou epigenéticas estáveis (Gatenby, Gillies, 2004). A constante observação de glicólise anaeróbica em tumores invasivos humanos, a despeito de uma menor eficiência na produção de energia, possui correlação com maior agressividade, sugerindo que o fenótipo glicolítico confere uma significativa vantagem proliferativa durante a evolução somática do câncer e, portanto, deve ser um componente crucial do fenótipo maligno (Hanahan, Weinberg, 2011).

A maior consequência do aumento de glicólise é a acidificação do meio extracelular. Os produtos metabólicos da glicólise, íons de hidrogênio (H^+) e ácido láctico causam a acidificação do meio extracelular (Gatenby, Gillies, 2004). Estudos mostram que o pH extracelular de tumores é consistentemente ácido e pode chegar a valores significativamente baixos (Gillies et al., 2002). Becelli et al. (2007), verificou que o pH extracelular de uma amostra de tumores malignos da cavidade bucal variava entre 6,56 e 6,97. Gatenby e Gawlinski (1996) demonstraram que a acidez tumoral resulta da difusão de íons hidrogênio através de um gradiente de concentração até o tecido peritumoral normal.

Especula-se que a acidez confere uma vantagem adaptativa, produzindo uma pressão seletiva beneficiando as células com maior resistência à apoptose (Fang, Gillies, Gatenby, 2008). A acidez tumoral leva a um fenótipo mais agressivo das células cancerosas, devido à alteração de diferentes processos como: aumento de metástases, transcrição gênica alterada e instabilidade genômica (Gillies et al., 2002).

Os efeitos do baixo pH dos tumores malignos nas células endoteliais não são conhecidos. A acidez extracelular pode levar à modificação do pH intracelular (pHi);

variação de apenas 0,1 no pH_i pode alterar múltiplas funções biológicas, incluindo geração de ATP, síntese protéica, apoptose, proliferação e migração celulares (Roos, Boron, 1981).

Estudos demonstram que a exposição à acidez pode inibir ou diminuir a morte celular por apoptose em células endoteliais de origem cardiovascular (D'Arcangelo et al., 2000; Flacke et al., 2009). No entanto, a causa para a maior resistência a apoptose é incerta e esses efeitos foram atribuídos a diferentes fatores como: aumento da expressão da proteína Bcl-xL e aumento da expressão do mRNA de VEGF e bFGF.

Ayoama et al. (2005) observou que acidez pode desencadear estresse do retículo endoplasmático (RE) e subsequente desencadeamento da “unfolded protein response” (UPR) em astrócitos, com aumento dos níveis protéicos da chaperona GRP78. A unfolded protein response é atualmente um importante fator na resistência à apoptose, sendo relacionada com resistência a diversas drogas quimioterápicas (Mann, Hendershot, 2006).

Estresse do Retículo Endoplasmático e a Unfolded Protein Response

O retículo endoplasmático (RE) é uma rede complexa de membranas, presente em todas as células eucarióticas e possui papel fundamental no funcionamento normal da célula, pois atua no dobramento e nas modificações pós-translacionais de proteínas. Para realizar o enovelamento tridimensional de proteínas, o RE apresenta altos níveis de proteínas chaperonas que auxiliam no dobramento correto das proteínas nascentes. Muitas destas chaperonas são cálcio-dependentes e dessa forma, o RE contém altas

concentrações de cálcio, tendo um papel importante também na homeostase de cálcio intracelular (Saibil, 2008).

As células incorporaram, ao longo da evolução, mecanismos para evitar erros na transmissão genética que se propagassem na replicação, transcrição e tradução. Apesar de todo o cuidado de assegurar que a seqüência de aminoácidos esteja correta, uma proteína pode não ser capaz de desempenhar suas funções por erros no enovelamento. Uma quantidade significativa de proteínas precisa de ajuda para atingir a configuração terciária correta. Essa ajuda é fornecida por uma família de proteínas, as chaperonas, que além de auxiliar o enovelamento protéico, encaminham a proteína à destruição, caso não seja possível atingir a configuração correta. As chaperonas constituem uma família de muitas proteínas diferentes com função semelhante: elas usam energia da hidrólise de ATP para desenovelar proteínas, possibilitando novo enovelamento, dessa vez na forma correta ou no lugar correto (Fenton, Horwich, 2003).

O termo estresse do retículo endoplasmático se refere a qualquer perturbação que altere a função de dobramento de proteínas. Desta forma, uma variedade de insultos patológicos e farmacológicos pode resultar em estresse no retículo endoplasmático, e este estresse pode ser em sua natureza agudo ou crônico (Kaufman, 2002). Exemplos de alterações que induzem estresse do RE são: hipóxia, isquemia, diminuição dos níveis de cálcio, diminuição dos níveis de glicose, mutações genéticas que resultam na produção de proteínas alteradas que não podem ser dobradas corretamente, alterações nos níveis redox (necessário para a formação de ligações dissulfeto durante a síntese protéica), infecções virais que utilizam as vias secretórias para a produção de proteínas virais e até mesmo a diferenciação fisiológica de células

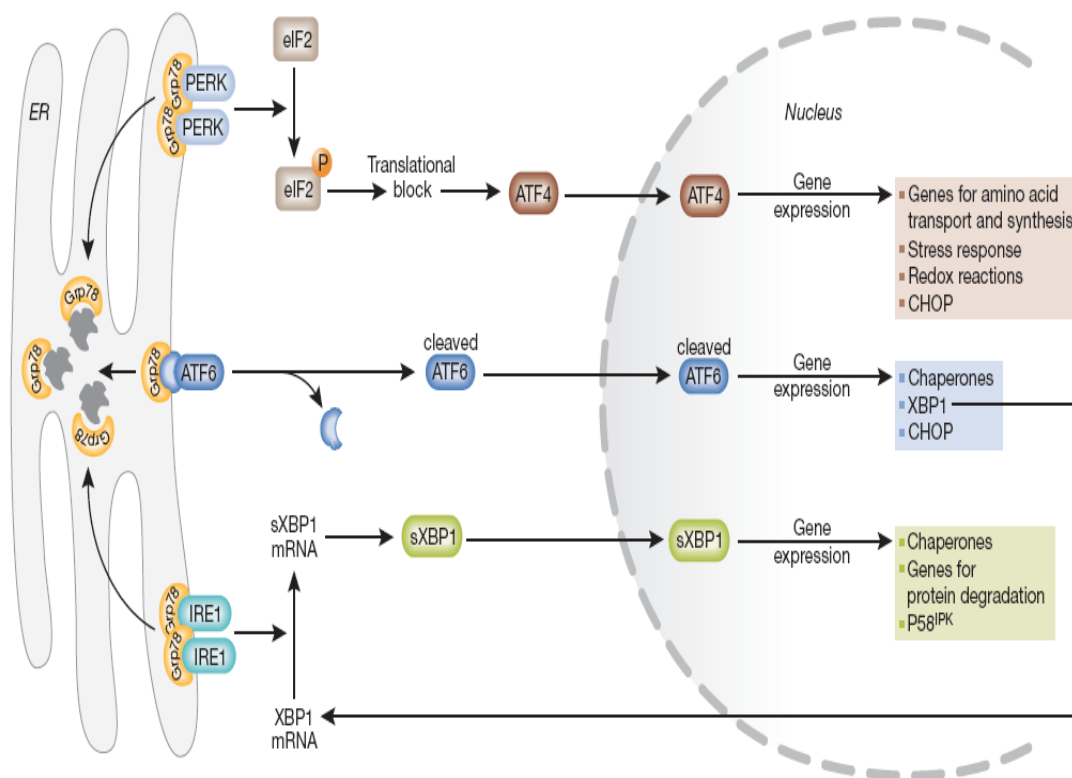
cuja função primária é a produção e secreção de proteínas, como os linfócitos B, células endócrinas, hepatócitos, entre outras (Rutkowski, Kaufman, 2007; Healy et al., 2009).

O RE é altamente sensível a estresses que podem reduzir sua capacidade de dobramento, o que resulta no acúmulo e na agregação de proteínas mal-dobradas. Agregação de proteínas é tóxica para a célula e muitas condições patológicas são associadas ao estresse do RE: doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer (Szegezdi et al., 2006).

Para combater o estresse do RE as células desenvolveram mecanismos de proteção que são conhecidos como “unfolded protein response” (UPR). Este sistema complexo é mediado através de 3 sensores transmembrana do RE: IRE1 α (Inositol requiring enzyme 1 α), PERK (pancreatic ER eIF2 α kinase) e ATF6 (activating transcription factor 6). O domínio intraluminal destas proteínas está ligado à proteína chaperona do RE GRP78 (glucose regulated protein 78), também chamada de BiP (binding protein) (Kaufman, 2002). Em caso de estresse do RE, quando proteínas não dobradas ou mal dobradas se acumulam no interior do retículo endoplasmático, GRP78 se desconecta destas proteínas sensores para atuar como chaperona, causando a liberação das mesmas e subsequente ativação da UPR. A UPR é um mecanismo pró-sobrevivência que vai reduzir o acúmulo de proteínas mal dobradas e restaurar a função do RE. Entretanto, se a agregação de proteínas persiste e o estresse não pode ser eliminado, a sinalização muda de pró-sobrevivência para pró-apoptótica, levando à morte celular (Healy et al., 2009).

O primeiro sensor a ser ativado é PERK, responsável inicialmente por uma sinalização de sobrevivência, atuando na fosforilação de eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2), que inibe o fornecimento de metionil-tRNA ao ribossomo, dessa forma causando uma inibição geral da síntese protéica. Assim, a célula pode lidar com o acúmulo de proteínas mal dobradas aumentando a atividade de chaperonas e aumentando a degradação destas proteínas através de um processo chamado ERAD (ER-associated degradation). No entanto, essa inibição não é absoluta, alguns genes se sobrepõem a essa inibição, como ATF4 (activating transcription factor 4). ATF4 é um fator de transcrição que induzirá a expressão de chaperonas, de genes envolvidos na regulação do metabolismo de aminoácidos, e de GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34) que realiza a desfosforilação eIF2 α revertendo o bloqueio da síntese protéica (Healy et al., 2009).

Os três braços da UPR levam à expressão de um fator de transcrição específico: PERK ativa ATF4; ATF6 após ativado e clivado atua ele mesmo como fator de transcrição e IRE1 α , realiza a clivagem do RNA mensageiro de XBP1 (X-box binding protein 1), onde um íntron com 26 bases é removido por atividade endonuclease de IRE1 α , e o XBP1 clivado atua, por sua vez, como um fator de transcrição. Esse conjunto de fatores de transcrição induz a expressão de genes importantes da UPR no sentido de aumentar sua capacidade de dobramento, de processamento e degradação de proteínas (Esquema 1). Se a atuação da UPR é eficaz na remoção de proteínas mal dobradas acumuladas, a síntese normal de proteína é restaurada e a célula volta ao seu funcionamento normal. Se o estresse é muito severo ou prolongado a UPR pode desencadear a morte celular por apoptose (Rutkowski, Kaufman, 2007).



Esquema 1 - Desenho esquemático da ativação da Unfolded Protein Response (Szegezdi et al., 2006).

O fator de transcrição CHOP, ativado por PERK e ATF6, está relacionado à apoptose UPR-induzida, pois é capaz de alterar o balanço entre os membros pró-sobrevivência e pró-apoptose da família Bcl-2, aumentando a expressão de Bim e suprimindo os antiapoptóticos, além de aumentar a expressão de DR5 (death receptor 5). Mas a UPR também pode iniciar outros eventos pró-apoptóticos, não relacionados a CHOP, incluindo a fosforilação de JNK (c-Jun N-terminal kinases) e clivagem de caspases associadas ao RE (Szegezdi et al., 2006; Healy et al., 2009).

Estresse agudo é mais facilmente aliviado com uma redução imediata na quantidade de proteínas nascentes, assim a primeira etapa da UPR é a rápida fosforilação de eIF2 α e subsequente inibição da tradução, no entanto este processo não é compatível a longo prazo com a função celular. Por sua vez, estresse crônico requer uma ativação quase permanente onde o estresse pode ser persistentemente tolerado e as células sobrevivam e se adaptem ao estímulo estressor. Portanto, uma das questões fundamentais no que se refere à UPR é entender como as células escapam da morte celular e se adaptam ao estresse crônico (Rutkowski, Kaufman, 2007).

O processo pelo qual as células se adaptam ao estresse crônico do RE não é ainda bem compreendido. Rutkowski et al. (2006) induziram um estresse suficientemente moderado não-letal utilizando baixas doses de drogas que simulam estresse do RE, thapsigargina (que bloqueia o influxo de cálcio para o RE) e tunicamicina (que inibe a N-glicosilação no RE). Esse estresse ativou os três sensores da UPR, mas ainda assim as células MEFs (fibroblastos embrionários de camundongos) sobreviveram e proliferaram, ainda que em velocidade menor quando comparadas aos controles. A adaptação foi marcada pela expressão persistente de chaperonas do RE, como GRP78, mas não de ATF4 e CHOP, e esta expressão seletiva pode ser consequência da instabilidade intrínseca de mRNAs e das proteínas que promovem apoptose em relação àquelas que facilitam a capacidade de dobramento e adaptação do RE. Além do mais, as células se tornaram resistentes ao desafio de um segundo estressor, tanto em termos de sobrevivência, quanto em relação à ativação da UPR. Esse fenômeno é chamado de pré-condicionante e, pode ser acompanhado do

aumento de expressão de genes da UPR, principalmente chaperonas, assim, o pré-condicionamento protege as células melhorando a capacidade do RE e suprimindo adicional ativação da UPR.

A Unfolded Protein Response e o Câncer

Estresse crônico no RE é cada vez mais reconhecido como um fator importante no desenvolvimento e estabelecimento do câncer. Estresse no RE e UPR são altamente induzidos em vários tumores. Evidências demonstram que a UPR é um mecanismo necessário e importante para as células cancerosas sobreviverem ao inóspito microambiente tumoral e para resistirem à terapia quimioterápica (Li et al., 2011).

Células cancerosas se multiplicam em alta velocidade e possuem um metabolismo elevado de glicose, resultando em pobre oxigenação da massa tumoral, falta de nutrientes e alterações no pH extracelular (Vaupel et al., 1989). Além do mais, células malignas expressam proteínas mutantes que não podem ser corretamente dobradas, estão sujeitas a fornecimento inadequado de energia ao RE e, ainda apresentam alterações nos níveis redox. Todos esses fatores podem causar estresse no RE e ativação da UPR (Healy et al., 2009). As células tumorais se adaptam ao estresse do RE e escapam da apoptose causada por esse estresse, ativando a UPR (Wang et al., 2010).

Há evidência de superexpressão de XBP1, ativação de ATF6, fosforilação de eIF-2 α , indução de ATF4 e CHOP, além de maior expressão das chaperonas do RE,

GRP78 e GRP94, em vários tipos de câncer (Fernandez et al., 2000; Xiaoxin et al., 2002; Shajahan et al., 2003; Shuda et al., 2003; Fels, Koumenis, 2006). Altos níveis de XBP1 são associados com maior tamanho tumoral, resistência à terapia anti-estrógeno e menor sobrevida em pacientes com câncer de mama (Davies et al., 2008). Em um modelo animal transgênico transfectado com XBP1 especificamente em linfócitos B, os animais desenvolveram mielomas múltiplos espontaneamente, o que destaca a importância da UPR no desenvolvimento tumoral (Carrasco et al., 2007).

Maior expressão de GRP78 em diversos tipos de tumores confere resistência a drogas em células cancerosas (Lee, 2007; Dong et al., 2008). GRP78 é considerado um marcador da ativação de UPR e níveis elevados de GRP78 geralmente estão correlacionados com agressividade, recidivas e menor sobrevida em pacientes com câncer de mama, fígado, próstata e de estômago, sendo que há resultados conflitantes a respeito do câncer de pulmão (Uramoto et al., 2005; Wang et al., 2005; Lee et al., 2006; Lee, 2007; Zheng et al., 2008; Al-Rawashdeh et al., 2010). O aumento da expressão imunohistoquímica de GRP78 é um achado comum em uma variedade de tumores (Lee, 2007; Healy et al., 2009). GRP78 incrementa a capacidade de dobramento protéico do RE e é associado a uma resposta pró-sobrevivência. Redução da expressão de GRP78 por SiRNA leva à ativação da UPR e apoptose, resultando em menores tumores em modelos animais (Suzuki et al., 2007).

Evidências apontam que células cancerígenas se adaptam ao microambiente tumoral em parte pelo aumento da expressão de GRP78 (Lee, 2007). Deleção de *GRP78* é letal ao embrião, mas camundongos heterozigotos para *GRP78* são viáveis, estudo utilizando tumores xenográficos de mama nestes animais mostrou que a

progressão tumoral foi significativamente menor devido a um maior período de latência, o tamanho tumoral era reduzido quando comparado ao grupo controle e os níveis de apoptose superiores (Dong et al., 2008).

GRP78 é considerada uma proteína com funções anti-apoptóticas, pois é capaz de se ligar e bloquear a ativação da caspase 7 (Reddy et al., 2003; Lee, 2007). Enquanto que, a maior parte de GRP78 está presente no lúmen do RE, uma fração existe como uma proteína transmembrana, o que pode explicar como GRP78 seria capaz de inibir diretamente a ativação da caspase-7, que é uma caspase executora ativada tanto por estresse do RE quanto por drogas genotóxicas (Reddy et al., 2003). Em uma variedade de tumores malignos, incluindo pulmão, bexiga, estômago, mama, o aumento da expressão de GRP78 confere resistência a agentes quimioterápicos e o silenciamento de GRP78 sensibiliza as células tumorais a estes agentes terapêuticos (revisado em Li, Lee, 2006).

Além da maior expressão de GRP78 em células tumorais, Virrey et al. (2008), demonstraram que a chaperona GRP78 geralmente é mais expressa na vasculatura de gliomas humanos, comparando-se a mínima expressão observada na vasculatura de tecidos normais. Maior expressão de GRP78 não foi acompanhada da indução de concomitante de outros marcadores de UPR. As culturas utilizadas de células endoteliais humanas primárias de gliomas malignos mostraram-se substancialmente mais resistente a apoptose do que as células endoteliais derivadas de tecidos cerebrais não malignos, sugerindo que GRP78 também pode desempenhar um papel aumentando a sobrevivência de células endoteliais.

No entanto, os efeitos da ativação da unfolded protein response na angiogênese tumoral ainda são praticamente desconhecidos. O baixo pH tumoral pode atuar como um estressor do RE e conseqüentemente ser capaz de ativar a UPR em células endoteliais. A exposição a uma acidificação crônica poderia levar à adaptação celular e a maior resistência a drogas.

OBJETIVO

Investigar os efeitos do estresse causado pelo pH ácido nas células endoteliais, em relação à ativação da Unfolded Protein Response e na resistência a diferentes drogas antitumorais.

Objetivos Específicos e Metafísicas

1. Definir os efeitos da acidificação aguda em relação à ativação da UPR em células endoteliais *in vitro*.

Células endoteliais primárias humanas foram expostas ao pH 6.4 por 48 horas de duas formas distintas: 1^o - regulando o pH do meio de cultura EGM2 (Endothelial growth medium 2) com ácido láctico e 2^o - segundo usando ácido clorídrico (HCl). A ativação da UPR é verificada pela expressão das seguintes proteínas associadas à UPR: GRP78, ATF4, CHOP, elf2 α fosforilada, elf2 α total e pela clivagem do mRNA de XBP1, comparando-se com células endoteliais mantidas em pH regular 7.5 pelo mesmo período de tempo;

2. Verificar se o meio condicionado tumoral altera os efeitos da acidificação aguda em relação à ativação da UPR.

Células endoteliais primárias humanas foram expostas a meio condicionado tumoral gerado sob condições de hipóxia (induz glicólise nas células tumorais e conseqüentemente a acidificação do meio) de células tumorais da linhagem de

carcinoma espinocelular bucal UM-SCC81-B e da linhagem de glioblastoma multiforme U-87. A ativação da UPR é verificada pela expressão das seguintes proteínas associadas à UPR: GRP78, ATF4, CHOP, elf2 α fosforilada, elf2 α total e pela clivagem do mRNA de XBP1, comparando-se com células endoteliais mantidas em pH regular 7.5 pelo mesmo período de tempo;

3. Definir os efeitos da acidificação crônica em células endoteliais *in vitro* em relação à ativação da UPR.

Células endoteliais primárias humanas foram expostas ao pH 7.0 por sete dias de duas formas distintas: 1^o - regulando o pH do meio de cultura EGM2 com ácido láctico e 2^o- segundo usando ácido clorídrico (HCl). A ativação da UPR novamente é verificada pela expressão das seguintes proteínas associadas à UPR: GRP78, ATF4, CHOP, elf2 α fosforilada, elf2 α total e pela clivagem do mRNA de XBP1, comparando-se com células endoteliais mantidas em pH regular 7.5 pelo mesmo período de tempo;

4. Verificar a adaptação das células endoteliais frente à acidificação crônica, no que diz respeito à proliferação e ao ciclo celular.

Células endoteliais primárias humanas foram expostas ao pH 7.0 por sete dias de duas formas distintas: 1^o- regulando o pH do meio de cultura EGM2 usando ácido láctico e 2^o- com ácido clorídrico (HCl); sendo avaliada a distribuição das fases do ciclo celular e também as taxas de proliferação em comparação com células

endoteliais do grupo controle (células de mesma passagem e origem parental, mantidas em pH 7.5 pelo mesmo período de tempo);

5. Comparar resistência a drogas de células endoteliais adaptadas à acidez crônica e células endoteliais controle.

Foi avaliada a sobrevivência das células endoteliais adaptadas à acidificação crônica após tratamento durante 72 horas com as drogas antineoplásicas Cisplatina, Etoposide e Adriamicina e da droga antiangiogênica Sunitinib, em relação às células endoteliais do grupo controle;

6. Determinar o efeito dos níveis de expressão de GRP78 na resistência a drogas de células endoteliais.

Comparar a resistência de células endoteliais transfectadas com lentivírus contendo seqüência ShRNA (short hairpin RNA) de *GRP78* (resultando no silenciamento da expressão de GRP78) em relação às células endoteliais do grupo controle transfectadas com lentivírus contendo um vetor vazio, após tratamento de 72 horas com as drogas antineoplásicas Cisplatina, Etoposide e Adriamicina e da droga antiangiogênica Sunitinib;

7. Avaliar o envolvimento da caspase 7 na morte celular induzida pelo tratamento com as drogas antineoplásicas Cisplatina, Etoposide e Adriamicina e da droga antiangiogênica Sunitinib em células endoteliais adaptadas à acidez crônica.

Foram comparados os níveis de clivagem da caspase 7 em células endoteliais adaptadas à acidez crônica e células endoteliais em pH controle tratadas com as drogas antineoplásicas Cisplatina, Etoposide e Adriamicina e com a droga antiangiogênica Sunitinib por 48 horas;

8. Determinar a expressão *in vivo* de marcadores de UPR em células endoteliais associadas a tumores.

Avaliar a expressão gênica de marcadores de UPR (GRP78, ATF4, CHOP), e a expressão imunohistoquímica da proteína GRP78, em células endoteliais da microvasculatura de carcinomas espinocelulares bucais, comparando-as com células endoteliais da mucosa bucal normal.

REFERÊNCIAS

Akino T, Hida K, Hida Y, Tsuchiya K, Freedman D, Muraki C, Ohga N, Matsuda K, Akiyama K, Harabayashi T, Shinohara N, Nonomura K, Klagsbrun M, Shindoh M. **Cytogenetic Abnormalities of Tumor-Associated Endothelial Cells in Human Malignant Tumors.** Am J Pathol, v 175, p. 2657-2667, 2009.

Aird WC. **Molecular heterogeneity of tumor endothelium.** Cell Tissue Res, v. 335, p. 271-281, 2009.

Al-Rawashdeh FY, Scriven P, Cameron IC, Vergani PV, Wyld L. **Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma.** Eur J Gastroenterol Hepatol, v. 22, p. 1099-1105, 2010.

Aoyama K, Burns DM, Suh SW, Garnier P, Matsumori Y, Shiina H, Swanson RA. **Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death.** J Cereb Blood Flow Metab, v. 25, p. 358-370, 2005.

Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. **Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer.** Cur Opin Gen & Dev, v. 15, p. 102-111, 2005.

Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. **Intracellular and Extracellular Tumor pH Measurement in a Series of Patients With Oral Cancer.** J Craniofacial Surg, v. 18, p. 1051-1054, 2007.

Bergers G, Hanahan D. **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** Nat Rev Cancer, v.8, p. 592–603, 2008.

Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, Zheng M, Mani M, Henderson J, Pinkus GS. **The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis.** Cancer Cell, v. 11, p.349-360, 2007.

Cook KM, Figg WD. **Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects.** CA: A Cancer J Clin, v. 60, p.222-243, 2010.

D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, Gaetano C, Capogrossi MC. **Acidosis Inhibits Endothelial Cell Apoptosis and Function and Induces Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Expression.** Circ Res, v. 86, p.312-318, 2000.

Davies MP, Barraclough DL, Stewart C, Joyce KA, Eccles RM, Barraclough R, Rudland PS, Sibson DR. **Expression and splicing of the unfolded protein response gene XBP-1 are significantly associated with clinical outcome of endocrine-treated breast cancer.** Int J Cancer, v. 123, p. 85-88, 2008.

Dong D, Ni M, Li J, Xiong S, Ye W, Virrey JJ, Mao C, Ye R, Wang M, Pen L, Dubeau L, Groshen S, Hofman FM, Lee AS. **Critical Role of the Stress Chaperone GRP78/BiP in Tumor Proliferation, Survival, and Tumor Angiogenesis in Transgene-Induced Mammary Tumor Development.** Cancer Res, v. 68, p. 498-505, 2008.

Dudley AC, Klagsbrun M. **Tumor Endothelial Cells Join the Resistance.** Clin Cancer Res, v. 15, p. 4787-4789, 2009.

Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel, RS. **Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis.** Cancer Cell, v. 15, p. 232–239, 2009.

Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. **Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression.** Sem Cancer Biol, v. 18, p. 330-337, 2008.

Fels DR, Koumenis C. **The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth.** Cancer Biol Ther, v.5, p.723-728, 2006.

Fenton WA, Horwich AL. **Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide.** Q Rev Biophys, v. 36, p. 229-256, 2003.

Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM, Kennedy KA, Patierno SR. **Overexpression of the glucoseregulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions.** Breast Cancer Res Treat, v.59, p. 15-26, 2000.

Flacke J, Kumar S, Kostin S, Reusch HP, Ladilov Y. **Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression.** Apoptosis, v. 14, p. 90–96, 2009.

Folkman J. **Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications.** N Eng J Med, v. 285, p.1182-1186, 1971.

Gatenby, RA, Gawlinski, ET. **A reaction-diffusion model of cancer invasion.** Cancer Res, v. 56, p. 5745–5753, 1996.

Gatenby, RA; Gillies RJ. **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** Nature Reviews, v. 4, p. 891-899, 2004.

Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. **MRI of the Tumor Microenvironment.** J Magn Reson Imaging, v. 16, p. 430–450, 2002.

Hanahan D, Folkman J. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** Cell, v. 86, p. 353–364, 1996.

Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** Cell, v. 100, p.57–70, 2000.

Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** Cell, v. 144, p. 646-674, 2011.

Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. **Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy.** *Europ J Pharmacol*, v. 625, p. 234–246, 2009.

Huang G, Chen L. **Tumor vasculature and microenvironment normalization: a possible mechanism of antiangiogenesis therapy.** *Cancer Bio Radio*, v. 23, p.661-667, 2008.

Kaneko T, Zhang Z, Mantellini MG, Karl E, Zeitlin B, Verhaegen M, Soengas MS, Lingen M, Strieter, RM, Nunez G, Noör JE. **Bcl-2 Orchestrates a Cross-talk between Endothelial and Tumor Cells that Promotes Tumor Growth.** *Cancer Res*, v. 67, p. 9685–9693, 2007.

Karamysheva AF. **Mechanisms of angiogenesis.** *Biochemistry*, v. 73, p. 751-762, 2008.

Kaufman, RJ. **Orchestrating the unfolded protein response in health and disease.** *J Clin Invest*, v. 110, p. 1389–1398, 2002.

Kimura H, Braun D, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, Hong K, Dewhirst MW. **Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma.** *Cancer Res*, v. 56, p. 5522–5528, 1996.

Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. **GRP78 as a Novel Predictor of Responsiveness to Chemotherapy in Breast Cancer.** *Cancer Res*, v.66, p. 7849-7853, 2006.

Lee AS. **GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications.** *Cancer Res*, v. 67, p. 3496-3499, 2007.

Li J, Lee AS. **Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer.** Curr Mol Med, v. 6, p. 45–54, 2006.

Li X, Zhang K, Li Z. **Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective.** J Hemato Oncol, v.4, p.1-10, 2011.

Mann MJ, Hendershot LM. **UPR Activation Alters Chemosensitivity of Tumor Cells.** Cancer Biol Ther, v. 5, p. 736-740, 2006.

Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. **Hypoxia Inducible Factor-1 Independent Pathways in Tumor Angiogenesis.** Clin Cancer Res, v.13, p. 5670-5674, 2007.

Paèz-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinàls F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. **Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis.** Cancer Cell, v. 15, p. 220–231, 2009.

Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. **Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP78 Protects Cells from Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors. Role of atp binding site in suppression of caspase-7 activation.** J Biol Chem, v. 278, p. 20915–20924, 2003.

Ribatti D, Vacca A. **The role of microenvironment in tumor angiogenesis.** Genes Nutr, v. 3, p. 29-34, 2008.

Roos A, Boron WF. **Intracellular pH.** Physio Rev, v.61, p. 296-434, 1981.

Rutkowski DT, Arnold SM, MillerCN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Akha AAS, Raden D, Kaufman RJ. **Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins.** PLOS Biol, v. 4, p. 2024-2041, 2006.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. **That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress.** TRENDS Bioch Sci, v.32, p. 469-476, 2007.

Saibil HR. **Chaperone machines in action.** Cur Opi Struct Biol, v. 18, p. 35–42, 2008.

Shajahan AN, Riggins RB, Clarke R. **The role of X-box binding protein-1 in tumorigenicity.** Drug News Perspect, v. 22, p.241-246, 2003.

Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O. **Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis.** J Hepatol, v. 38, p. 605-614, 2003.

Suzuki T, Lu J, Zahed M, Kita K, Suzuki N. **Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells.** Arch Biochem Biophys, V. 468, p. 1–14, 2007.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. **Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.** EMBO reports, v. 7, p. 880-885, 2006.

Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Yoshimastu T, Morita M, Yasumoto K. **Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance.** Lung Cancer, v. 49, p. 55-62, 2005.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. **Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review.** Cancer Res, v. 49, p. 6449-6465, 1989.

Virrey JJ, Dong D, Stiles C, Patterson JB, Pen L, Ni M, Schönthal AH, Chen TC, Hofman FM, Lee AS. **Stress Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells.** Mol Cancer Res, v.6, p.1268-1275, 2008.

Xiaoxin C, Yu D, Liu C, Yang CS. **Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans.** Carcinogenesis, v. 23, p. 123-130, 2002.

Xiong Y, Sun H, Zhang W, Zhu X, Zhuang P, Zhang J, Wang L, Wu W, Qin L, Tang Z. **Human Hepatocellular Carcinoma Tumor-derived Endothelial Cells Manifest Increased Angiogenesis Capability and Drug Resistance Compared with Normal Endothelial Cells.** Clin Cancer Res, v.15, p. 4838- 4846, 2009.

Wang G, Yang Z, Wang KZ. **Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential.** Am J Transl Res, v. 2, p.65-74, 2010.

Wang Q, He Z, Zhang J, Wang Y, Wang T, Tong S, Wang L, Wang S, Chen Y. **Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance.** Cancer Detect Prev, v. 29, p. 544-551, 2005.

Warburg O. **On respiratory impairment in cancer cells.** Science, v. 124, p. 269–270, 1956.

Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, Takano Y. **Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas.** Hum Pathol, v. 39, p.1042-1049, 2008.

**Estresse ácido confere resistência a drogas em células endoteliais através da
indução de GRP78**

Acidic stress confers chemoresistance on endothelial cells through induction of GRP78

**Manuscript to be submitted on The American Journal of Pathology (ISSN 0002-9440)

Fernanda Visioli,* Yugang Wang, † Goleeta Alam, † Yu Ning, † Jacques E.Nör, † Pantelis
V. Rados,* Peter P. Polverini †.

*Oral Pathology. School of Dentistry, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2492, Porto Alegre,
RS, 90035-003.

† School of Dentistry, University of Michigan. N University 1011, Ann Arbor, MI, 48105.

Abstract: 246 words

Text: 4,935 words

Figures: 6 figures

References: 37 references

Supplemental figures: 1 figure

Abstract

Objectives: Our objective was to investigate the role of the unfolded protein response (UPR) in conferring drug resistance on endothelial cells in response to chronic stress induced by low pH. **Methods:** Acidic stress was induced in primary human dermal microvascular endothelial cell (HDMEC) cultures by adjusting pH to 6.4 or 7.0 with acid lactic or hydrochloric acid (HCl). HDMEC resistance to the antitumor agents Cisplatin, Etoposide, Adriamycin and Sunitinib was assessed. mRNA from tumor associated endothelial cells (TEC) was isolated from human oral squamous carcinomas biopsies by laser capture microdissection. Biopsies were immunostained and analyzed for expression of GRP78. **Results:** HDMEC cultured at pH 6.4 with either lactic acid or HCL showed upregulation of the UPR proteins: GRP78, ATF4, phospho-elf2 α , and XBP1 mRNA splicing, which was followed by cell death after 48 hours. However, when cells were exposed to chronic nonlethal stress at pH 7.0 for 168hrs, HDMEC were able to adapt coincidental with a marked increase in GRP78 protein expression. After 7 days HDMEC showed increased resistance to cell death when exposed to Etoposide, Adriamycin or Sunitinib. Knockdown of GRP78 mRNA reversed the resistance phenotype. GRP78, ATF4 and CHOP were significantly upregulated in TEC from oral squamous cell carcinomas biopsies when compared to untreated HDMEC. **Conclusions:** Acidic pH, an important source of cellular stress in the tumor microenvironment, can activate an adaptive UPR response inducing overexpression of the chemoresistance-associated protein GRP78 in endothelial cells, which might contribute to therapeutic failures in response to anticancer drugs. **Key-words:**

endothelial cells; angiogenesis; oral squamous cell carcinoma; acidic stress; UPR;
GRP78.

Introduction

Antiangiogenic therapy has emerged as a promising alternative for cancer treatment, where the endothelium is targeted, which provides oxygen and nutrients to the tumor. Nevertheless, when Folkman (1971)¹ sentenced that tumors could shrink or be kept dormant by eliminating the blood vessels that nourish them, it was accepted that endothelial cells were stable, so resistance to therapy was improbable to occur. However, tumor associated endothelial cells (TECs) are more resistant to cytotoxic and antiangiogenic therapies than endothelial cells from normal tissues (NECs), showing that there is an inherent resistance of TECs.² This resistant phenotype might be acquired as an adaptation to the tumor microenvironment stressful conditions.³

The tumor microenvironment represents the set of metabolic and physiological characteristics observed in solid tumors. Invasive solid tumors have an altered glucose metabolism, with upregulation of glycolysis.⁴ Conversion of pyruvate into lactic acid even in the presence of oxygen is known as the "Warburg Effect", a unique feature observed in cancers.⁵ This effect has correlation with tumor aggressiveness and it has been suggested to confer a significant advantage on cancer evolution and for the malignant phenotype.⁶ Upregulation of glycolysis results on acidification of the extracellular environment. Reports have shown that the extracellular pH of tumors, including malignant head and neck tumors, is consistently acid.^{4,7} Acidic stress promotes tumor progression and metastasis,⁸⁻¹⁰ however, the effects of this acidification on endothelial cells are not known. Thus, an important feature

of tumor microenvironment yet to be evaluated in the angiogenesis paradigm context is the pH.

A common cell response for alterations on the environment and others insults is the accumulation of unfolded proteins within the reticulum endoplasmic, which may activate the unfolded protein response, a protective mechanism that cells developed to combat reticulum endoplasmic (RE) stress. ER stress is related to any alteration that disrupts the folding proteins function. Therefore, several pathological and pharmacological insults can result in stress in the endoplasmic reticulum, and this stress can be acute or chronic.¹¹ Protein aggregation is toxic to the cell and many pathological conditions are associated with ER stress: neurodegenerative diseases, diabetes and cancer.¹²

The UPR is mediated through the activation of three ER transmembrane stress sensors: pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and inositol-requiring enzyme 1 (IRE1). These proteins are maintained in an inactive state through an interaction with the ER chaperone glucose-regulated protein of 78 kDa (GRP78). Accumulation of unfolded proteins within the ER disconnects GRP78 from these sensors to act as a chaperone, consequently releasing and activating the ER stress sensors.¹³ PERK activation leads to eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) phosphorylation inhibiting protein translation, what promptly reduces the load of nascent proteins being directed into the ER. PERK also induces ATF4, a transcription factor which upregulates ER chaperones (as GRP78 and GRP94), in addition to the transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) which is known to promote apoptotic cell death.^{14,15} Dissociation of the sensor ATF6 from GRP78

triggers its translocation to the Golgi structure, where it is cleaved to its active form. Active ATF6 is then translocated to the nucleus, where it induces transcription of genes including GRP78, GRP94, protein disulphide isomerase (PDI) and X box-binding protein 1 (XBP1). The third ER stress sensor, IRE1, activation is responsible for the unconventional splicing of XBP1 mRNA. This alternatively spliced XBP1 encodes a transcription factor that targets diverse genes including ER chaperones.¹⁶ Each one of the ER sensors activates a transcription factor that induces proteins which will function to counteract ER stress and act in a pro-survival capacity.¹⁷

If activation of the unfolded protein response is successful in removing misfolded proteins accumulated in the ER, normal protein translation is resumed and the cell recovers. Acute stress, if not solved promptly can lead to apoptosis. In turn, chronic stress requires an almost permanent activation of UPR where stress can be persistently tolerated and cells may survive and adapt to stressful stimuli.^{17,18}

A common finding in a variety of tumors is an increased immunohistochemical expression of GRP78.^{19,20} Reduction of GRP78 expression by siRNA results in activation of the UPR and apoptosis.²¹ Upregulation of GRP78 has been related to chemoresistance to different cytotoxic drugs, such as doxorubicin on squamous carcinoma cells;²² temozolomide on glioma cells;²³ cisplatin on melanoma cells²⁴ and etoposide and temozolomide on tumor associated endothelial cells.²⁵

The aim of this study was to evaluate the effects of the acidic stress on endothelial cells phenotype and UPR activation. Also, to assess the levels of UPR markers in endothelial cells from the microvasculature of oral squamous cell carcinomas.

Methods

Cell Culture

Primary human dermal microvascular endothelial cells HDMEC (Lonza, Walkersville, MD) were cultured in endothelial growth medium EGM2-MV (Lonza, Walkersville, MD) at 37°C with 5% CO₂. Medium pH was adjusted with 1M lactic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or 1M HCL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), pH was measured with pH meter (Accumet, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), at same culture conditions. Oral squamous cell carcinoma (UMSCC-81B) and Glioblastoma (U-87) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 0.05% penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C with 5% CO₂. Conditioned medium (CM) from tumor cells was prepared in endothelial cell basal medium (EBM) without supplementation of growth factors or serum from 48-hours cultures under hypoxia. Collected CM was supplemented with glucose 1.0 g/L (5.55 mM) and sterilized by 0.22 µm pore filters (Millipore, Billerica, MA). The chemotherapeutic drugs used were: Sunitib (LC Laboratories, Woburn, MA) and Etoposide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), which were dissolved in DMSO, while Adriamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in water and Cisplatin (Bedford Lab, Bedford, OH) was ready to use.

Stable Short Hairpin RNA (shRNA) Transduction

Lentiviruses expressing a short hairpin RNA (shRNA) construct for GRP78 (Vector Core, University of Michigan) were generated in human embryonic kidney cells (293T) transfected by the calcium phosphate method. Scrambled oligonucleotide sequences (shRNA-C) were used as controls. Supernatants were collected 48 hours after transfection and used to infect HDMEC in 1:4 dilution medium containing 4 µg/ml polybrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Significant downregulation of GRP78 expression was achieved after 48 hours of infection.

Sulforhodamine B assay

Sulforhodamine B (SRB) cytotoxicity assays were done as described.²⁶ Briefly, cells were seeded at 2×10^3 cells per well of 96-well plates, allowed to attach overnight, and treated with Cisplatin, Etoposide, Adriamycin or Sunitinib for 72 hours. Cells were fixed with 10% trichloroacetic acid, stained with 0.4% SRB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in 1% acetic acid, and plates were read in a microplate reader at 560 nm. Test results were normalized against initial plating density and drug-free controls. Data were obtained from triplicate wells per condition and is representative of three independent experiments.

Western Blot

Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and membranes were probed overnight at 4°C with the following antibodies from SantaCruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): rabbit anti-GRP78 (clone Sc-13968), rabbit anti-ATF4 (clone Sc-22800), rabbit anti-CHOP (clone Sc-575), mouse anti-β-actin (clone Sc-47778); and from Cell

Signaling (Danvers, MA): rabbit anti-*p*-eIF2 α (clone 3597), rabbit anti-eIF2 α (clone 9722), mouse anti-caspase 7 (clone c7). Proteins were detected using peroxidase conjugated secondary antibodies and bands were visualized using enhanced chemiluminescence (Amersham, Sunnyvale, CA).

Cell Cycle analysis

Endothelial cells were trypsinized, washed with PBS twice and then fixed with 70% ethanol on ice for 1h. The fixed cells were spun down and resuspended in PBS. After incubation with ribonuclease (RNase A) at a final concentration of 25 μ g/mL at 37°C for 30 minutes, the cell suspension was stained with propidium iodide before analysis on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) at the Flow Cytometry Core, University of Michigan Comprehensive Cancer Center.

Laser Capture Microdissection

Tumor biopsies of oral squamous cell carcinomas from the Oral Pathology archive (School of Dentistry, UMICH) were used. Tissue sections were mounted on Glass foiled pen slides for laser capture microdissection (LCM, Leica) and stained with Hematoxylin. A two-step process was used for cell collection in a microdissection microscope (Leica AS LMD, Leica) with a pulsed 337-nm UV laser by a trained pathologist (FV). First blood cells in capillaries were eliminated then, endothelial cells were dissected. Approximately 5000 endothelial cells were retrieved from each tumor. The RNA from independent tumors was analyzed by RT-PCR and real-time PCR for comparison to HDMEC samples untreated from different passages.

Real-Time PCR

Total RNA of endothelial cells from paraffin-embedded tissue sections obtained by LCM method was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and purified with RNeasy Mini kits (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturers' protocols. A cDNA library was prepared with WTA2, TransPlex Complete Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), which was then amplified using a universal end primer. Total mRNA was harvested from treated HDMEC cell cultures with RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) and cDNA was made according to the manufacturer's instructions with Verso™ cDNA kit (ThermoScientific, Waltham, MA).

Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) was performed with following Roche Taqman primer/probe sets: GRP78 (Hs99999174_m1), ATF4 (Hs00909569_g1), CHOP (Hs01090850_m1) and β -tubulin (Hs 03929064_g1) using Gene Expression Assays reagents (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). All reactions were done in triplicate, with each run containing at least one negative and one positive control, and the data were normalized by the data of endogenous β -tubulin.

RT-PCR

Total mRNA was harvested from treated cell cultures with RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) and cDNA was made according to the manufacturer's instructions with Verso™ cDNA kit (ThermoScientific, Waltham, MA). Semi-quantitative

reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis of spliced and unspliced XBP1 was performed with a single human-specific primer pair ACA CGC TTG GGA ATG GAC AC (sense) and CCA TGG GAA GAT GTT CTG GG (antisense). The following primers sequences were used: GAPDH, CATGGCCTCCAAGGAGTAAG (sense) and AGGGGTCTACAGGCAACTG (antisense); VEGFR2, AGCGATGGCCTCTTCTGTAA (sense) and ACACGACTCCATGTTGGTCA (antisense); E-cadherin, TGCCCAGAAAATGAAAAGG (sense) and GGATGACACAGCGTGAGAGA (antisense). For XBP1 splicing analysis, amplicons were visualized with a Qiaxcel (Qiagen, Valencia, CA) automated nucleic acid fragment analyzer using a high resolution cartridge on the M500 setting using a 15bp - 1kb alignment marker and a 50bp - 800bp size marker.

Immunofluorescence

Sections from the same tumors used for LCM and samples from normal oral mucosa were deparaffinized in xylene, rehydrated, and washed with Wash Buffer (Dako, Carpinteria, CA), then incubated in low pH antigen-retrieval solution (Dakocytomation; Dako, Carpinteria, CA) for 20 minutes at 95°C. Double staining was performed using the monoclonal mouse CD31 (Clone JC70A, Dako, Carpinteria, CA), which was used to localize the microvascular networks, and polyclonal rabbit GRP78 (clone H-129, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The following secondary antibodies were used: mouse Alexa Fluor 488 and rabbit Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Eugene, OR). Slides were counterstained with 3.5 µM DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and mounted with Fluorescent Mounting Media (Dako, Carpinteria, CA). Images were taken

with Olympus IX70 microscope (Tokyo, Japan) and analyzed by *ImageJ* software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analyses

For statistical comparison of experimental groups, *t*-test, one-way ANOVA and two-way ANOVA were used, followed by Bonferroni post-hoc test, using Software *Statistical Package for the Social Sciences* version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) and GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

Results

Acidic stress induces UPR on endothelial cells

Solid malignant tumors are commonly acid, so we analyzed the effects of low pH in endothelial cells. Primary human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were cultivated in medium, which pH was adjusted to 6.4 with acid lactic. Acidification with HCl was used to verify specificity of results. After 48 hours in pH 6.4 medium, endothelial cells showed strong upregulation of UPR markers proteins: GRP78, ATF4, phosphorylation of eIF2 α and increased cleavage of XBP1 mRNA (Figures 1A, B, D, E) when compared to endothelial cells kept at regular pH 7.5 for the same time. CHOP protein levels, which is associated with UPR-induced apoptosis, were not detectable, but mRNA levels were increased in acid medium (Figures 1C, F).

In a way to create a scenario more likely the tumor environment, tumor conditioned medium (CM) was used to induce acidic stress in HDMEC cells. The CM was produced keeping SCC-81B oral squamous cell carcinoma cells under hypoxia, so they were forced to do glycolysis. The CM was supplemented by glucose to 5.55 mM, the same concentration from the regular endothelial medium to avoid glucose deprivation in endothelial cells. The final pH of CM was 6.2. These experiments were repeated with a second tumor cell model, U-87 glioblastoma cell line, to verify the cell type-specificity of these results. U-87 cells produced a final CM which pH was 6.0. After CM treatment for 48 hours endothelial cells showed similar UPR induction (Supplemental Figure S1). Collectively these results demonstrated that acid pH is an

UPR inducer, however HDMEC cells were not able to survive in such stressful environment, massive cell death occurred after 48 hours at pH 6-6.4 (Figures 1 and S1).

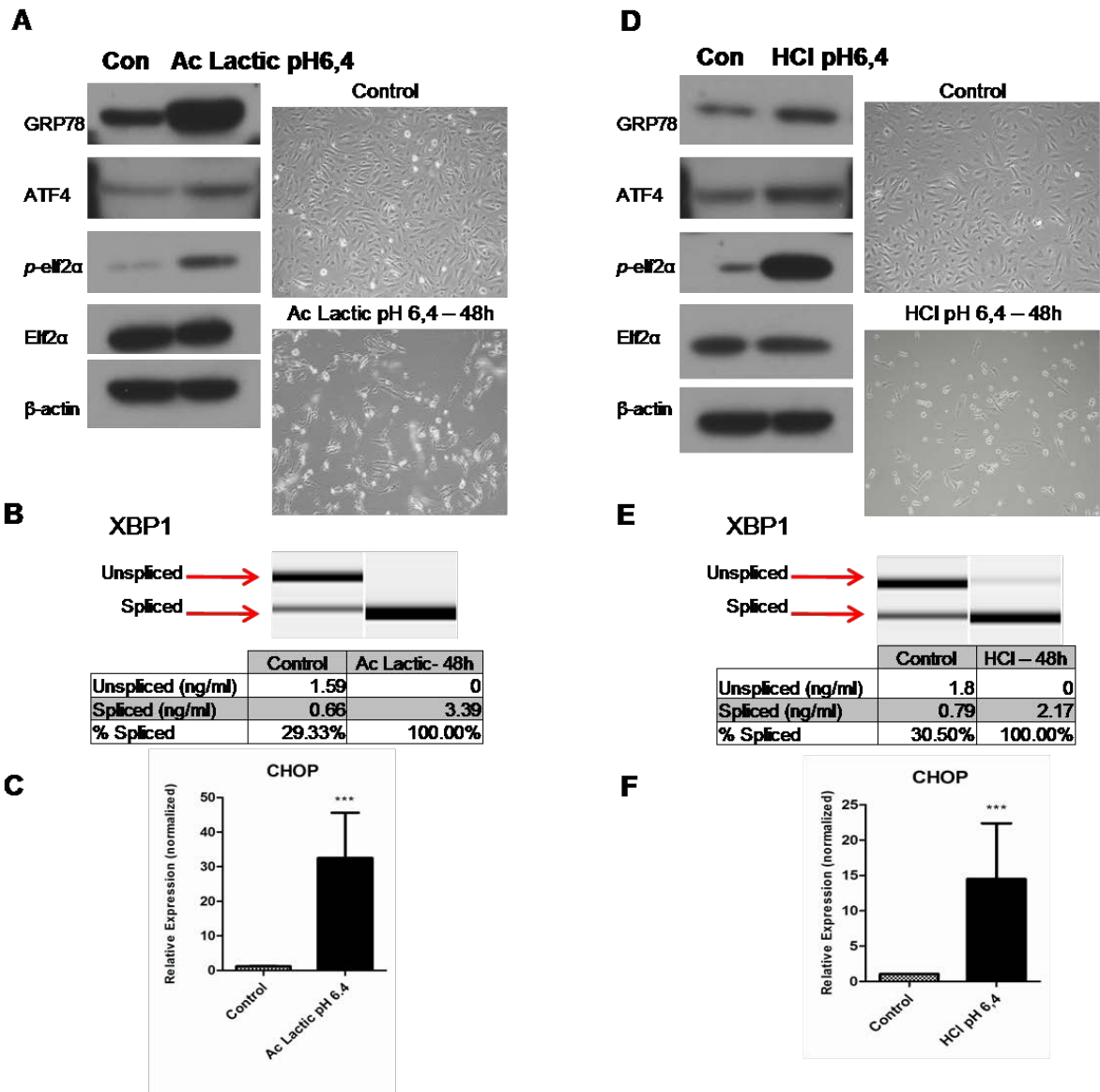
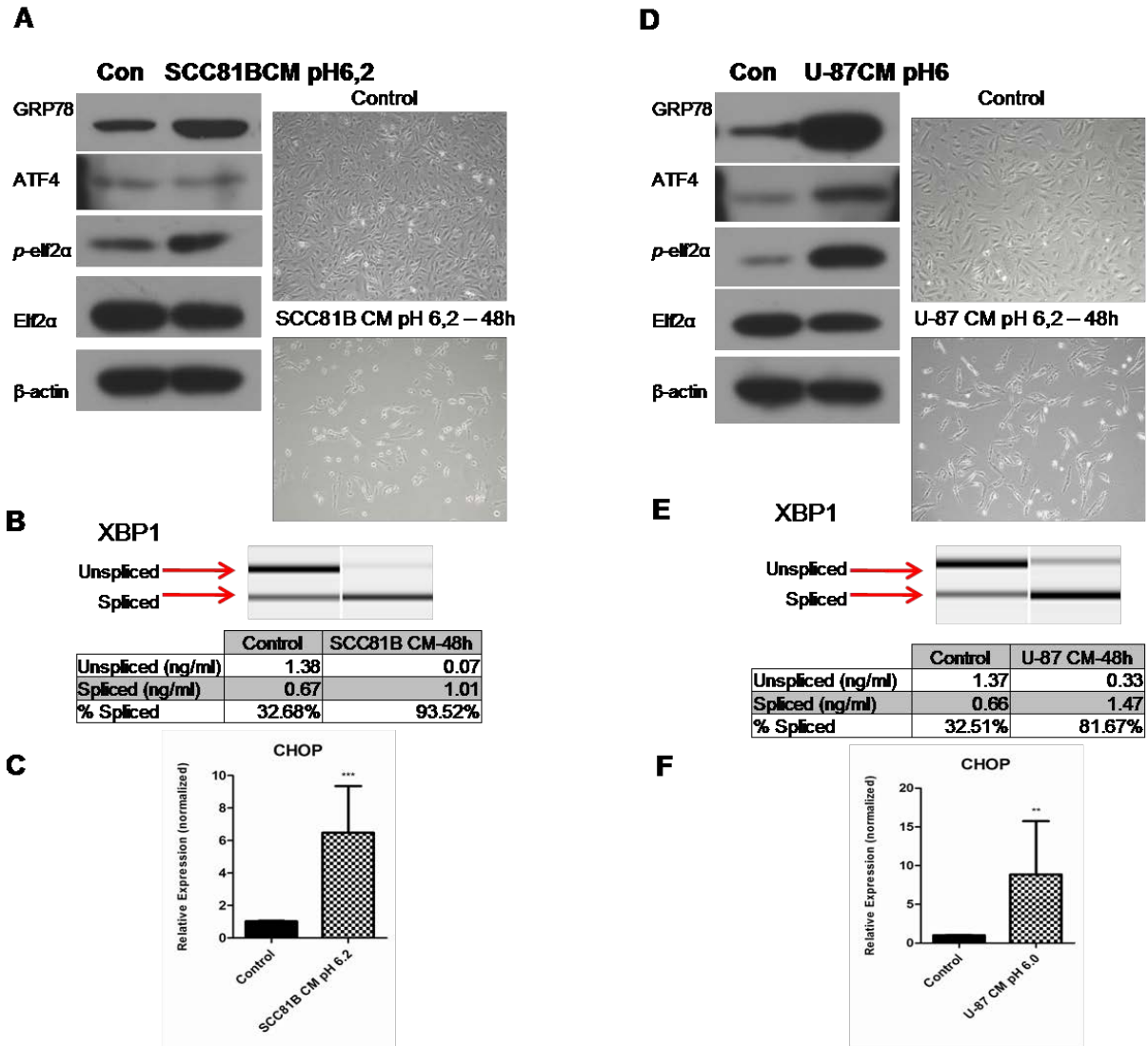


Figure 1. Acidic stress induces UPR on endothelial cells. Primary human endothelial cells HDMEC were maintained in acidic cultures for 48 hours, which pH was adjusted by lactic acid (**A-C**) or HCl (**D-F**), HDMEC cells at regular pH 7.5 served as control. Cells lysates were collected to western blot analysis, β-actin expression was used as a loading control. **A, D**, Treatment with low pH increased protein expression of UPR markers: GRP78, ATF4, *p*-elf2α and induced massive cell death at 48 hours. RNA was

collected using Qiagen RNAeasy kit, reverse transcribed and analyzed using RT-PCR. **B, E**, Exposure to reduced pH increased XBP1 splicing levels at 48 hours. **C, F**. Acidic stress upregulated CHOP mRNA levels. *** $p < 0.001$.



Supplemental Figure S1. Acid tumor conditioned medium induces similar UPR on endothelial cells. Primary human endothelial cells HDMEC are maintained in acid conditioned medium obtained from oral squamous cell carcinoma UMSCC-81B cell line (**A-C**) or U-87 glioblastoma cell line (**D-F**), HDMEC cells at regular pH 7.5 served as control. Cells lysates were collected to western blot analysis, β -actin expression was used as a loading control. **A, D**, Treatment with acid CM increased protein expression of UPR markers: GRP78, ATF4, p -elf2 α and induced massive cell death at 48 hours. RNA

was collected using Qiagen RNAeasy kit, reverse transcribed and analyzed using RT-PCR. **B, E**, Exposure to CM increased XBP1 splicing levels at 48 hours. **C, F**. Acidic stress upregulated CHOP mRNA levels. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Mild acidic stress induces GRP78 expression mainly and allows endothelial cell adaptation e proliferation

Mild acidic stress was induced by regulating pH medium to pH 7.0 and UPR markers were monitored during a period of 7 days. Besides some fluctuation on others UPR markers, GRP78 was the mainly induced protein (Figures 2A, B), with its levels increasing over time. No significant changes were observed on XBP1 mRNA splicing levels (Figure 2C) or CHOP mRNA levels (Figure 2D). Under mild acidic stress HDMEC cells were able to proliferate although slightly slower than cells on regular medium (Figure 2F), moreover no significant changes were observed on cell cycle distribution (Figure 2E). These results suggest that endothelial cells are able to adapt to mild acidic stress by upregulation of GRP78 levels.

Chronic exposition to mild acidic stress results in a chemoresistance phenotype

GRP78 upregulation suggests that mild acidic stress may confer chemoresistance to endothelial cells. To test this hypothesis, the sensitivity of HDMEC cells to chemotherapeutic agents was compared, between cells exposed or not to acid pH. After exposure of endothelial cells to pH 7.0 medium for up to 7 days, cells were treated with different agents: the topoisomerase II inhibitors etoposide (1-75 $\mu\text{mol/L}$) and adriamycin (0.005-1 $\mu\text{mol/L}$), the crosslinking DNA drug cisplatin (0.25-50 $\mu\text{mol/L}$) and the antiangiogenic drug sunitinb (1-100 $\mu\text{mol/L}$) or DMSO (vehicle; 0.1%) for 72 hours, under the same culture conditions – pH 7.0 or 7.5 - and analyzed for cytotoxicity

by SRB assay. The exposure to a previous chronic acidic stress has proven to enhance drug resistance to 3 of these drugs: adriamycin, etoposide and sunitinib (Figure 3).

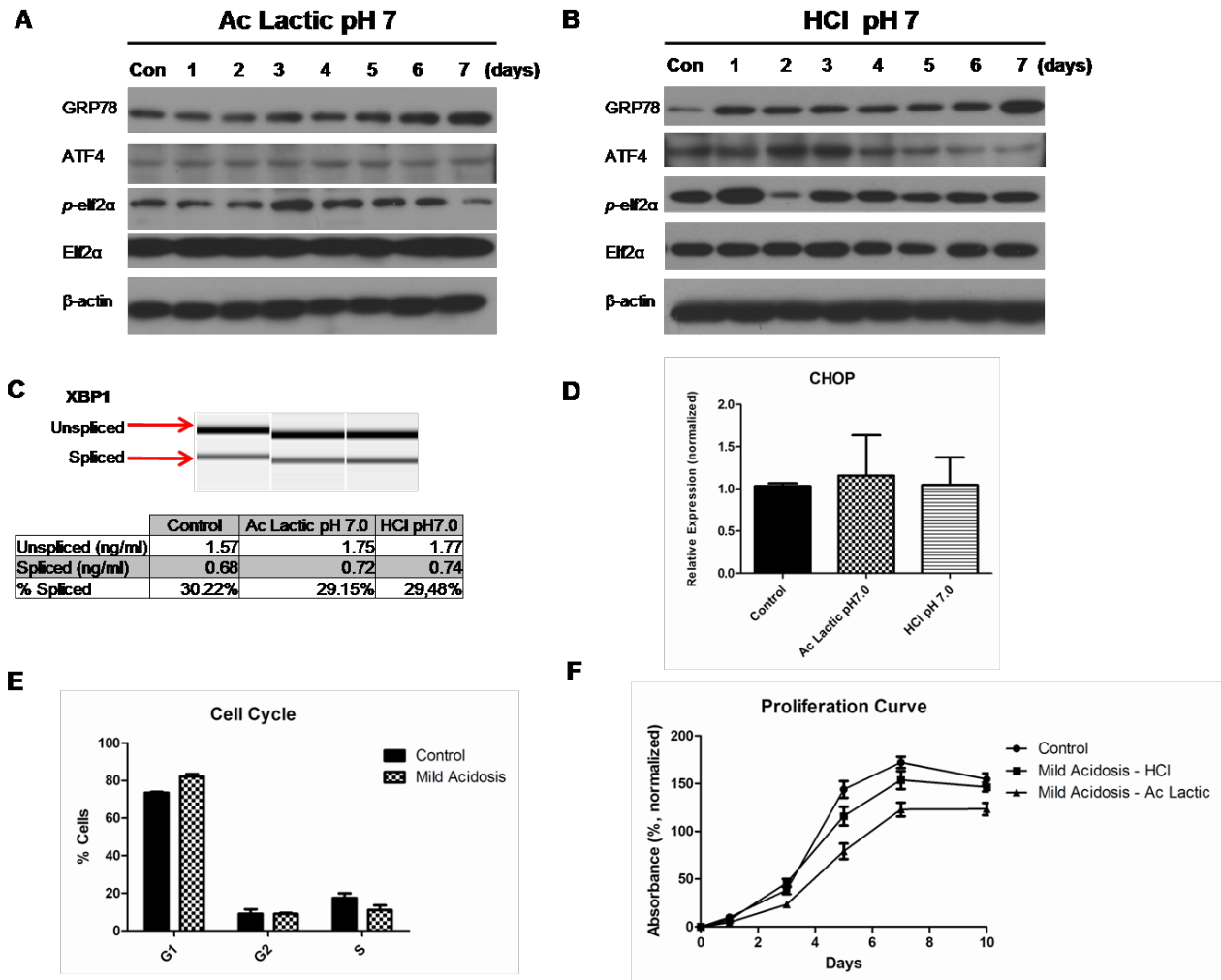


Figure 2. Mild acidic stress induces GRP78 expression mainly and allows endothelial cell adaptation e proliferation. HDMEC cells were maintained in acidic cultures (pH 7.0) for seven days, which pH was adjusted by lactic acid (**A**) or HCl (**B**), HDMEC cells at regular pH 7.5 served as control. Cells lysates were collected to western blot analysis, β -actin expression was used as a loading control. **C**, **D**, RNA was collected using Qiagen RNAeasy kits. XBP1 splicing and CHOP levels remained unaltered after exposure to mild acidic stress for seven days. **E**, HDMEC cells exposed to pH 7.0 for seven days and HDMEC cells kept on pH 7.5 for same period were stained with

propidium iodide and cell cycle was analyzed by flow cytometer, no difference on cell cycle distribution was observed. **F**, proliferation rates were determined by SRB assay.

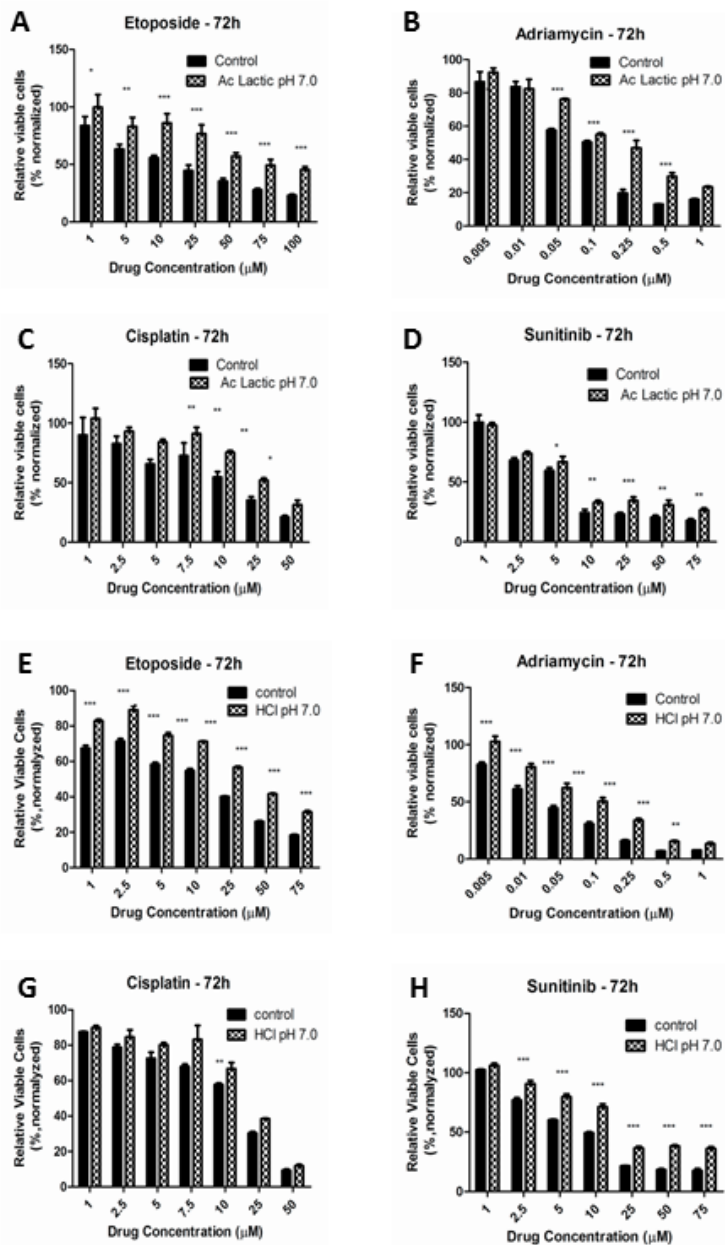


Figure 3. Chronic exposition to mild acidic stress results in a chemoresistance phenotype. Cells under acidic stress and control cells at regular pH 7.5 after seven days were exposed to etoposide, adriamycin, cisplatin, sunitinib at different doses and vehicle control (DMSO) for further 72h and then examined for cell viability using the SRB assay. Vehicle treatment served as 100% viable control. Significance is calculated

by comparing drug-treated cells and vehicle control-treated cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

GRP78 knockdown reverses the resistant phenotype

Chronic exposure to mild acidic stress induces mainly GRP78 expression. To determine whether GRP78 overexpression is a key contributing factor to drug resistance on endothelial cells, HDMEC cells were infected with lentivirus expressing control scramble shRNA sequence or shRNA specifically targeted against human GRP78 (shGRP78). Four days after infection, cell samples were analyzed for GRP78 protein expression by western blot. Whereas GRP78 protein was reduced by shGRP78; no significant change in GRP78 expression was observed with shControl compared with uninfected HDMEC (Figure 4I). If GRP78 confers drug resistance to HDMEC, then knockdown of this protein should overcome resistance. To test this, both ShRNAGRP78 and ShRNAControl cells were kept on acid medium for 7 days and then treated with etoposide (1-75 $\mu\text{mol/L}$), adriamycin (0.05-1 $\mu\text{mol/L}$), cisplatin (0.1-50 $\mu\text{mol/L}$) and sunitinib (1-75 $\mu\text{mol/L}$) for another 72 hours and then analyzed for cytotoxicity. We observed that HDMEC infected with shGRP78 exhibited a significant increase in cytotoxicity after treatment with etoposide, adriamycin and sunitinib (Figures 4A, B, D), no difference was observed for cisplatin treatment (Figure 4C).

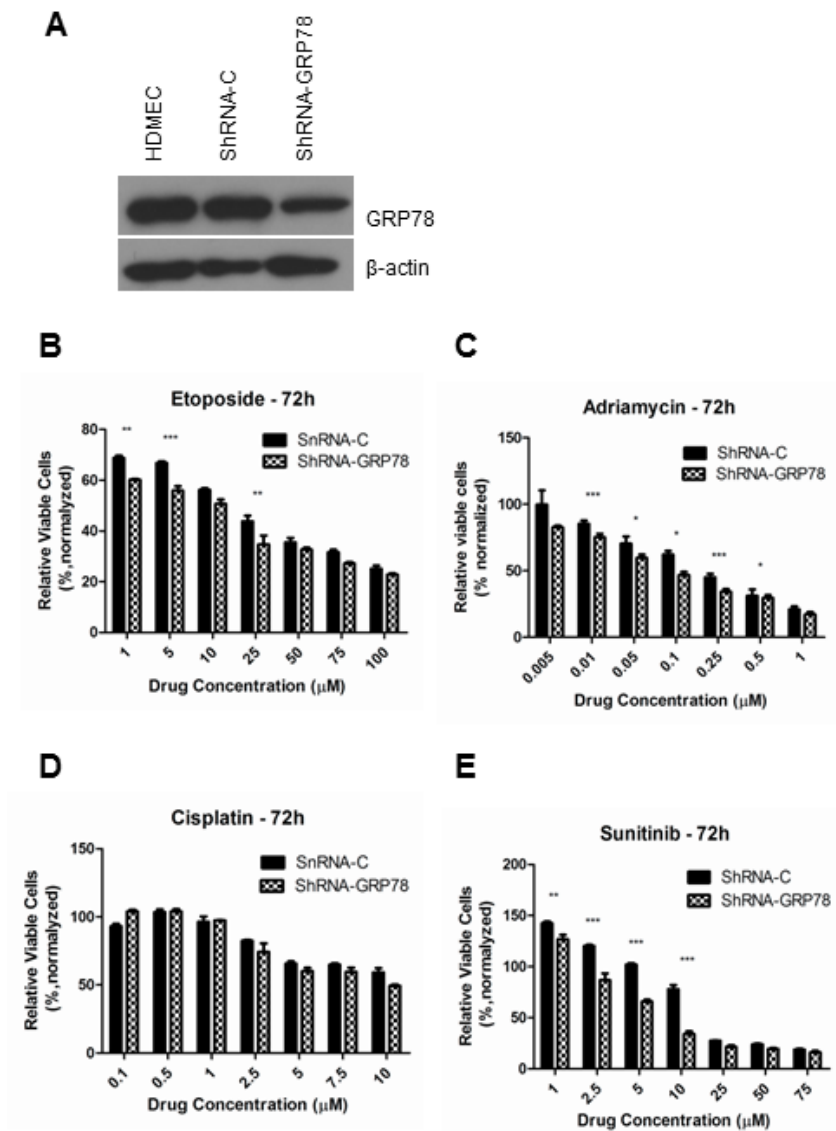


Figure 4. GRP78 knockdown reverses the resistant phenotype. **A**, HDMEC cells were infected with control ShRNA (ShRNA-C) or ShRNA specifically targeted against human GRP78 (ShRNA-GRP78) or left uninfected; Four days after infection, cells were harvested for Western blot analysis and probed for GRP78 and β -actin. **B-E**, Seven days after mild acidic stress (pH 7.0), ShRNA-C and ShRNA-GRP78 cells were treated with vehicle, etoposide, adriamycin, cisplatin or sunitinib for another 3 days. At the conclusion of the experiments, cell viability was analyzed using the SRB assay. Comparisons were made between ShRNA-C and ShRNA-GRP78 groups for each drug. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Acidic stress suppresses drug-mediated cleavage of caspase 7

In search for a potential mechanism involved in GRP78 induced chemoresistance, we analyzed the impact of previous chronic exposure to mild acid pH on cleavage of caspase 7. It has been shown previously that among the executor caspases, caspase 7 is associated genotoxicity drugs-induced cell death, moreover GRP78 can directly inhibit its activation.^{27,28} Upon induction of apoptosis, procaspase 7 (35 kDa) is first converted into a 30-kDa intermediate, which is further processed into an active 20-kDa subunit. HDMEC cells exposed to chronic mild acidic stress previously presented lower levels of caspase 7 activation after all the drugs tested (Figure 5).

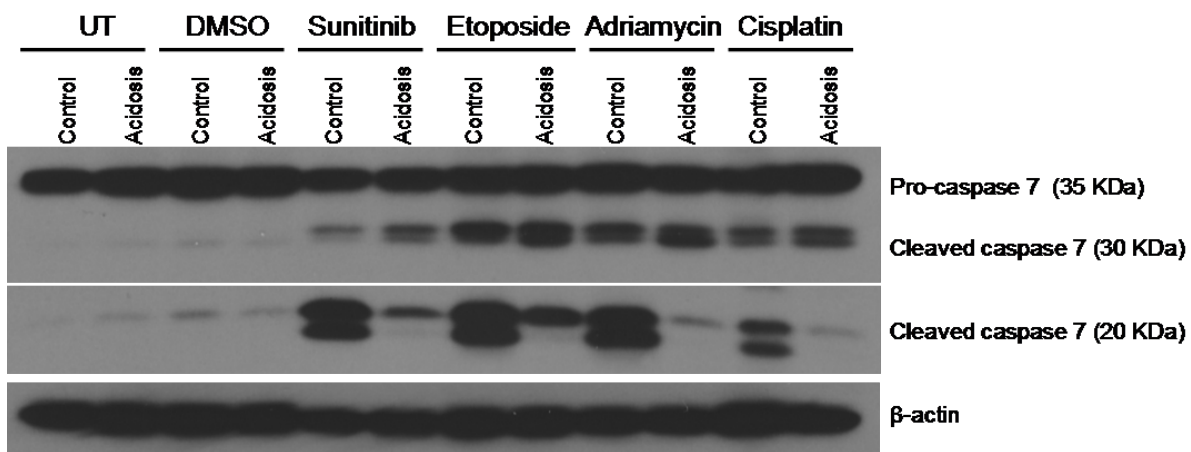


Figure 5. GRP78 acidic-induced suppresses drug-mediated cleavage of caspase 7. Primary human endothelial cells HDMEC were maintained in acidic cultures (pH 7.0) for 7 days, HDMEC cells at regular pH 7.5 served as control. At day 7, cells were treated with DMSO (Vehicle, 1%), Sunitinib (0.25 μ M), Etoposide (50 μ M), Adriamycin (0.25 μ M) and Cisplatin (10 μ M) for further 48 hours when cells lysates were collected to western blot analysis and probed for caspase 7 and β -actin. Previous exposition to acidic stress resulted in lower levels of cleaved caspase 7.

***In vivo* expression of UPR markers in tumor vasculature**

To assess the levels of UPR markers in tumor-associated endothelial cells from human patients, laser capture microdissection of paraffin sections of samples of human oral squamous cell carcinomas was performed to retrieve either the endothelial cells lining the blood vessels or the tumor cells surrounding these blood vessels (Figure 6A). To confirm the purity of the samples used in the experiments described below, RT-PCR using VEGFR2 as a marker for endothelial cells and E-cadherin as a marker for tumor cells (Figure 6B) was performed. Notably, GRP78 mRNA expression levels were ~300-fold higher in endothelial cells retrieved from inside the oral squamous cell carcinoma tumors, as compared with mRNA retrieved from control untreated HDMEC cells (Figure 6C). We also observed that tumor-associated endothelial cells additionally express more ATF4 (~45-fold) and CHOP (~25-fold) than normal endothelial cells (Figures 6 D and E, respectively).

To address whether this observation is valid *in situ*, i.e. the vasculature of tumor tissues, sections of oral squamous cell carcinoma were immunostained for both GRP78 (red) or the endothelial cell marker CD31 (green), with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue) staining the nuclei (Figure 6F). Merged images confirmed that GRP78 was highly expressed in both the tumor vasculature and carcinoma cells (Figure 6F, upper row). By contrast, normal oral mucosa tissues exhibited CD31-positive (green) blood vessels but minimal labeling for GRP78 (Figure 6F, lower row). Merged images endorsed no GRP78 expression in vasculature of normal oral mucosa. These data show that GRP78 is preferably expressed in the tumor vasculature of oral squamous cell carcinomas and tumor cells compared with normal oral mucosa.

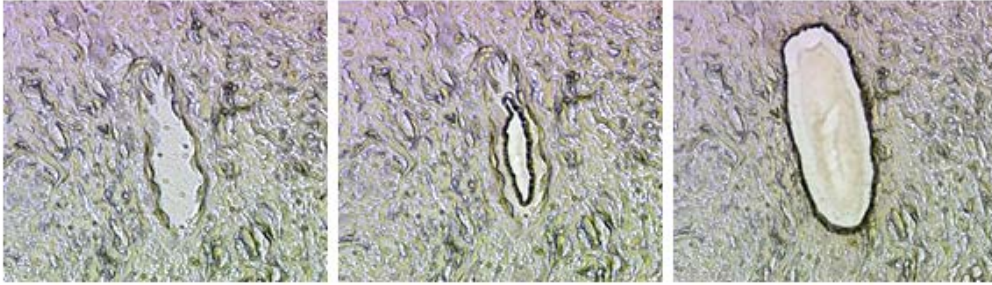
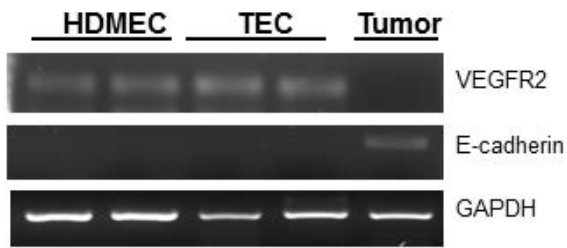
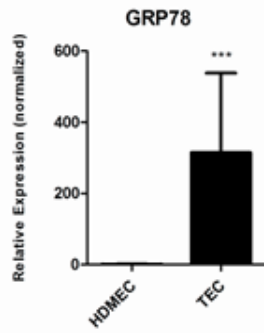
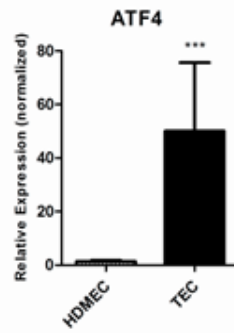
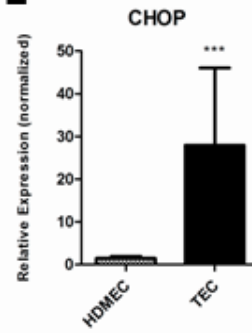
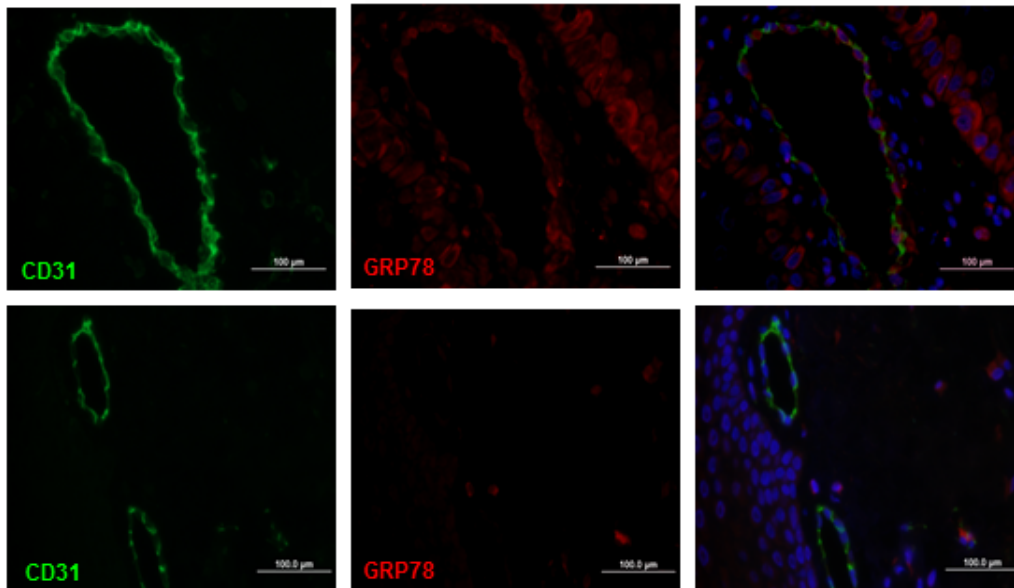
A**B****C****D****E****F**

Figure 6. *In vivo* expression of UPR markers in vasculature of oral squamous cell carcinoma. **A**, characterization of the technique based on LCM used for retrieval of endothelial cells from paraffin embedded tissue sections. **B**, quality control check of RNA from endothelial cells or tumor cells using VEGFR2 (marker for endothelial cells) and E-cadherin (marker for cells of ectodermal origin). **C, D, E**, real-time PCR used to quantify GRP78, ATF4 and CHOP expression in endothelial cells retrieved from the tumor mass compared to primary endothelial cells. Specimens were obtained from oral squamous cell carcinoma biopsies. Data presented from real-time PCR experiments reflect the expression level of GRP78, ATF4 and CHOP normalized by β -tubulin. *** $p < 0.001$. **F**, Histological sections of oral squamous cell carcinoma tissues (top) or normal oral mucosa tissues (bottom) were stained with anti-GRP78 antibody (red), anti-CD31 antibody (green), and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue) nuclear staining; the images were merged in the last panel. Bar, 100 μ m.

Discussion

Recently it has become evident that tumor associated endothelial cells are more chemoresistant to drugs when compared to NECs.² We report that acidic stress induces a resistant phenotype to a set of drugs on endothelial cells. Exposition to pH 6.4 strongly induces the Unfolded Protein Response and cell death after 48 hours, while exposition to mild acidic stress triggers an adaptive UPR with selective expression of GRP78. The acid pH of tumors is well known to increase chemoresistance on tumor cells.²⁹⁻³¹ Nevertheless, to our best knowledge this is the first report of acidic stress improving drug resistance on endothelial cells through GRP78 induction.

The UPR response is structured in order to induce both adaptation to stress and apoptosis, according upon the intensity of stress. Considering that the UPR is related to several pathological conditions, to understand how UPR allows for adaptation, instead of apoptosis, is very important, so therapies can be developed, to avoid apoptosis for diseases as neurodegenerative disorders and diabetes, or to induce apoptosis for cancer treatment for instance. Rutkowski et al. (2006)¹⁸ demonstrated that a possible mechanism of adaptation to mild stress is the consistent expression of proteins that facilitate survival, in particular ER chaperones, without persistence of proapoptotic proteins such as CHOP, possibly due to selective intrinsic instabilities of mRNAs and proteins. Therefore, ours results are in agreement with Rutkowski et al. (2006)¹⁸ since HDMEC cells adapted to chronic stress induced by acid pH upregulating GRP78, an ER chaperone with pro-survival function. CHOP protein levels were not detectable in HDMEC cells, except when GRP78 was downregulated by ShRNA (data not shown), while CHOP mRNA levels were increased by acid pH.

The resistant phenotype induced by acidic stress was abrogated by GRP78 knockdown, demonstrating that GRP78 increases resistance to different drugs, as etoposide, adriamycin and sunitinib. Meanwhile, no significant protective effect was observed to cisplatin treatment, the experiment was repeated 3 times, with no consistent results. Although GRP78 is known to induce chemoresistance to several drugs, its role to protect against cisplatin is controversial, while Chatterjee et al. (1997)³² showed that the GRP78-overexpressing V79 chinese hamster cells are hypersensitive to DNA cross-linking agents, such as cisplatin; Jiang et al. (2009)²⁴ demonstrated the opposite in melanoma cells, overexpression of GRP78 attenuated induction of apoptosis by cisplatin treatment.

Whereas the majority of GRP78 resides in the ER lumen, It has been shown that a fraction of GRP78 exists as an ER transmembrane protein, what could explain how GRP78 is able to directly inhibit the activation of caspase 7, an executor caspase activated by both ER stress and genotoxic drugs.^{27,28} Ours results are consistent with this notion, previous exposition to acidic stress decreased the levels of cleaved caspase 7 in HDMEC cells under drug treatment.

The effects of acid pH in the endoplasmic reticulum homeostasis are poorly understood. There are several possible ways by which acid pH may induce ER stress, including direct inactivation of enzymes involved in ER protein processing, denaturation of proteins, and inhibition of the ER Ca²⁺/ATP-ase.^{33,34} Previous reports have shown the effects of acid pH in coronary endothelial cells, regarding the myocardial ischemia set: the main pathway of the simulated acidity-induced apoptosis consists of the Ca²⁺ leak from the ER.³⁵ Therefore, acidic stress may cause ER stress by decreasing ER

Ca²⁺ levels, which it is required for optimum protein folding because many of chaperones are Ca²⁺-dependent.²⁰ Kumar et al., (2008)³⁶ revealed that acidic preconditioning (APC) suppresses apoptosis in coronary endothelial cells under simulated ischemia. APC was held by exposing ECs for 40 minutes to acid medium (pH 6,4) followed by a 14 hours recovery period. These effects were associated with an overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL, induced 14 hours after APC, whereas no effect on the expression of chaperones was detected. These results differ from ours, possibly because of different time points and different culture conditions, in our system GRP78 upregulation could only be detected after 24 hours, moreover we did not observe increased antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL expression after acidic exposition (data not shown). This concept of stress improving resistance to cell death is in accordance to the preconditioning paradigm: almost any stress factor that is potentially harmful for cells can elicit a preconditioned state, i.e. increased resistance to the damaging stress, when applied in small quantities.³⁷

In addition to *in vitro* data, we used Laser capture microdissection (LCM) to verify the expression of UPR markers in endothelial cells isolated from human biopsies of oral squamous cell carcinomas. LCM offers a promising approach for analysis of the endothelium gene expression profile in its own native environment. The data obtained from LCM shows that the tumor vasculature constitutively overexpresses GRP78. Notably, GRP78 mRNA expression levels were ~300-fold higher in endothelial cells retrieved from inside the tumor mass, as compared with primary human control endothelial cells. Moreover, TEC cells also showed increased expression of others UPR markers, ATF4 (~45-fold higher) and CHOP (~25-fold higher). Double

immunofluorescence staining with CD31 targeting the vasculature and GRP78 confirmed higher expression of GRP78 in tumor associated endothelial cells and carcinoma cells compared to the vasculature and epithelium from normal oral mucosa tissues. Virrey et al. (2008)²⁵ also reported increased expression of GRP78 in human brain endothelial cells derived from blood vessels of malignant glioblastoma tissues and this expression was related to chemoresistance to CPT-11, Etoposide, and Temozolomide.

Since the tumor angiogenesis field emerged several antiangiogenic therapies have been developed, however antiangiogenic therapies are not producing the sustained antitumor benefit despite promising results *in vitro*, suggesting that tumor associated endothelial cells biology is more complex than previously thought.³ These mixed results are possibly due to the fact that most of tumor angiogenesis studies don't take into account the tumor microenvironment. Acid pH is an important feature of this environment, therefore it may modify the endothelial phenotype. This work illustrates the complexities of the tumor environment effects on tumor angiogenesis biology.

Given the importance of the extracellular environment in mediating endothelial cell phenotype, it is important to study endothelial cells in the context of their native tissue. This work highlights acidic stress as an important feature of the tumor microenvironment that modifies endothelial cell phenotype. Also, this work suggests that UPR-mediated endothelial resistance may contribute to therapeutic failures in response to anticancer drugs and that GRP78 is a promising target for sensitizing endothelial cells to drugs.

Acknowledgements

No conflicts of interest are declared. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) and by Sharon and Larry Daniels Cancer Biology Fellowship.

References

1. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Eng J Med* 1971, 285: 1182-1186.
2. Xiong Y, Sun H, Zhang W, Zhu X, Zhuang P, Zhang J, Wang L, Wu W, Qin L, Tang Z. Human Hepatocellular Carcinoma Tumor-derived Endothelial Cells Manifest Increased Angiogenesis Capability and Drug Resistance Compared with Normal Endothelial Cells. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 4838-4846.
3. Dudley AC, Klagsbrun M. Tumor Endothelial Cells Join the Resistance. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 4787-4789.
4. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwalla ZM. MRI of the Tumor Microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002, 16: 430–450.
5. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, 124: 269-270.
6. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev* 2004, 4: 891-899.

7. Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. Intracellular and Extracellular Tumor pH Measurement in a Series of Patients With Oral Cancer. *J Craniofacial Surg* 2007, 18: 1051-1054.
8. Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Frankenne F, Foidart JM, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2005, 280:10938-10944.
9. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006, 66: 6699–6707.
10. Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008, 18: 330–337.
11. Kaufman, RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002, 110: 1389-1398.
12. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006, 7: 880-885.

13. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005, 74: 739-789.
14. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 2001, 7: 1165-1176.
15. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004, 18: 3066-3077.
16. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003, 23: 7448-7459.
17. Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *TRENDS Bio Sci* 2007, 32: 469-476.
18. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Akha AAS, Raden D, Kaufman RJ. Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. *PLOS Biol* 2006, 4: 2024-2041.

19. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 2007, 67: 3496-3499.
20. Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 2009, 625: 234-246.
21. Suzuki T, Lu J, Zahed M, Kita K, Suzuki N. Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys* 2007, 468: 1-14.
22. Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA. Functional coupling of p38-induced upregulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res* 2006, 66: 1702-1711.
23. Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS. The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Res* 2007, 67: 9809-9816.
24. Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, Zhang XD. Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma Cells. *Carcinogenesis* 2009, 30: 197-204.

25. Virrey JJ, Dong D, Stiles C, Patterson JB, Pen L, Ni M, Schönthal AH, Chen TC, Hofman FM, Lee AS. Stress Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. *Mol Cancer Res* 2008, 6: 1268-1275.
26. Zeitlin BD, Joo E, Dong Z, Warner K, Wang G, Nikolovska-Coleska Z, Wang W, Nör JE. Antiangiogenic effect of TW37, a small-molecule inhibitor of bcl-2. *Cancer Res* 2006, 66: 8698-8706.
27. Rao RV, Peel A, Logvinova A, Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Let* 2002, 514: 122-128.
28. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 2003, 278: 20915-20924.
29. Singh AK, Manns MP, Seidler U. Cytoprotective effects of acidosis via heat shock protein HSP27 against the anticancer drug doxorubicin. *Cell Mol Life Sci* 2011, 68: 1041-1051.

30. Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, Riemann A, Gekle M, Thews O. Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *Int J Cancer* 2008, 123: 2532–2542.
31. Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G, Gekle M. Impact of Extracellular Acidity on the Activity of P-glycoprotein and the Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs. *Neoplasia* 2006, 8: 143-152.
32. Chatterjee S, Hirota H, Belfi CA, Berger SJ, Berger NA. Hypersensitivity to DNA Cross-linking Agents Associated with Up-Regulation of Glucose-regulated Stress Protein GRP78. *Cancer Res* 1997, 57: 5112-5116.
33. Wolosker H, Rocha JB, Engelender S, Panizzutti R, De Miranda J, de Meis L. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoforms: diverse responses to acidosis. *Biochem J* 1997, 321: 545-550.
34. Aoyama K, Burns DM, Suh SW, Garnier P, Matsumori Y, Shiina H, Swanson RA. Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005, 25: 358-370.

35. Kumar S, Kasseckert S, Kostin S, Abdallah Y, Schafer C, Kaminski A, Reusch HA, Piper HM, Steinhoff G, Ladilov Y. Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12. *Cardio Res* 2007, 73: 172-180.
36. Kumar S, Reusch HP, Ladilov Y. Acidic pre-conditioning suppresses apoptosis and increases expression of Bcl-xL in coronary endothelial cells under simulated ischaemia. *J Cell Mol Med* 2008, 12: 1584-1592.
37. Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 292: H19–H27.

CONCLUSÕES

1. O pH ácido induz a UPR em células endoteliais humanas, sendo que a exposição ao pH 6.4 aumenta a expressão simultânea de diferentes marcadores de UPR, enquanto que o pH 7.0 ativa uma UPR adaptativa com aumento seletivo da expressão de GRP78;
2. O estresse crônico da exposição ao pH 7.0 durante sete dias aumenta a sobrevivência das células endoteliais ao tratamento com Etoposide, Adriamicina e Sunitinib;
3. A diminuição da expressão de GRP78 por meio de ShRNA é capaz de reverter o fenótipo de resistência ao tratamento com Etoposide, Adriamicina e Sunitinib;
4. Células endoteliais da microvasculatura de carcinomas espinocelulares bucais apresentam maior expressão de marcadores de UPR: GRP78, ATF4 e CHOP, quando comparadas a células endoteliais controles.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular bucal é responsável por aproximadamente 90% das lesões malignas que afetam a cavidade bucal, orofaringe, hipofaringe e laringe e representa o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo com uma estimativa de 650000 novos casos e 350000 mortes a cada ano. Apesar dos avanços em nossa compreensão na prevenção e tratamento do câncer de boca, o tratamento cirúrgico agressivo permanece como a abordagem predominante de tratamento dos pacientes, mesmo com a doença em fase inicial. Os pacientes que sofrem de carcinoma espinocelular bucal enfrentam uma taxa de sobrevida que se mantém inalterada há décadas, indicando que a nossa capacidade de tratá-los atingiu um platô (Parkin et al., 2002).

Apesar de a pesquisa em câncer ter avançado consideravelmente, o tratamento ainda baseia-se principalmente na atividade proliferativa das células tumorais. No entanto, o câncer, atualmente, é considerado mais do que massas de células cancerosas que proliferam. Em vez disso, as neoplasias são organizações complexas compostas por vários tipos de células diferentes que interagem umas com as outras. A biologia dos tumores já não pode ser entendida simplesmente enumerando as características das células cancerosas, mas deve abranger as contribuições do microambiente tumoral à tumorigênese (Hanahan, Weinberg, 2011).

As células endoteliais contribuem de forma importante para a biologia de muitos tumores e dessa forma, a sinalização que controla suas funções individuais e coletivas

deve ser compreendida. A angiogênese tumoral é o processo através do qual as células neoplásicas estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para seu metabolismo. É um evento limitante durante a carcinogênese e fundamental para a progressão tumoral (Hanahan, Folkman, 1996). Na última década testemunhou-se um aumento impressionante de pesquisas na área de angiogênese. A possibilidade de inibir esse processo e dessa forma controlar o crescimento tumoral é uma alternativa terapêutica promissora na luta contra o câncer.

Muita pesquisa sobre o assunto resultou na elaboração de inibidores de angiogênese e diversos ensaios clínicos estão em andamento. Infelizmente, apesar de resultados significativos nos estudos experimentais, os resultados clínicos não são os esperados. Além de não produzirem uma resposta clínica duradoura, em muitos casos nenhum benefício é observado durante o tratamento (Berger, Hanahan, 2008; Pàez-Ribes et al., 2009).

Surpreendentemente, essas evidências demonstram que a terapia antiangiogênica também é passível de desenvolver resistência. Quando o pesquisador Judah Folkman (1933-2008) criou a hipótese da terapia antiangiogênica, de forma visionária, um dos fatores mais atraentes desta nova terapia era o fato de que o alvo, as células endoteliais dos vasos neoformados, eram “normais” e assim, o desenvolvimento de resistência seria improvável, em comparação aos tratamentos que visam às células tumorais, cuja instabilidade genética, resulta quase que inevitavelmente em resistência à terapia.

As linhas de pesquisa estão revelando fenótipos e perfis de expressão gênica distintos nas células endoteliais encontradas em tumores e, assim hoje se distinguem as células endoteliais normais (CEN) das células endoteliais associadas a tumores (CET). As CETs apresentam maior resistência à apoptose e ao tratamento com diferentes drogas em comparação às CENs (Xiong et al., 2009). Fica claro que existe uma maior resistência intrínseca às CETs, no entanto, os motivos para tal acontecimento ainda são incertos (Dudley, Klagsbrun, 2009).

Acreditamos que essas diferenças são adquiridas durante a adaptação das células endoteliais ao estressante microambiente criado pelo crescimento tumoral. Assim, pode-se especular que a diferença dos resultados promissores de estudos *in vitro* com os inibidores de angiogênese para os resultados pouco expressivos *in vivo* pode ocorrer porque os estudos *in vitro* utilizam células endoteliais originadas de tecidos normais e em condições de cultivo regulares que mimetizam tecidos saudáveis. Conclui-se que é importante estudar as células endoteliais no contexto do seu tecido de origem. Este estudo ilustra os efeitos do estresse ácido na biologia das células endoteliais. Dessa forma, o pH é um importante fator a ser levado em consideração durante estudos no campo da angiogênese tumoral.

O pH ácido do meio extracelular de tumores é diretamente relacionado à agressividade tumoral, impulsionando a atividade de enzimas proteolíticas extracelulares, regulando a expressão de fatores angiogênicos, aumentando a incidência de metástases e protegendo as células tumorais da resposta imune (McCarty, Whitaker, 2010). A partir desse estudo, além dos efeitos diretos nas células malignas, o pH ácido

tumoral, também interfere na resistência à morte celular das células endoteliais, reforçando a importância deste fator na biologia tumoral.

O pH ácido tumoral também pode ser responsável por anormalidades genéticas. Existem relatos isolados de alterações citogenéticas e aberrações cromossômicas em células endoteliais isoladas de tumores malignos. Esse tema é ainda controverso na literatura, sendo muitas vezes reportados como artefatos de cultivo celular (Hida, Klagsbrun, 2005). De qualquer forma, um possível mecanismo que poderia contribuir para esse fenômeno é a exposição à acidez, que pode ter efeitos mutagênicos por promover o descontrole dos pontos de controle do ciclo celular e inibir mecanismos de reparo do DNA (DeClerck, Elble, 2010). Uma investigação mais aprofundada é necessária para esclarecer este assunto.

Recentemente tem-se considerado que a manipulação do pH de tumores pode ter considerável potencial na terapia anticâncer. Quatro estratégias distintas são consideradas com este fim: terapia alcalinizante para aumentar o pH do ambiente extracelular; a inibição de bombas de prótons diminuindo o pH intracelular das células tumorais, e assim aumentando o pH extracelular; acidificação aguda intracelular que promoveria a morte das células tumorais diretamente; acidificação aguda extracelular que permitiria a ação seletiva de drogas citotóxicas em nanopartículas sensíveis ao pH (McCarty, Whitaker, 2010). Silva et al. (2009) demonstraram que o aumento das concentrações de bicarbonato de sódio no plasma sanguíneo pode elevar o pH tumoral, reduzindo o crescimento e a invasão do tumor sem causar modificações significativas no pH do sangue e dos tecidos normais.

Este trabalho sugere que a manipulação do pH tumoral também pode ser utilizada em conjunto à terapia antiangiogênica a fim de aumentar sua eficácia. De acordo com nosso conhecimento este é o primeiro trabalho a demonstrar os efeitos da alteração de pH no campo de pesquisa da angiogênese. Os efeitos do pH já foram avaliados em células endoteliais coronarianas no estudo da cardiopatia isquêmica. Nesse contexto, estudos mostram que a exposição a um estresse ácido, um dos componentes da isquemia juntamente com hipóxia e a ausência de glicose, diminui a morte celular quando as células endoteliais são posteriormente sujeitas à isquemia prolongada (Flacke et al., 2009). Esse efeito é chamado de pré-condicionante e é extensamente pesquisado na cardiopatia isquêmica assim como em isquemias cerebrais.

Usualmente os estudos sobre o efeito pré-condicionante utilizam curtas exposições a um estresse agudo, e a proteção é observada a um segundo estressor nas horas seguintes. Neste estudo foi realizada uma exposição crônica de forma a mimetizar o microambiente tumoral e a proteção foi observada até 72 horas após o estresse crônico. O termo pré-condicionante é usado em variados contextos, incluindo diferentes tipos de estímulos que são capazes de produzir proteção quando aplicados previamente (farmacológicos, térmicos e elétricos entre outros) e diferentes tipos de proteção, mas é geralmente utilizado com o significado de proteção contra morte celular (Garcia-Dorado et al., 2011). Os mecanismos que desencadeiam essa proteção ainda não foram esclarecidos, sendo um dos fatores atribuídos a ativação da Unfolded Protein Response (Rutkowsky et al., 2006). A consequência da exposição temporária a um evento estressante deve ser o aumento persistente da regulação de proteínas que

facilitam a sobrevivência sem a indução de apoptose, de modo que a célula se torna mais resistente ao estresse subsequente.

No presente estudo a exposição ao estresse ácido resultou no aumento da expressão de GRP78, uma chaperona do retículo endoplasmático com função anti-apoptótica (Lee, 2005). Células endoteliais de carcinomas espinocelulares bucais apresentaram expressão em torno de 300 vezes maior de GRP78 do que nas células endoteliais controles confirmando um potencial terapêutico de atuação. Além de seu papel estabelecido na oncogênese e na resistência à terapia quimioterápica, a UPR surge agora como fator importante na resistência à terapia antiangiogênica.

A importância da UPR na manutenção do fenótipo maligno tem inspirado grande interesse em explorar terapias visando seus componentes. A identificação dos componentes da UPR que são ativados ou suprimidos no câncer e o uso terapêutico sobre moléculas reguladoras da UPR são áreas de pesquisa muito ativas. A acumulação de proteínas não dobradas desencadeia a UPR, que media a inibição da síntese de proteína em geral, mas aumenta a expressão de diversos fatores de transcrição que ativam genes que codificam chaperonas do RE. A maioria das células normais não está ativamente submetida a estresses e as vias da UPR permanecem em um estado inativo. Esta discrepância entre as células tumorais e células normais oferece uma vantagem para os agentes que visam a UPR para alcançar a especificidade no tratamento do câncer (Wang et al., 2011).

O potencial terapêutico da utilização dos componentes da UPR no câncer envolve principalmente duas abordagens: a indução do acúmulo de proteínas mal dobradas no RE para sobrecarregar a UPR e, a inibição da UPR adaptativa e das vias

antiapoptóticas para impedir as células de se adaptarem a condições de estresse, levando à morte celular (Li et al., 2011). A primeira forma de terapia surgiu com o desenvolvimento do Bortezomib (Velcade, PS-341), um derivado de ácido borônico, o primeiro inibidor proteossômico a ser desenvolvido com sucesso para terapia anticâncer. Sua inibição proteossomal provoca uma carga adicional de proteínas não dobradas no RE e indução da apoptose (Obeng et al., 2006).

De acordo com a segunda abordagem, surgem terapias que visam especificamente proteínas envolvidas na sinalização da UPR adaptativa. Observamos elevados níveis de GRP78 tanto nas células endoteliais quanto nas células tumorais de carcinomas espinocelulares bucais, proteína também comumente aumentada em diversos tumores sólidos e linhagens de tumorais (Lee, 2007). O Versipelostatin (VST) é um novo composto inibidor de GRP78, que mostrou resultado promissor no tratamento em linhagens tumorais (Park et al., 2004). O tratamento *in vitro* de células de linhagem de glioma com outro inibidor de GRP78, a epigalocatequina galato (EGCG), sensibiliza as células à quimioterapia com o agente temozolomida (Pyrko et al., 2007). Da mesma forma, propomos que a inibição terapêutica de GRP78 pode atuar de maneira adjunta à terapia antiangiogênica de forma a aumentar a sensibilidade das células endotélias à terapia.

A UPR promove a capacidade das células de se adaptarem e sobreviverem ao microambiente hostil do tumor através da ativação de vias de resposta ao estresse e aumento da expressão de chaperonas. Utilizando a UPR como alvo representa uma nova abordagem de terapia anti-angiogênica. Uma maior compreensão dessas vias deve fornecer oportunidades terapêuticas adicionais.

A Unfolded Protein Response é estruturada de forma a induzir tanto a adaptação ao estresse quanto a morte celular, de acordo com a intensidade do estresse. Além do seu envolvimento na patogênese do câncer a UPR está envolvida com outras condições patológicas como doenças neurodegenerativas e diabetes (Szegezdi et al., 2006). Dessa forma, entender como a UPR permite a adaptação, em vez de apoptose, é necessário, pois medidas poderiam ser desenvolvidas de forma a manipular tais condições, por exemplo, favorecendo a morte celular em vez da adaptação no câncer, e o oposto na diabetes e doenças neurodegenerativas. Nossos resultados sugerem que a GRP78 é uma proteína-chave nesse contexto, diretamente envolvida com a adaptação e resistência à morte celular. Sua inibição pode ter importância na ampliação do arsenal terapêutico para o câncer bucal. Contribuindo, quem sabe, para o aumento dos percentuais de sobrevivência dos pacientes acometidos por esta enfermidade ou também auxiliando para a melhoria de sua qualidade de vida.

Referências

Bergers G, Hanahan D. **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** Nat Rev Cancer, v.8, p. 592–603, 2008.

DeClerck K, Elble RC. **The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy.** Front Biosci, v.15, p.213-25, 2010.

Dudley AC, Klagsbrun M. **Tumor Endothelial Cells Join the Resistance.** Clin Cancer Res, v. 15, p. 4787-4789, 2009.

Flacke J, Kumar S, Kostin S, Reusch HP, Ladilov Y. **Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression.** Apoptosis, v. 14, p. 90–96, 2009.

Garcia-Dorado D, Barba I, Inseste J. **Twenty-five years of preconditioning: are we ready for ischaemia? From coronary occlusion to systems biology and back.** Cardio Res, v. 91, p. 378-381, 2011.

Hanahan D, Folkman J. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** Cell, v. 86, p. 353–364, 1996.

Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** Cell, v. 144, p. 646-674, 2011.

Hida K, Klagsbrun M. **A New Perspective on Tumor Endothelial Cells: Unexpected Chromosome and Centrosome Abnormalities.** Cancer Res, v. 65, p. 2507-2510, 2005.

Lee AS. **The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress.** Methods, v. 35, p. 373–381, 2005.

Li X, Zhang K, Zihai L. **Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective.** J Hematol Oncol, v. 4, p. 1-10, 2011.

McCarty MF, Whitaker J. **Manipulating Tumor Acidification as a Cancer Treatment Strategy.** Altern Med Rev, v.15, p.264-272, 2010.

Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ Jr, Lee KP, Boise LH.

Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. Blood, v. 107, p. 4907-4916, 2006.

Paèz-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinàls F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. **Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression**

of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. Cancer Cell, v. 15, p. 220–231, 2009.

Park HRTA, Sato S, Tsukumo Y, Yun J, Yamori T, Hayakawa Y, Tsuruo T, Shinya K: **Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation.** J Natl Cancer Inst, v. 96, p.1300-1310, 2004.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Global cancer statistics, 2002.** CA Cancer J Clin, v.55, p.74-108, 2002.

Pyrko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS: **The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas.** Cancer Res, v.67, p.9809-9816, 2007.

Rutkowski DT, Arnold SM, MillerCN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Akha AAS, Raden D, Kaufman RJ. **Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins.** PLOS Biology, v. 4, p.2024-2041, 2006.

Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Gatenby RA. **The Potential Role of Systemic Buffers in Reducing Intratumoral Extracellular pH and Acid-Mediated Invasion.** Cancer Res, v. 69, p. 2677–2684, 2009.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. **Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.** EMBO reports, v.7, p.880-885, 2006.

Xiong Y, Sun H, Zhang W, Zhu X, Zhuang P, Zhang J, Wang L, Wu W, Qin L, Tang Z. **Human Hepatocellular Carcinoma Tumor-derived Endothelial Cells Manifest Increased Angiogenesis Capability and Drug Resistance Compared with Normal Endothelial Cells.** Clin Cancer Res, v.15, p. 4838-4846, 2009.

Wang G, Yang Z, Zhang K. **Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential.** Am J Transl Res, v.2, p. 65-74, 2010.