

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

BIANCA DE BEM PRUNES

ANÁLISE DA ATIVIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS DE LINHAGEM DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA EM UM MICROAMBIENTE ÁCIDO

Porto Alegre

2016

BIANCA DE BEM PRUNES

ANÁLISE DA ATIVIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS DE LINHAGEM DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA EM UM MICROAMBIENTE ÁCIDO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

de Bem Prunes, Bianca
ANÁLISE DA ATIVIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS DE
LINHAGEM DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA EM UM
MICROAMBIENTE ÁCIDO / Bianca de Bem Prunes. -- 2016.
34 f.

Orientador: Fernanda Visioli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2016.

1. Câncer bucal. 2. Acidez tumoral. 3. Invasão
tumoral. 4. Migração. 5. Metástases. I. Visioli,
Fernanda, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, mentora e amiga, Prof. Dra. Fernanda Visioli, por todas as horas dedicadas ao meu aprendizado, pelos ensinamentos transmitidos com paciência e infindável generosidade. Pela brilhante orientação, apoio e confiança na elaboração deste trabalho.

À doutoranda e grande amiga, Viviane Palmeira, por toda a dedicação, apoio e ensinamentos. Mas, sobretudo, pelo amor e carinho maternos, que dela recebi ao longo deste processo.

Aos meus pais, Bernadete e Nilo, pelo amor incondicional e por sempre me apoiarem em cada passo que dei em minha vida até agora, desde os primeiros. Por permitirem que me construísse como mulher e seguisse em frente, sempre.

Às minhas grandes amigas Paola Wink, Giulia Góes, Eleonora Loner, Laura Kleinpaul, Ana Júlia Fortes e Laura Remus pela constante acolhida. Por me darem amor, energia e força para transpor os tempos difíceis. Sem vocês, eu nada seria.

Ao meu companheiro, Richard, que, nos últimos oito anos em que estivemos lado a lado, tem sido meu grande amor e meu grande amigo. Pela companhia valiosa naqueles dias escaldantes em Janeiro de 2012, o vestibular; pelo imenso carinho e dedicação ao nosso amor. Muitíssimo obrigada.

Aos colegas, amigos, funcionários e professores da FO/UFRGS, pela ajuda técnica e emocional, em todos os momentos vividos durante os anos de iniciação científica e graduação.

À todos, muito obrigada.

RESUMO

PRUNES, Bianca de Bem. **Análise da atividade migratória das células de linhagem de carcinoma espinocelular de boca em um microambiente ácido.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Ampliar nosso conhecimento sobre as contribuições do microambiente tumoral à carcinogênese é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O microambiente tumoral é caracterizado por baixos níveis de oxigênio, diminuição dos nutrientes disponíveis e um pH tecidual ácido. Já foi demonstrado que o pH extracelular de tumores malignos bucais é ácido e esta acidez tumoral está relacionada à maior incidência de metástases. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a capacidade de migração de células de carcinoma espinocelular bucal expostas a um microambiente ácido. Foram comparadas células de linhagens de carcinoma espinocelular bucal (SCC-4) expostas ao meio de cultura ácido (pH 6,8) com células mantidas em um pH normal (7,4). A capacidade de migração após exposição ao meio de cultura ácido foi avaliada por ensaio de cicatrização de ferida e por análises temporais em vídeos de time lapse. Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados por um único observador cego. Os resultados apresentaram distribuição paramétrica e foram analisados pelo teste ANOVA. O percentual de fechamento da área da ferida nas células expostas ao meio acidificado por até 14 dias foi maior ($p=0,0211$) quando em comparação com as células mantidas em meio neutro. No ensaio de time lapse, observamos maior velocidade média ($p=0,0023$) e maior média de distância ($p=0,0025$) percorrida pelas células mantidas em pH 6,8. Conclui-se que a exposição a um microambiente ácido aumenta a capacidade de migração de células de linhagens de carcinomas espinocelulares bucais.

Palavras-chave: Câncer bucal. Acidez tumoral. Invasão tumoral. Migração. Metástases.

ABSTRACT

PRUNES, Bianca de Bem. **Migratory behavioral analysis of oral squamous carcinoma cell line in an acidic microenvironment.** 2016. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Expand our knowledge regarding the contributions of the tumor microenvironment to carcinogenesis is crucial for the development of new therapeutic strategies. The tumor microenvironment is characterized by low oxygen levels, reduced nutrient availability and an acidic tissue pH. It has been demonstrated that the extracellular pH of oral malignant tumor is acidic and this acidity is related to higher incidence of metastases. Therefore, the aim of this study is to evaluate the migration ability of oral squamous cell carcinoma cells exposed to an acidic microenvironment. OSCC cell lines (SCC-4) exposed to acid culture medium (pH 6.8) were compared with cells maintained at a normal pH (7.4). The migratory behavior after exposure to the acid culture medium was evaluated by the wound healing assay and by time lapse analysis on videos. All the assays were performed in triplicate by a single blinded observer. The results showed parametric distribution and were analyzed by ANOVA test. The area of the wound closure percentage for cells exposed to the acidified medium for up to 14 days was greater ($p= 0.0211$) when compared to cells maintained in the neutral pH. In the time lapse assay, we observed higher average velocity ($p= 0.0023$) and increased mean distance ($p= 0.0025$) covered by cells maintained at pH 6.8. We conclude that the exposure to an acidic microenvironment enhances cell migration ability of oral squamous cell carcinoma line (SCC-4).

Key-words: Oral cancer. Tumor acidity. Tumor invasion. Metastasis.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	08
1.1	INVASÃO TUMORAL E METÁSTASE.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
5	REFERÊNCIAS.....	32

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Considerado um problema de saúde pública importante, o câncer é uma das principais causas de morte da população mundial e estima-se que suas taxas de incidência cresceram em 20% na última década e projeta-se o diagnóstico de mais de 27 milhões de novos casos no mundo até o ano de 2030 (WARNAKULARUSUYA et al., 2010; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). De acordo com os últimos dados do Instituto Nacional do Câncer, no Brasil surgirão 596 mil novos casos de câncer no ano de 2016 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O termo 'câncer de boca' está relacionado às neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal. Nesse contexto, o carcinoma espinocelular ou epidermóide de boca é a neoplasia maligna da cavidade bucal mais prevalente, representando cerca de 95% do total das malignidades que atingem esta localização. Por esse motivo, muitos autores mencionam o termo 'câncer de boca' quando se referem ao carcinoma espinocelular (NEVILLE et al., 2009; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O carcinoma espinocelular bucal está entre os tipos mais comuns de neoplasias malignas que atingem a população brasileira ocupando o quinto lugar em prevalência em homens. Acredita-se que em 2016 surgirão no Brasil 11.140 novos casos da doença em homens e 4.350 em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). Apesar dos grandes esforços e dos avanços em pesquisa nessa área, o tratamento quimioterápico é coadjuvante e ainda baseia-se principalmente na atividade proliferativa das células tumorais. A remoção cirúrgica agressiva, por vezes mutiladora, permanece como abordagem predominante no tratamento dos pacientes portadores dessa neoplasia, mesmo com a doença em estágios iniciais (SCIUBBA, 2001).

O uso de agentes quimioterápicos no tratamento do carcinoma espinocelular bucal resulta em uma redução temporária e pouco significativa do tamanho da massa tumoral. No entanto, na grande maioria dos casos, o tumor volta a crescer e se torna

resistente à droga previamente administrada. Dessa forma, sabe-se que, atualmente, a quimioterapia não melhora significativamente as taxas de sobrevivência (FURNESS et al., 2011). Além disso, dados recentes da literatura têm demonstrado taxas de sobrevivência destes pacientes em 5 anos variando entre 46 e 54%, e mantendo-se inalteradas há décadas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016; PEIXOTO et al., 2011).

Levando em consideração as características da doença e buscando diminuir suas elevadas taxas de mortalidade, um grande número de pesquisas científicas tenta encontrar soluções mais eficazes para o seu tratamento. No entanto, a concretização de tal desfecho ainda se mantém um desafio e acredita-se que isso se deva à grande complexidade e dinamicidade do processo de carcinogênese, o qual ainda exige muitos estudos para que se alcance a sua total compreensão (SMALLBONE et al., 2005; HANNAH; WEINBERG, 2011).

Este processo pode ser melhor compreendido quando consideramos o tumor não estritamente como um conjunto de células geneticamente modificadas e com taxas proliferativas alteradas, mas, sim, a partir da ideia de que existe um microambiente tumoral. Nesta concepção, o tumor é parte de um ambiente no qual ocorrem interações entre as células cancerosas e o estroma que o envolve: os fibroblastos, as células endoteliais e as células do sistema imune, bem como um conjunto de alterações metabólicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; GILLIES et al., 2002; ONUCHIC et al., 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; ADJEI; BLANKA, 2015). Através da interação com as células tumorais, o componente estromal ajuda a promover o crescimento e progressão do tumor (EREZ et al., 2010; ADJEI; BLANKA, 2015).

Estudos anteriores apontam que uma característica marcante do microambiente tumoral é a acidificação do meio extracelular, cujo pH pode atingir valores significativamente baixos (BRIZEL et al., 2001; GILLIES et al., 2002; SMALLBONE et al., 2005; MOELLERING et al., 2008; SILVA et al., 2009; FANG; GILLIES; GATEMBY, 2008; ZHANG et al., 2010; HJELMELAND et al., 2010; KATO et al., 2013; ZHOU et al., 2015). Segundo Becelli et al. (2007), o pH extracelular de uma amostra de tumores malignos da cavidade bucal variava entre 6,56 e 6,97, enquanto que o pH tecidual normal situa-se entre de 7,4-7,5.

Nesse contexto, é importante compreender como ocorre essa acidificação do microambiente tumoral. Inicialmente, as células tumorais utilizam a glicólise e a via da fermentação láctica para obtenção de energia, como mecanismo de adaptação frente ao quadro de hipóxia, o qual se estabelece porque a neoformação vascular não acompanha a intensa proliferação das células cancerígenas. O prejuízo dessa inversão de fases é que ao invés da célula produzir 30 moléculas de ATP como produto final do ciclo, ela passa secretar ácido láctico e produzir apenas 2 moléculas de ATP, resultando assim num microambiente tumoral ácido (JUSTUS et al., 2013; SMALLBONE et al., 2005).

Sabe-se que o mecanismo de produção de energia ocupa uma posição central no metabolismo das células, plantas e microorganismos. Tal processo é liderado pela quebra da molécula de glicose (glicólise), cujo produto final são duas moléculas de piruvato. Essas moléculas de piruvato podem ter três destinos diferentes, os quais são: ciclo de Krebs, cujo produto secretado é essencial para iniciar a fase da fosforilação oxidativa e gerar energia para uma célula eucarionte em condições aeróbicas, nesse processo o produto final é em torno de 30 a 32 moléculas de ATP; fermentação alcoólica, uma via utilizada para produzir energia em ambiente anaeróbico que tem como produto final o etanol; e a fermentação láctica que também é uma via é utilizada em ambientes anaeróbicos, secreta o ácido láctico e produz apenas duas moléculas de ATP na sua fase final (JUSTUS; DONG; YANG, 2013; GATENBY; GILLIES, 2004; GILLIES; GATENBY, 2007).

Desta maneira, uma célula cancerígena em situação de hipóxia gera a sua energia através da fermentação láctica, o que resulta em pouca quantidade de energia a cada ciclo. No entanto, para sobreviver, tais células passam a captar cerca de 10 vezes mais glicose do que uma célula normal. Logo, pode-se afirmar que células tumorais resistem a ambientes anaeróbicos porque captam uma maior quantidade de glicose para conseguir produzir a energia necessária para sua sobrevivência, conseqüentemente, secretam maior quantidade de ácido no meio extracelular (JUSTUS; DONG; YANG, 2013; GATENBY; GILLIES, 2004; GILLIES; GATENBY, 2007).

Apesar de a hipóxia contribuir para a acidificação tumoral, isso nem sempre está presente em tumores agressivos, este fenômeno foi primeiramente descrito por “Otto Warburg” em 1930. O efeito Warburg, que identificou a presença de glicólise e fermentação láctica mesmo em situações de normóxia em tumores, indica que a acidificação tumoral pode acontecer independentemente da hipóxia. Portanto, a acidificação pode ser uma característica intrínseca do metabolismo tumoral, que provavelmente oferece uma vantagem competitiva sobre as células (GILLIES et al., 2002).

Estudos apontam que a acidificação do microambiente do tumor pode ser um fator fundamental na regulação biológica e molecular do câncer (HJELMELAND et al., 2010). A exposição crônica do tumor à acidez pode agir como um fator estressor e seletivo para as células tumorais, causando efeitos significativos na sua progressão. Acredita-se que a exposição prolongada da massa tumoral a um microambiente ácido induza a apoptose das células normais presentes e que as células tumorais, mais indiferenciadas, criem resistência e se adaptem a esse novo meio (SMALLBONE et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

As células tumorais que resistem à acidose criam um ambiente tóxico para a população de células originais do órgão afetado e, ao mesmo tempo, um ambiente inofensivo para si mesmas. As células cancerosas passam a expressar diversos transportadores de membrana para manter seu pH intracelular neutro, expulsando íons de hidrogênio e lactato, por consequência, acidificando o meio extracelular (Figura 1) (MOELLERING et al., 2008; BARAR; OMID, 2013). O resultado deste processo é uma seleção das células mais resistentes, com potencial mais agressivo e invasivo.

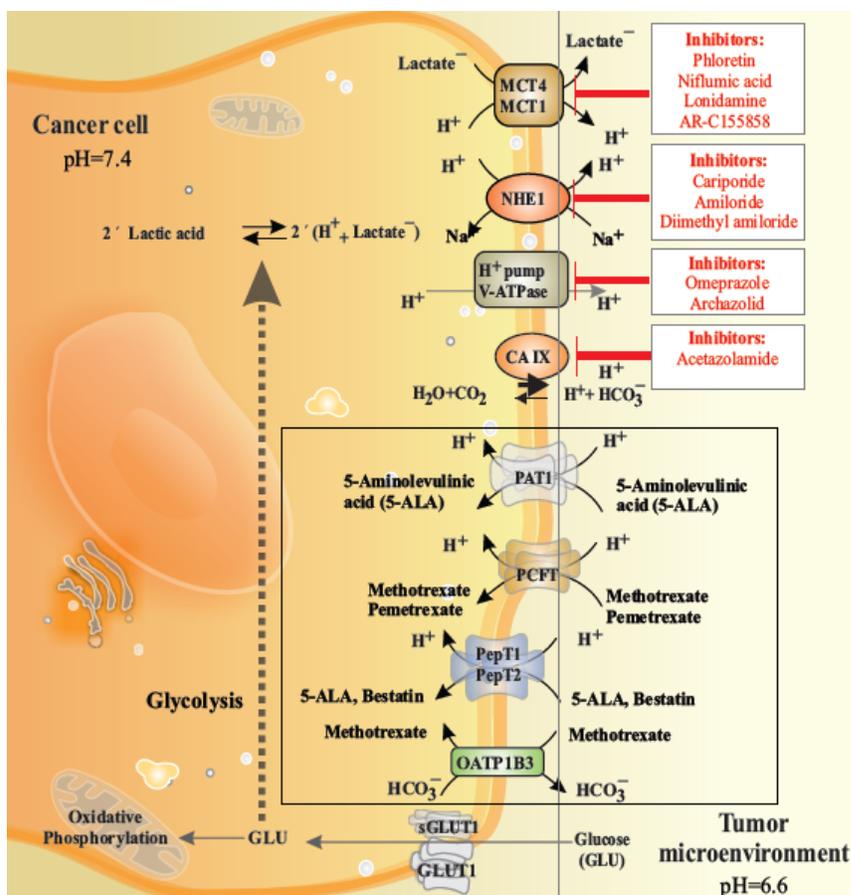


Figura 1. Representação dos reguladores-chave do pH e os principais mecanismos de transporte envolvidos na condução de quimioterápicos em tumores sólidos. O transporte da glicose é feito, principalmente, por um transportador de glicose (GLUT1) e metabolizado através do mecanismo de glicólise na produção de ácido láctico (AL) e acidificando o citoplasma. O AL é colocado para fora da célula por meio de transportadores, tais como: $\text{Na}^+ / \text{H}^+ + 1$ (NHE1); transportadores monocarboxilato (MCT 1 e 4); Anidrase carbônica IX (IX CA); e H^+ V-ATPase bomba. Estas maquinarias de transporte poderiam ser inativadas com inibidores específicos (caixas vermelhas). As células cancerosas mantêm o pH intra e extracelular em 7.4 e 6.6, respectivamente. Transporte de alguns quimioterápicos são realizados por transportadores de superfície celular (inseridos na caixa preta). Adaptado de Barar & Omid, Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy. *BiolImpacts*, 2013, 3(4), 149-162.

Devido à importância da acidificação do microambiente, diferentes modalidades terapêuticas estão sendo consideradas para manipular o pH tumoral: 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; entre outras (Figura 1) (ROBEY et al., 2009; MCCARTY; WHITAKER, 2010). Modelos de estudos experimentais *in vivo*, nos quais são testadas terapias para aumentar o pH do ambiente tumoral, têm demonstrado resultados significativos (ROBEY et al., 2009; SHERIDAN et al., 2006; SILVA et al., 2009). Robey et al. (2009) verificaram que, em camundongos, o tratamento de tumores de mama com intuito de aumentar o pH tecidual com bicarbonato de sódio esteve associado com a redução da invasão, ratificando a possibilidade terapêutica da manipulação do pH.

A partir desses dados, diversos estudos estão sendo realizados com o propósito de melhor compreender o comportamento das células tumorais no microambiente ácido em diferentes tipos de tumores e em relação a diferentes aspectos que serão explanados a seguir.

1.1 INVASÃO TUMORAL E METÁSTASE

O mecanismo de invasão no processo de carcinogênese envolve diversos mecanismos celulares interligados entre si que ainda não foram bem elucidados na literatura (MOLLERING, 2008). Já é sabido que proteínas que estão envolvidas no processo de remodelação do tecido, as metaloproteinases (MMPs), têm um papel crucial na invasão de células cancerígenas. Acredita-se que o microambiente ácido também possa interferir nos processos de degradação de matriz extracelular e de invasão, a partir da ativação dessas enzimas proteolíticas. Quando expostas a um ambiente ácido, a expressão das MMPs aumenta, assim como a expressão das enzimas ativadoras de plasminogênio (catepsinas e uroquinase), sendo estas últimas as responsáveis, junto com outros receptores específicos, por secretar as MMPs. Considerando o papel importante das MMPs na invasão do tumoral, conclui-se que a acidez do microambiente pode levar a uma maior taxa de invasão celular e,

consequentemente, a um maior risco de metástase (SOUNNNI; NOEL, 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Mollering et al. (2008) verificaram que a exposição de linhagens de células cancerígenas à um meio ácido pode alterar o fenótipo celular e aumentar o potencial invasivo, quando recondicionadas ao pH normal. Para tal análise, os autores cultivaram linhagens de melanomas expostas a um baixo pH (6,7) durante 1, 2 e 3 meses, após cada mês recondicionando ao pH neutro. Quando comparado às células cultivadas em pH neutro (7,4), os resultados desse estudo demonstraram que houve um forte aumento do potencial de invasão dessas células, principalmente no tempo de exposição de 2 e 3 meses.

Alguns estudos mostraram claramente que o baixo pH resulta diretamente em maior comportamento invasivo por parte das células tumorais (ROZHIN et al., 1994; MARTINEZ-ZAGUILAN et al., 1996; ROCHEFORT et al., 2000; ROFSTAD; DANIELSEN, 1999; SMALLBONE, 2005; ESTRELA et al., 2013) e, consequentemente, maiores taxas de metástase (SCHLAPPACK; ZIMMERMANN; HILL, 1991; BENNETT et al., 1994).

2 OBJETIVOS

Avaliar, *in vitro*, a capacidade migratória de células de linhagem de carcinoma espinocelular de boca (SCC-4), expostas a um microambiente ácido.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de migração coletiva das células de linhagens de carcinoma espinocelular de boca expostas a um microambiente ácido pelo ensaio de cicatrização de feridas.
- Avaliar a capacidade de migração individual das células de linhagens de carcinoma espinocelular de boca expostas a um microambiente ácido pelo ensaio de time lapse.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Migratory behavioural analysis of oral squamous carcinoma cell line in an acidic microenvironment

ABSTRACT

Background: Expand our knowledge regarding the contributions of the tumor microenvironment to carcinogenesis is crucial for the development of new therapeutic strategies. The tumor microenvironment is characterized by low oxygen levels, reduced nutrient availability and acid tissue pH. It has been demonstrated that the extracellular pH of oral malignant tumor is acidic and this acidity is related to higher incidence of metastases. Therefore, the aim of this study is to evaluate the migration ability of oral squamous cell carcinoma cells exposed to an acid microenvironment.

Materials and Methods: Oral squamous cell carcinoma cell line (SCC-4) exposed to acid culture medium (pH 6.8) were compared with cells maintained at a normal pH (7.4). The migratory behavior after exposure to the acid culture medium was evaluated for wound healing assay and by time lapse analysis on videos. All the assays were performed in triplicate by a single blinded observer. The results showed parametric distribution and were analyzed by ANOVA test.

Results: The area of the wound closure percentage of cells exposed to the acidified medium for up to 14 days was greater ($p= 0.0211$) when compared to cells maintained in the neutral range. In the time lapse assay, we observe higher average velocity ($p= 0.0023$) and increased mean distance ($p= 0.0025$) covered by cells maintained at pH 6.8.

Conclusions: We conclude that the exposure to an acidic microenvironment enhances cell migration ability of oral squamous cell carcinoma line.

Keywords: Oral cancer. Tumor acidity. Tumor invasion. Metastasis

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é quinto tipo mais comum de tumor que acomete os homens brasileiros e que ele se caracteriza pelas suas altas taxas de mortalidade e baixas taxas de sobrevivência. Além disso, grande parte dessas lesões são diagnosticadas tardiamente, já em estados avançados e com grandes chances de já existirem metástases regionais ou à distância, influenciando diretamente o prognóstico da doença. Apesar do grande número de pesquisas na área, os dados relacionados à essa doença seguem inalterados ao longo do tempo e isso se deve à grande complexidade e dinamicidade do processo de carcinogênese (SCIUBBA, 2001; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Levando em consideração essa alta complexidade do processo de formação do tumor, atualmente o câncer passou a ser compreendido não mais como um simples conjunto de células alteradas e com alta taxa proliferativa, mas, sim, a partir da idéia da existência de um microambiente tumoral no qual ocorrem diversas interações celulares e alterações metabólicas (SMALLBONE et al., 2005; HANNAH; WEINBERG, 2011;). Além disso, sabe-se que baixos níveis de oxigênio, privação de nutrientes e pH ácido são características comuns do microambiente de diversos tipos de tumores. Os tumores da cavidade oral apresentam um pH extracelular que pode variar entre 6.5 e 6.9 o que vem sendo associando, na literatura, a uma maior incidência de metástases em pacientes e também a um comportamento mais agressivo e invasivo por parte das células tumorais (SCIUBBA, 2001; HANNAH; WEINBERG, 2011).

A acidificação tecidual nos tumores sólidos ocorre devido a um aumento na ocorrência de glicólise e fermentação láctica, em um primeiro momento, como adaptação à hipóxia. No entanto, em tumores já bem estabelecidos e com aporte vascular foi descrito o fenômeno chamado de 'glicólise aeróbica'. Foi visto que, mesmo na presença de oxigênio, as células malignas optam pela via da fermentação láctica, sugerindo que a acidificação confere vantagens adaptativas a essas células (PEPPICELLI et al., 2015; HUANG et al., 2014). Estudos demonstram que essa acidificação do meio esteja relacionada à maior incidência de metástases (RADISKY, 2005; CHATURVEDI et al., 2011).

Levando em consideração esse panorama, o objetivo desse estudo foi avaliar alterações na capacidade de migração de células de linhagem de carcinoma espinocelular de boca quando expostas a um microambiente ácido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo Celular

Foi utilizada a linhagem de células tumorais de carcinoma espinocelular de boca de língua, SCC-4 (Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ). As células foram cultivada em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina e mantidas em ambiente úmido a 37°C e a 5% de CO₂.

Parte das células foi mantida exclusivamente em meio de cultura com pH neutro (pH 7,4) e outra parte foi exposta a um meio de cultura acidificado (pH 6,8) com ácido clorídrico 1M durante 7, 14, ou 21 dias (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e posteriormente foram reacondicionadas em meio de cultura com pH neutro (pH 7,4) previamente à execução dos experimentos. O pH foi mensurado com pHmetro, nas mesmas condições de cultura. Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Biostar, American Optical) e o meio de cultura substituído a cada 2 ou 3 dias ou quando necessário, após a observação de mudanças no metabolismo celular.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados por um único avaliador cego.

Ensaio de cicatrização de ferida

Também foram realizados, para avaliar a migração das células tumorais, ensaios de cicatrização de ferida nos quais as células foram plaqueadas na concentração de 7×10^5 e, após atingirem confluência, dois riscos formando uma cruz no centro da placa foram produzidos com o auxílio de uma ponteira branca. O meio presente na placa foi então aspirado e as células receberam três lavagens com PBS. O PBS foi aspirado e o

meio de cultivo de pH neutro (pH 7,4) adicionado. Foram realizadas fotografias dos quatro pontos do traço adjacentes à cruz central (ponto de encontro entre os dois traços) em diferentes tempos experimentais (0h, 10h e 24h). Cada fotografia obtida foi analisada e o fechamento da ferida foi mensurado no software ImageJ.

Ensaio de time lapse

O padrão de migração celular foi analisado utilizando-se o ensaio de *time lapse*. Para tanto as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 e, após terem aderido à superfície da placa, a mesma foi preenchida com 8ml de meio de cultivo neutro (pH 7,4) e teve sua tampa vedada com vaselina sólida. Em um microscópio invertido, uma área contendo entre dez e vinte células foi selecionada e o vídeo time lapse foi realizado a partir da obtenção de uma fotografia a cada dez minutos ao longo de um intervalo de vinte horas. O material obtido foi analisado e a movimentação de cada célula na placa foi mapeada no software ImageJ.

Análise Estatística

Após a obtenção dos dados, os mesmos foram avaliados através do programa estatístico SPSS versão 13.0, a fim de se proceder a interpretação e discussão da importância científica deste trabalho. Já que a distribuição dos dados foi paramétrica, foi utilizado o teste ANOVA. O nível de significância considerado foi de $p < 0.05$.

RESULTADOS

A exposição ao microambiente ácido por até 14 dias aumenta a migração coletiva das células da linhagem de carcinoma espinocelular de boca SCC-4 segundo o ensaio de cicatrização de feridas

Para investigar se a exposição das células da linhagem de carcinoma espinocelular de boca (SCC-4) a um microambiente ácido produziria alterações no

comportamento migratório coletivo das mesmas, foi desempenhado o ensaio de cicatrização de feridas para os diferentes grupos experimentais.

Os resultados desse ensaio apontam que aquelas células que foram mantidas em meio de cultura acidificado (pH 6,8) com ácido clorídrico pelos períodos de 7 e 14 dias previamente ao condicionamento em meio de cultura neutro (pH 7,4) apresentaram um maior fechamento intermediário da ferida quando em comparação ao grupo de células mantido exclusivamente em meio de cultura com pH neutro (7,4). No entanto, nota-se que o grupo experimental o qual foi mantido por um período de 21 dias em meio de cultura acidificado (pH 6,8), não apresentou diferença estatisticamente significativa no fechamento intermediário da ferida, quando em comparação com o grupo controle (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1- Ensaio de cicatrização de feridas

Condição experimental (n=3)	Fechamento Intermediário	Fechamento
	10h	24h
	Média (%) ± DP	Média (%) ±DP
pH7.4	67,94(±9,45)a	100 (± 0)
7 dias pH6.8 + 7dias pH7.4	86,68 (±2,461)b	100 (± 0)
14 dias pH6.8 + 7dias pH7.4	84,22 (±4,842)b	100 (± 0)
21 dias pH6.8 + 7dias pH7.4	48,09 (±15,98)a	100 (± 0)
<i>p</i>	0,0211	-

p, ANOVA, post-hoc Tukey.

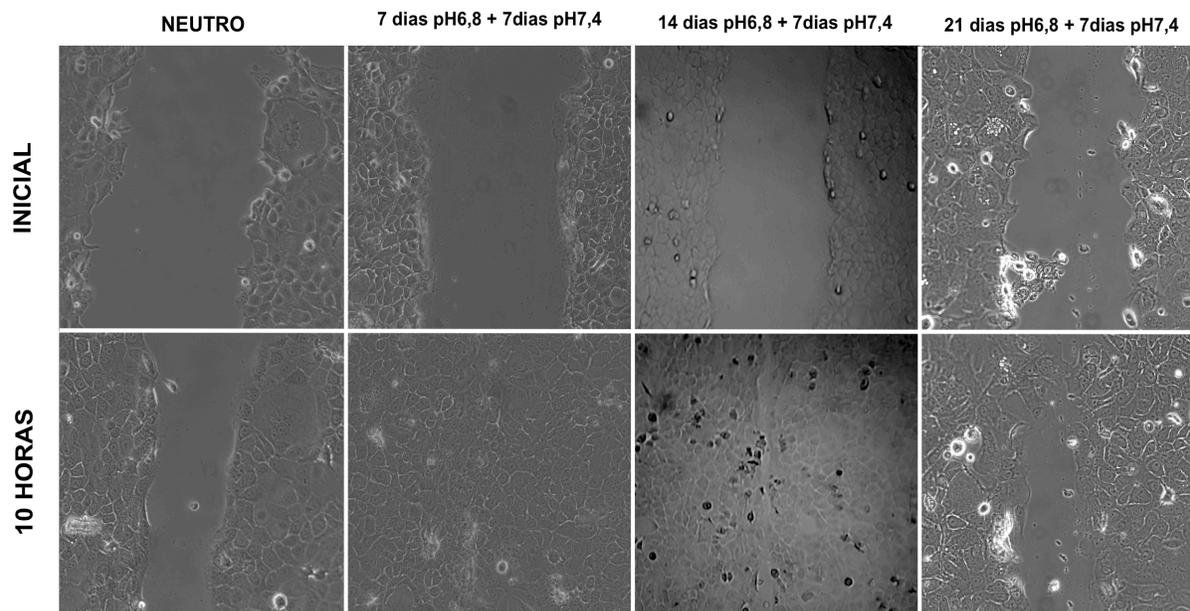


Figura 1. Quadro comparativo entre os diferentes grupos do ensaio de cicatrização de feridas (n=3).

A exposição ao microambiente ácido aumenta a migração individual segundo o ensaio de time lapse

Com o objetivo de avaliar se a exposição das células da linhagem de carcinoma espinocelular de boca (SCC-4) a um microambiente ácido produziria alterações no comportamento migratório individual das mesmas, foi realizada a análise dos vídeos de time lapse para os diferentes grupos experimentais.

Como demonstrado na Tabela 2, os resultados desse ensaio apontaram que as células que foram mantidas em meio de cultura acidificado (pH 6,8) pelos períodos de 14 e 21 dias previamente ao reacondicionamento em meio de cultura neutro (pH 7,4), percorreram uma maior distância média na placa de cultura, quando em comparação com os outros grupos experimentais (Figura 2). Além disso, nota-se que as células mantidas por 7 dias em meio de cultura acidificado (pH 6,8) previamente ao reacondicionamento em meio neutro apresentaram uma maior velocidade média quando em comparação com os outros grupos experimentais (Figura 3).

Tabela 2- Ensaio time lapse

Condição Experimental (n=3)	Distância percorrida Média + DP	Velocidade Micro/h Média + DP
pH7.4	192,6 (± 58,39)a	12,09 (± 3,45)a
7 dias pH6.8 + 7dias pH7.4	237,2 (± 79,19)a,b	16,76 (± 6,32)b
14 dias pH6.8 + 7dias pH7.4	266,5 (± 63,08)b	13,83 (± 2,70)a,b
21 dias pH6.8 + 7dias pH7.4	272,7 (± 48,15)b	16,21 (± 2,99)a,b
<i>p</i>	0,0025	0,0023

p, ANOVA, post-hoc Tukey.

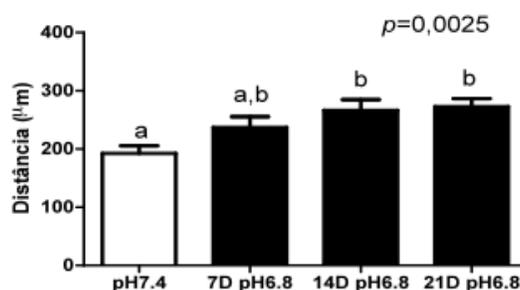


Figura 2. Comparação entre a distância média percorrida pelas células dos diferentes grupos experimentais demonstrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam tratamento em meio ácido por 14 dias (14D pH6.8) e 21 dias (21D pH6.8) e os demais grupos experimentais.

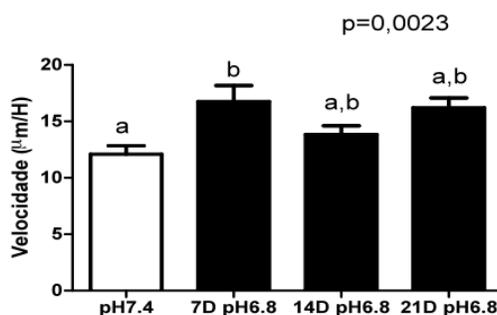


Figura 3. Comparação entre a velocidade média ($\mu\text{m}/\text{h}$) percorrida pelas células dos diferentes grupos experimentais demonstrando aumento estatisticamente significativo da velocidade no grupo que recebeu tratamento em meio ácido por 7 dias (7D pH6.8).

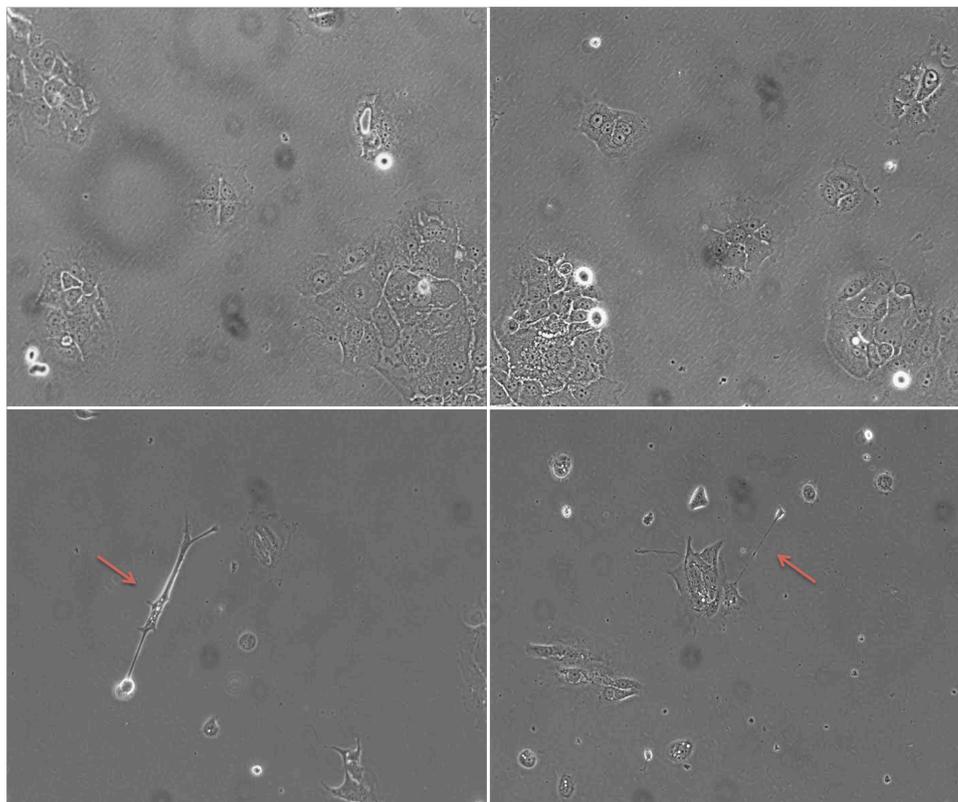


Figura 4. Aspecto morfológico das células expostas ao pH ácido (setas vermelhas) em comparação às células SCC-4 mantidas em pH 7,4.

DISCUSSÃO

Características frequentemente presentes no microambiente de diferentes tipos de tumores sólidos, tais como acidificação do meio extracelular, baixos níveis de oxigênio e privação de nutrientes, estão relacionadas com o comportamento das células cancerígenas (RADISKY, 2005; CHATURVEDI et al., 2011). Nesse contexto, a literatura aponta que a presença de um microambiente tumoral ácido, presente na

maioria dos tumores sólidos, incluindo os tumores da cavidade bucal, está diretamente relacionado a um comportamento mais agressivo e invasivo das células tumorais e, conseqüentemente, à maior incidência de metástases regionais e à distância (BRIZEL et al., 2001; GILLIES et al., 2002; SMALLBONE et al., 2005; MOELLERING et al., 2008; SILVA et al., 2009; FANG; GILLIES; GATEMBY, 2008; ZHANG et al., 2010; BECELLI et al., 2011; HJELMELAND et al., 2010; KATO et al., 2013; ZHOU et al., 2015). Neste sentido, expandir o nosso conhecimento sobre as contribuições do microambiente tumoral ao processo de carcinogênese é um ponto fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Sendo assim, é importante compreender que tipo de alterações no comportamento migratório de células de carcinoma espinocelular bucal ocorrem frente à exposição das mesmas a um microambiente acidificado.

No presente estudo ficou claro que, de uma forma geral, a exposição das células da linhagem de carcinoma espinocelular bucal SCC-4 a um microambiente ácido, foi capaz de alterar o comportamento migratório das mesmas, favorecendo os eventos migratórios tanto de caráter individual, quanto coletivo. Esse achado está de acordo com resultados prévios da literatura para outros tipos de tumores, dentre eles pulmão, pâncreas, melanoma, mama e próstata (SUDHAN; SIEMANN, 2013; SUZUKI et al., 2014; DENG et al., 2015; RIEMANN et al., 2016;).

Já foi demonstrado na literatura que as linhagens celulares tumorais, quando expostas a baixos pHs, apresentam uma elevação em seu potencial migratório, quando em comparação às células mantidas em meio de cultura com pH neutro. Tais achados sugerem que a acidez do microambiente tumoral pode desencadear a exacerbação dos eventos migratórios e, conseqüentemente, influenciar nos processos de invasão e metástase (RIEMANN et al., 2016). No entanto, células consideradas normais, como por exemplo, fibroblastos, células endoteliais e oligodendrócitos, quando expostas à acidose, não respondem ou apresentam redução tanto na velocidade como no raio de migração (JAGIELSKA; WILHITE; VAN VLIET, 2013; RIEMANN et al., 2016).

Na literatura, três hipóteses principais sustentam tais achados: a primeira delas indica que a exposição das células à acidose promoveria eventos relacionados à transição epitélio mesênquima; a segunda hipótese é a de que a o microambiente ácido

ativaria o fator de transcrição NF- κ B a nível intracelular; a terceira hipótese, por fim, aponta que acidez do microambiente tumoral teria efeitos diretos sobre a motilidade celular.

Sabe-se que o processo de invasão tumoral envolve uma complexa sequência de eventos intra e extracelulares, até que adquiram potencial de invasividade, tais como a perda da adesão célula-célula e alterações morfológicas. Essas alterações no fenótipo celular, a partir das quais as células epiteliais adquirem características próprias de células mesenquimais, caracterizam o processo denominado transição epitélio-mesênquima (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HUANG; WU; XU, 2015; PEPPICELLI; BIANCHINI; CALORINI, 2015). Alguns autores observaram que células de melanoma cultivadas em pH ácido apresentaram uma diminuição do marcador epitelial e-caderina e aumento de marcadores mesenquimais n-caderina e vimentina, sugerindo que acidose contribui para o processo de transição epitélio-mesênquima (PEPPICELLI et al., 2014). No presente estudo observamos alterações nas características visuais das células após exposição das mesmas ao meio de cultura acidificado, transicionando de um fenótipo epitelial (cuboidal) para um fenótipo que assemelha-se ao de células mesenquimais (fusiformes com a presença de projeções de membrana) (Figura 4).

Gupta et al., (2014) sugeriram que a exposição de células tumorais a um pH ácido aumentou os níveis de NF- κ B fosforilado (forma ativa) no núcleo celular. Sabe-se que este é um importante fator de transcrição nuclear que vêm sendo correlacionado na literatura ao processo de carcinogênese. A correlação entre NF- κ B e acidez tumoral ainda necessita ser esclarecida; no entanto, alguns estudos sugerem que este fator de transcrição está envolvido nos processos migratório celulares.

A habilidade de migração e invasão das células tumorais envolve diferentes fatores que quando combinados levam à alterações no citoesqueleto celular, facilitando o movimento. Durante os eventos migratórios ocorre uma alcalinização do pH intracelular na porção frontal da célula, chamada de lamelipódio, enquanto que o pH extracelular se torna ácido. O processo inverso ocorre na porção traseira da célula, na qual o pH intracelular torna-se ácido enquanto que o pH extracelular torna-se alcalino. A capacidade de migração e invasão estão relacionadas à superexpressão da metaloenzima anidrase carbônica IX (CA IX) a qual dissocia ácido carbônico em íons

bicarbonato e hidrogênio. O bicarbonato é transportado para o interior da célula, alcalinizando o pH, enquanto que os íons hidrogênio, ao permanecerem no meio extracelular, o tornam ácido (ROFSTAD; DANIELSEN, 1999; STOCK et al., 2008; SVASTOVA; PASTOREKOVA, 2013; SEDLAKOVA, 2014). Já foi demonstrado que a expressão de CA IX está elevada em tumores sólidos com baixa perfusão e pH ácido, o que pode ajudar a explicar porque, no geral, as linhagens celulares de carcinoma, ao serem expostas ao pH ácido, apresentam melhora no seu potencial migratório quando em comparação com células cultivadas em pH neutro (RIEMANN et al., 2014).

Além do mais, o pH tecidual tumoral ácido pode facilitar a degradação da matriz extracelular e conseqüentemente favorecer a invasão tecidual. Células tumorais de próstata e mama, quando expostas a um microambiente ácido, apresentaram um aumento na secreção da enzima proteolítica Catepsina L, a qual, sabe-se, está envolvida nos processos de metástase através da degradação de diversos componentes da matriz extracelular (SUDHAN; SIEMANN, 2013).

CONCLUSÃO

Correlacionando as evidências presentes na literatura com os achados do presente estudo, pode-se concluir que ao serem expostas a um microambiente acidificado, as células da linhagem de carcinoma espinocelular bucal SCC-4, apresentaram alterações comportamento migratório das mesmas, favorecendo os eventos migratórios tanto de caráter individual, quanto coletivo.

REFERÊNCIAS

BECELLI, R. et al. Intracellular and Extracellular Tumor pH Measurement in a Series of Patients With Oral Cancer. **Journal Of Craniofacial Surgery**. v. 18, n. 5, p.1051-1054, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> Acesso em 16/10/2016.

BRIZEL, D. M. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. **International Journal Of Radiation Oncology*biology*physics**, v. 51, n. 2, p.349-353, 2001.

CHATURVEDI, M. M. et al. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene**, v. 30, n. 14, p.1615-1630, 2010.

DENG, S. et al. MiR-652 inhibits acidic microenvironment-induced epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by targeting ZEB1. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p.3966-39675, 2015.

FANG, J. S. et al. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. **Seminars In Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p.330-337, 2008.

GILLIES, R. J. et al. MRI of the tumor microenvironment. **Journal Of Magnetic Resonance Imaging**, v. 16, n. 4, p.430-450, 2002.

GUPTA, S. C. et al. Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF- κ B pathway. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p.12070-12082, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, 2011.

HJELMELAND, A. B. et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. **Cell Death And Differentiation**, v. 18, n. 5, p.829-840, 2010.

HUANG, L.; WU, R.; XU, A. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **Am. J Transl Res**, v. 7, n. 11, p.2141-2158, 2015.

JAGIELSKA, A.; WILHITE, K. D.; VAN VLIET, K. J. Extracellular Acidic pH Inhibits Oligodendrocyte Precursor Viability, Migration, and Differentiation. **Plos One**, v. 8, n. 9, p.1-13, 2013.

KATO, Y. et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p.89-99, 2013.

MOELLERING, R.E. et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, n. 4, p.411-425, 2008.

PEPPICELLI, S. et al. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 31, n. 4, p.423-433, 2014.

PEPPICELLI, S.; BIANCHINI, F.; CALORINI, L. Metabolic reprogramming as a continuous changing behavior of tumor cells. **Tumor Biol.**, v. 36, n. 8, p.5759-5762, 2015.

RADISKY, D. C. Epithelial-mesenchymal transition. **Journal Of Cell Science**, v. 118, n. 19, p.4325-4326, 2005.

RIEMANN, A. et al. Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. **Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology**, v. 466, n. 11, p.2127-2138, 2014.

RIEMANN, A. et al. Acidosis Promotes Metastasis Formation by Enhancing Tumor Cell Motility. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p.215-220, 2016..

ROFSTAD, K; DANIELSEN, T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. **British Journal Of Cancer**, v. 80, n. 11, p.1697-1707, 1999.

SCIUBBA, JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n. 4, p.239-251, 2001.

SEDLAKOVA, O. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. **Frontiers In Physiology**, v. 4, p.1-14, 2014.

SMALLBONE, K. et al. The role of acidity in solid tumour growth and invasion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 235, n. 4, p.476-484, 2005.

STOCK, C. et al. PH Nanoenvironment at the Surface of Single Melanoma Cells. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 20, n. 5, p.679-686, 2008.

SUDHAN, D. R.; SIEMANN, D. W. Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 30, n. 7, p.891-902, 2013.

SUZUKI, A. et al. Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p.129-140, 2014.

SVASTOVA, E.; PASTOREKOVA, S. Carbonic anhydrase IX. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 2, p.226-231, 2013.

ZHANG, X.; LIN, Y.; GILLIES R. Tumor pH and Its Measurement. **J. Nucl. Med.** v. 51, n. 8, p. 1167–1170, 2010.

ZHOU, W.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p.176-183, 2015.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a perspectiva atual, os tumores devem ser compreendidos não mais como simplesmente um conjunto de células mutadas e com taxa de proliferação alterada, mas, sim, a partir da concepção de que existe um microambiente tumoral. Esse microambiente compreende uma rica combinação de diversas interações metabólicas, celulares e fisiológicas entre as células tumorais e células do estroma a qual influencia os eventos relacionados ao processo de carcinogênese e formação de metástases.

Estudos recentes apontam que uma importante característica do microambiente tumoral é a acidificação do meio extracelular. Sabe-se que o pH tecidual de diversos tipos de tumores sólidos, incluindo os da cavidade bucal, é consistentemente ácido. Além disso, a literatura aponta que a presença de um microambiente tumoral ácido, está diretamente relacionado a um comportamento mais agressivo e invasivo das células tumorais.

Neste sentido, compreender a influência deste microambiente tumoral ao processo de carcinogênese é um ponto fundamental para o desenvolvimento de terapias e estratégias mais eficazes no combate ao câncer. Sendo assim, é importante compreender quais efeitos sobre o comportamento migratório das células de carcinoma espinocelular bucal ocorrem quando as mesmas são mantidas em um microambiente acidificado. O presente estudo demonstrou que, no geral, a exposição das células da linhagem de carcinoma espinocelular bucal SCC-4 a um microambiente ácido, produziu modificações no seu comportamento migratório, tanto individual, quanto coletivo.

Deve-se considerar que o presente trabalho apresenta as limitações inerentes aos estudos *in vitro*. Além disso, sabe-se que a restrição dos ensaios à apenas uma linhagem celular pode não produzir dados que devidamente representem a heterogeneidade e complexidade da massa tumoral.

Como perspectivas futuras, os próximos passos deste estudo envolvem a reprodução, com outras linhagens celulares de carcinoma espinocelular bucal, dos ensaios já desempenhados com a linhagem de células SCC-4. A realização de ensaios mecanísticos, tais como detecção da ativação da via de sinalização do NF-KB, que

complementem os presentes resultados também se faz necessária. Diante da observação de mudanças no fenótipo celular após a exposição das células ao meio de cultura acidificado, evidenciou-se a necessidade de investigar a ocorrência de transição epitélio-mesênquima. Pretende-se realizar tal análise por meio da avaliação de RNA mensageiro e proteínas presentes para marcadores epiteliais e mesenquimais através da realização de ensaios de reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) e Western Blot.

REFERÊNCIAS

- ADJEI, I. M.; BLANKA, S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. **J. Funct. Biomater.**, Basel, v. 6, no. 1, p. 81-103, 2015.
- BARAR, J.; OMID, Y. Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy. **Bioimpacts**, Tabriz, Iran, v. 3, no. 4, p.149-162, 2013.
- BECELLI, R. et al. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. **J. Craniofac. Surg.**, Burlington, v. 18, no. 5, p.1051-1054, 2007.
- BENNETT, D. C. et al. Experimental metastasis and differentiation of murine melanoma cells: actions and interactions of factors affecting different intracellular signaling pathways. **Clin. Exp. Metastasis**, London, v. 12, no. 6, p. 385–397, 1994.
- BRIZEL, D. M. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Elmsford, v. 51, no. 2, p. 349-353, 2001.
- EREZ, N. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 17, no. 2, p.135-147, 2010.
- ESTRELLA, V. et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. **Cancer Res.**, Chicago, v. 73, no. 5, p.1524-1535, 2013.
- FANG, J. S. et al. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. **Semin. Cancer Biol.**, Philadelphia, v. 18, no. 5, p. 330-337, 2008.
- FURNESS, S. et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, v. 4, CD006386, 2011.
- GATENBY, R. A. et al. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 4, no. 11, p. 891-899, 2004.
- GILLIES, R. J. et al. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis?. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 39, no. 3, p. 251-257, 2007.
- GILLIES, R. J. et al. MRI of the tumor microenvironment. **J. Magn. Reson. Imaging**, Chicago, v. 16, no. 4, p. 430-450, 2002.

HANAHAN, D. et al. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, no. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, no. 5, p. 646-674, 2011.

HJELMELAND, A. B. et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. **Cell Death Differ.**, London, v. 18, no. 5, p. 829-840, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: 16 out. 2016.

JUSTUS C. R.; DONG L.; YANG L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. **Front. Physiol.**, Lausanne, v. 4, p. 354, 2013.

KATO, Y. et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. **Cancer Cell Int.**, London, v. 13, no. 1, p. 89-99, 2013.

MARTINEZ-ZAGUILAN, R. et al. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. **Clin. Exp. Metastasis**, London, v. 14, no. 2, p.176–186, 1996.

MCCARTY, M. F.; WHITAKER, J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. **Altern. Med. Rev.**, Sandpoint, Idaho, v. 15, no. 3, p. 264-272, 2007.

MOELLERING, R. E. et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. **Clin. Exp. Metastasis**, London, v. 25, no. 4, p. 411-425, 2008.

NEVILLE, B. W. et al. **Oral and maxillofacial pathology**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2009. 984 p.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev. Med. (São Paulo)**, São Paulo, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

PEIXOTO, I. C. et al. Análise do perfil dos pacientes oncológicos sem possibilidades terapêuticas de cura atuais: verificação de demanda por cuidados paliativos em hospital universitário. **Rev. Hosp. Univ. Pedro Ernesto**, [S. l.], v. 10, p. 53-63, 2011.

ROBEY, I. F. et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. **Cancer Res.**, Chicago, v. 69, no. 6, p. 2260–2268, 2009.

ROCHEFORT, H. et al. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 291, no. 2, p.157–170, 2000.

ROFSTAD, E. K.; DANIELSEN, T. Hypoxia induces metastasis of human melanoma cells: involvement of VEGF mediated angiogenesis. **Br. J. Cancer**, London, v. 80, no. 11, p.1697–1707, 1999.

ROZHIN, J. et al. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. **Cancer. Res.**, Chicago, v. 54, no. 24, p. 6517-6525, 1994.

SCIUBBA, J. J. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. **Am. J. Clin. Dermatol.**, Auckland, v. 2, no. 4, p. 239-251, 2001.

SILVA, A. S. et al. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid- mediated invasion. **Cancer Res.**, Chicago, v. 69, no. 6, p. 2677-2684, 2009.

SCHLAPPACK, O. K.; ZIMMERMANN, A.; HILL. R. P. Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. **Br. J. Cancer**, London, v. 64, no. 4, p. 663–670, 1991.

SHERIDAN, C. et al. CD44 +/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. **Breast Cancer Res.**, London, v. 8, no. 5, R59, 2006.

SMALLBONE, K. et al. The role of acidity in solid tumour growth and invasion. **J. Theor. Biol.**, London, v. 235, no. 4, p. 476-484, 2005.

SMALLBONE, K.; MAINI, P. K.; GATENBY, R. A. Episodic, transient systemic acidosis delays evolution of the malignant phenotype: Possible mechanism for cancer prevention by increased physical activity. **Biol. Direct**, London, v. 5, no. 1, p. 22-29, 2010.

SOUNNI, N. E.; NOEL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 3-4, p. 329-342, 2005.

WARNAKULASURIYA, S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 46, no. 6, p. 407-410, 2010.

ZHANG, X.; LIN, Y.; GILLIES R. Tumor pH and Its Measurement. **J. Nucl. Med.**, Chicago, v. 51, no. 8, p. 1167–1170, 2010.

ZHOU, W.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 356, no. 2, p.176-183, 2015.