

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

VIVIANE PALMEIRA DA SILVA

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA EM MICROAMBIENTE ÁCIDO**

PORTO ALEGRE

2017

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

VIVIANE PALMEIRA DA SILVA

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA EM MICROAMBIENTE ÁCIDO**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Visioli

PORTO ALEGRE
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Viviane Palmeira da
Análise do Comportamento de Linhagens de
Carcinoma Espinoceular de Boca em Microambiente
Ácido / Viviane Palmeira da Silva. -- 2017.
109 f.

Orientador: Fernanda Visioli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Câncer de Boca. 2. Microambiente Tumoral. 3.
Metabolismo do Tumor. 4. Baixo pH . 5. Glicólise. I.
Visioli, Fernanda , orient. II. Título.

*Para minha loucura em
“ver o meu sonho teimoso um dia se realizar”.*

Para muitos, o doutorado é mais um curso de pós-graduação. Para mim não! Foi muito além do que qualquer titulação. Foram anos de abdicação, aprendizados e de vivência pessoal que não podem ser traduzidos em forma de artigos científicos. Por isso, nesse momento da escrita, faço questão de deixar aqui registrado a minha eterna gratidão a todos que contribuíram para essa jornada de imensurável significado na minha vida.

A **Maria e Pedro**, minhas preciosidades, sem vocês nada seria possível. Palavras não transmitem o sentimento que transborda do meu peito sobre a existência de vocês em minha vida.

Aos meus pais, **Gisélia e Zequinha**, amo muito vocês.

Aos pais que a vida me deu: **Mônica**, a melhor sogra que alguém poderia ter; meus sogros, **Benito, Mário e Gal**; e o meu pai odontológico, **Jener Farias**.

Às minhas irmãs, **Neila e Olívia**. Sem vocês eu nada sou!

À **Fernanda Visioli**, minha **Fer**. Como Fernanda, orientadora, eu só tenho a agradecer por tudo que ajudou a me tornar. Durante esses anos, ser tua aprendiz foi maravilhoso! Eu tenho muita honra e orgulho de dizer que sou tua primeira orientanda de doutorado e que aprendi muito contigo. Como Fer, a amiga, minha eterna gratidão por existir na minha vida. Amo vocês duas!

À minha irmã patológica e da vida, **bubu**.

Ao professor **Manoel Sant'Ana Filho**, por todo apoio e confiança nesses quase seis anos de UFRGS.

Às mais especiais alunas de iniciação científica que eu poderia ter, **Bianca Prunes** e **Júlia Nunes**, vocês são o orgulho de mainha! Muito obrigada por todo empenho, dedicação,

amizade e parceria. Muito dessa tese não seria possível sem a participação de vocês. Amo muito!

Às minhas amigas do coração **Lelê, Nati Daroit e Nati Koerich**, obrigada por tornarem os meus dias mais suaves. Amo vocês!

Ao **grupo de pesquisa** da professora Fernanda Visioli, vocês são demais!

Ao Laboratório de Migração Celular (**LAMOC**), por todas as experiências que vivemos juntos. Muito obrigada por tudo, em especial aos meus queridos amigos: **Lisi, Bibi, Léo e Palominha**.

Aos professores **Márcia de Oliveira Gaiger, Pantelis Varvaki Rados, Anna Fossati, Marcelo Lamers, Laura de Campos Hildebrand, Vinícius Carrad, Manoela Domingues Martins e Marco Antonio Martins**. O que eu aprendi com vocês levarei eternamente comigo!

Aos amigos patológicos: **Rúbia; Luciano; Felipe; Arthur; Alessandro; Taíse; Arthur; Isa**; e em especial, minha **Tatai**.

Às famílias que acolheram a mim, Maria e Peu durante esses seis anos no Rio Grande do Sul: família da bubu (**Cris, Anete e Maraschin**); família da **Cacá (Mario e Luna)**; **Vô Roberto e Vó Loire**; e a família **Jacinto Gomes**, representando todos os nossos queridos vizinhos.

À **Beatriz Silva**, o nosso anjo de luz em forma de ser humano e médica da minha família.

À todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande, em especial:

- Aos técnicos da Patologia Bucal.

- Ao setor da infra-estrutura, principalmente ao **Deleon** e ao **João**, por todo o apoio e força de vontade para me ajudar a salvar os meus experimentos nos momentos em que mais precisei. A parceria de vocês foi de extrema valia.

- Ao LABIM, em especial a **Luíza** por todo acolhimento e ajuda com meus experimentos.

À **UFRGS**, à **CAPES**, ao **CNPq** e ao **HCPA**, por apoiarem e financiarem este projeto, assim como os meus cursos de pós-graduação.

Por fim, agradeço a **Porto Alegre**, essa cidade maravilhosa que tanto me ensinou a viver e me trouxe a possibilidade de ter (re)encontros maravilhosos. Agora, volto para minha **Bahia**, porque eu...

Eu vim
Eu vim da Bahia cantar
Eu vim da Bahia contar
Tanta coisa bonita que tem
Na Bahia, que é meu lugar
Tem meu chão, tem meu céu, tem meu mar
A Bahia que vive pra dizer
Como é que se faz pra viver
Onde a gente não tem pra comer
Mas de fome não morre
Porque na Bahia tem mãe Iemanjá
De outro lado o Senhor do Bonfim
Que ajuda o baiano a viver
Pra cantar, pra sambar pra valer
Pra morrer de alegria
Na festa de rua, no samba de roda
Na noite de lua, no canto do mar
Eu vim da Bahia
Mas eu volto pra lá
Eu vim da Bahia
Mas algum dia eu volto pra lá.

(**Gilberto Gil**, Eu Vim da Bahia, 1966)

Ampliar nosso conhecimento sobre a biologia do carcinoma espinocelular bucal é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para melhorar a sobrevida dos pacientes acometidos por essa patologia. Para tanto, compreender as contribuições do microambiente tumoral à carcinogênese é muito importante. Um característica importante a ser avaliada do microambiente tumoral é a acidificação do meio extracelular. Considerando que o pH ácido tumoral está relacionado à maior agressividade da lesão, o objetivo deste projeto é estudar os efeitos de um microambiente ácido na biologia de células de carcinoma espinocelular bucal. Para tanto, foram realizadas duas revisões da literatura, nas quais foram avaliados os seguintes temas: influência da acidez extracelular na invasão e migração; e os mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao tratamento quimioterápico, induzida pela acidez do microambiente tumoral. Tais revisões embasaram a construção do terceiro artigo desta tese, o qual se propôs a comparar o comportamento de células linhagens de carcinoma espinocelular bucal (SCC-4 e SCC-9) e queratinócitos (HaCat) cultivadas em meio de cultura de pH 6.8 com células mantidas em meio neutro pH 7.4. As células foram expostas de forma contínua ou intermitente ao pH 6.8 e a adaptação das células foi avaliada pelo ensaio clonogênico. Além disso, as células foram avaliadas quanto à sua capacidade migratória pelo ensaio de cicatrização de feridas e de time lapse. A expressão gênica relacionada à indiferenciação e pluripotência foi investigada por PCR em tempo real com os marcadores Bmi-1 e CD44, assim como pelo ensaio de orosferas. A resistência desses grupos de células ao tratamento anti-câncer foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular da sulforodamina B após o tratamento com Cisplatina. Para a análise estatística, inicialmente foi realizada a distribuição dos dados, seguido da comparação estatística dos grupos utilizando, para distribuição normal, os testes ANOVA e ANOVA de duas vias. Toda a análise foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0 e o nível de significância considerado foi de $p < 0.05$. Observamos que ambas as linhagens mudaram sua morfologia para um aspecto mesenquimal. Ao avaliar o perfil migratório observou-se que as células SCC-9 apresentaram maior capacidade de migração após a exposição ao pH 6.8. O aumento da migração celular pode ser causado pela indução da transição epitélio-mesenquima, visto que observamos o aumento da expressão de N-caderina (SCC-4: $p < 0.05$) concomitante à diminuição de E-caderina (SCC-4: $p < 0.05$). A exposição à acidez também provocou, em ambas as linhagens, aumento da capacidade de formar orosferas em placa de baixa aderência, denotando um fenótipo pluripotente (SCC-4: $p = 0.007$ / SCC-9: $p = 0.1202$). Tal resultado foi reforçado com aumento da expressão gênica do marcador de célula-tronco tumoral CD44 ($p = 0.0325$), na linhagem SCC-4. No entanto, observamos diminuição da expressão de Bmi-1 ($p = 0.0572$) em relação ao controle. A resistência à Cisplatina aumentou nos casos de exposição contínua à acidez (SCC-4: $p < 0.05$). O recondicionamento em meio neutro reverteu a sensibilidade celular (SCC-4: $p > 0.05$). Concluímos que a acidez extracelular no carcinoma espinocelular bucal aumenta a capacidade de migração, induz o fenótipo de células tronco-tumorais e aumenta a resistência a quimioterápicos.

Palavras-Chave: câncer bucal, acidez tumoral, célula tronco tumoral, invasão tumoral, quimioterapia, metástases.

To expand our knowledge about the biology of oral squamous cell carcinoma is crucial for the development of new therapeutic strategies and to improve the survival of the patients affected by this pathology. Therefore, understanding the contributions of the tumor microenvironment to carcinogenesis is very important. An important feature to be evaluated of the tumor microenvironment is the acidification of the extracellular medium. Considering that acidic pH is related to the greater aggressiveness of the tumor, the aim of this study is to analyze the effects of an acidic microenvironment on the biology of oral squamous cell carcinoma cells. We realized two reviews of the literature, in which the following themes were evaluated: the influence of extracellular acidity on the invasion and migration; and the molecular mechanisms involved in the resistance to chemotherapeutic treatment, induced by the acidity of the tumor microenvironment. These revisions helped to construct the third article of this thesis, which proposed to compare the behavior of squamous cell carcinoma lines (SCC-4 and SCC-9) and keratinocytes (HaCat), cultured under pH 6.8 was compared to cells maintained at pH 7.4. For the statistical analysis, the data distribution was initially performed, followed by the statistical comparison of the groups using, for normal distribution, ANOVA and ANOVA two-way tests. All analysis was performed in the GraphPad Prism 5.0 program and the level of significance considered was $p < 0.05$. After continuous or intermittent exposure to pH 6.8, cell adaptation was assessed by the clonogenic assay. In addition, the migratory capacity of the cells was evaluated by the wound healing and time-lapse assays. The gene expression related to undifferentiation and pluripotency was assessed by real-time PCR analysis of the Bmi-1 and CD44 markers, as well as by the orosphere assay. The resistance of these cell groups to anti-cancer treatment was assessed by the sulforhodamine B cell viability assay after treatment with Cisplatin. We observed that both cell lines changed their morphology to a mesenchymal aspect. When assessed the migratory profile, it was observed that SCC-9 cells showed higher migration capacity after exposure to pH 6.8. Increased cell migration may be caused by the induction of the epithelial-mesenchymal transition, as we observed increased N-cadherin (SCC-4: $p < 0.05$) expression concomitant with decreased E-cadherin (SCC-4: $p < 0.05$). Exposure to acidity also led to increased ability to form orospheres on low-attachment dishes, denoting a pluripotent phenotype in both strains (SCC-4: $p = 0.007$ / SCC-9: $p = 0.1202$). This result was reinforced by increased expression of the CD44 ($p = 0.0325$) tumor cell marker in the SCC-4 cells. However, we observed a decrease in the expression of Bmi-1 ($p = 0.0572$) in relation to the control. Resistance to Cisplatin increased when cells were continuously exposed to acidity (SCC-4: $p < 0.05$). Neutral reconditioning reversed cell sensitivity (SCC-4: $p > 0.05$). We conclude that extracellular acidity in oral squamous cell carcinoma increases the migration capacity, induces the cancer stem cell phenotype and increases resistance to chemotherapy.

Key-Words: oral cancer, acidosis, cancer stem-cell, tumor invasion, chemotherapy, metastasis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - ATP-Binding Cassette

AE2 - anion exchanger 2

ATG5 - Autophagy protein 5

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

Bmi-1 - B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog

CAIX - anidrase carbônica IX

CEC- carcinoma espinocelular

CIS – Cisplatina

CSC – cancer stem cell

DAU - Daunorrubicina

DMEM - meio *Eagle* modificado por Dulbecco

DOC - docetaxel

DOX – Doxurubicina

ECM - extracellular matrix

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT – Epithelial-mesenchymal transition

ERK - extracellular signal–regulated kinases

GFAP - glial fibrillary acidic protein

GLUT 1 - glucose transporter 1

HGF - hepatic growth factor

IL-6 - Interleucina-6

HPV - Papiloma Vírus Humano

LASS2 - Homo Sapiens Longevity Assurance Homolog 2 of Yeast LAG1

LC3 - Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

MAP - Proteínas Ativadas por Mitógeno

MAPK14 - mitogen-activated protein kinase 14

MCT1 - monocarboxylate transporter1

MET - mesenchymal-epithelial transition

MDR - resistência multidrogas

MDR1 - Multiple Drug Resistance 1

MIBG – Meta-iodo-benzil-guanidina

MMP- metalloproteinasas
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
NBCe1- Cotransportador de bicarbonato de sódio 1
NBCe2- Cotransportador de bicarbonato de sódio 2
NHE1 - Na⁺ / H⁺ exchanger 1
Pgp - Glicoproteína-P
PKC - Proteína Quinase C
PIK3 - phosphoinositide-3-kinase
PTEN - phosphatase and tensin homolog
RAC1 - ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RHOA - Ras-homologue protein family, member A
ROS - Reactive Oxygen Species
SCC- Squamous cell carcinoma
SLC4- Cotransportador de bicarbonato de sódio eletrogênico
SRB – Sulforodamina B
STAT3 - (Signal Transducers and Activators of Transcription 3
TGFβ - transforming growth factor-beta
TM9SF - Superfamília Transmembrana-9
u-PA - urokinase plasminogen activator
UPR – Unfolded Protein response
V-ATPases - (H⁺)-Vacuolar-ATPase
VEGF - vascular endothelial growth factor
5-FU – 5-Fluoracila

1. APRESENTAÇÃO	12
2. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
4. OBJETIVOS	26
5. ARTIGO CIENTÍFICO I	27
6. ARTIGO CIENTÍFICO II	57
7. ARTIGO CIENTÍFICO III	85
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108

O objetivo principal desta tese é realizar um estudo sobre os principais efeitos da acidose no comportamento do câncer, em especial, em células de linhagens de carcinoma espinocelular bucal.

Para fundamentar o nosso objetivo, inicialmente apresentaremos os nossos antecedentes e justificativas, revisando a literatura sobre as causas do microambiente extracelular ácido no câncer, quais as consequências que a acidez pode gerar para progressão do tumor e a justificativa em estudar esse tema. Em seguida, apresentaremos o nosso objetivo e seguiremos apresentando três artigos científicos.

O artigo científico I trata-se de uma revisão bibliográfica a respeito dos efeitos da acidez extracelular tumoral nos processos de migração e invasão celular.

O artigo científico II é uma revisão sistemática da literatura, que tem como finalidade estudar os mecanismos biológicos celulares frente à resistência a quimioterápicos induzida pela acidose extracelular.

Por fim, o artigo científico III é a parte empírica desta tese, onde será demonstrado o comportamento de linhagens de carcinoma espinocelular de boca em microambiente ácido por meio de experimentos *in vitro*, com linhagens de células de carcinoma espinocelular de boca e de queratinócitos bucais.

2. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

Considerado um problema de saúde pública importante, o câncer é uma das principais causas de mortes da população mundial. Estima-se que suas taxas de incidência cresceram em 20% na última década, e que até o ano de 2030 teremos mais 27 milhões de novos casos no mundo (WARNAKULARUSUYA et al., 2010; INCA, 2016). De acordo com os últimos dados do Instituto Nacional do Câncer, no Brasil surgiram 600 mil novos casos de câncer no ano de 2016 (INCA, 2016).

O termo ‘câncer de boca’ está relacionado às neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal. O carcinoma espinocelular ou epidermóide de boca é a neoplasia maligna da cavidade bucal mais prevalente, que representa 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; INCA, 2016).

O câncer de boca está entre os tipos mais comuns de neoplasias malignas que atingem a população brasileira, entre homens é o quinto mais prevalente. Para o ano de 2016, esperou-se 15.490 novos casos dessa doença, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres. A região sul será responsável pela incidência de cerca 16% destes casos (INCA, 2016).

Apesar de a pesquisa em câncer bucal ter avançado consideravelmente, o tratamento ainda baseia-se principalmente na atividade proliferativa das células tumorais. O tratamento cirúrgico agressivo, por vezes mutilador, permanece como a abordagem predominante de tratamento dos pacientes, mesmo com a doença em fase inicial, enquanto que o tratamento quimioterápico é considerado apenas coadjuvante (SCIUBBA, 2001).

Os agentes quimioterápicos no tratamento do carcinoma espinocelular bucal resultam temporariamente numa redução pouco significativa do tamanho do tumor, porém na grande

maioria dos casos o tumor volta a crescer e se torna resistente ao tratamento. Dessa forma, o tratamento quimioterápico não melhora as taxas de sobrevida significativamente (FURNESS et al., 2010). Dados recentes têm demonstrado que as taxas de sobrevida em 5 anos destes pacientes variam entre 46 e 54%, e se mantêm inalteradas há décadas (INCA, 2004; INCA, 2014; PEIXOTO et al., 2011).

Buscando diminuir as elevadas taxas de mortalidade do câncer, um grande número de pesquisas científicas tenta encontrar soluções para o seu tratamento. Porém, a concretização de tal desfecho ainda se mantém um desafio, pois a carcinogênese é um processo dinâmico de extrema complexidade e ainda exige muitos estudos para o alcance de sua total compreensão (HANNAH, WEINBERG, 2011; SMALLBONE et al., 2005).

O processo de carcinogênese pode ser melhor compreendido quando consideramos o câncer como um microambiente tumoral, e não estritamente um conjunto de células geneticamente modificadas. Nesta concepção, o tumor é entendido como um ambiente em que há mútuas interações entre as células cancerosas e seu estroma, os fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune (ONUCHIC et al., 2010; HANAHAN, WEINBERG et al., 2011). O termo microambiente tumoral usualmente é interpretado como um conjunto de características metabólicas e fisiológicas observadas em tumores sólidos (GILLIES et al., 2002).

Uma característica marcante do microambiente tumoral é a acidificação do meio extracelular (BRIZEL et al., 2001; SMALLBONE et al., 2005; MOELLERING et al., 2008; SILVA et al., 2008; FANG, GILLIES, GATEMBY, 2008; ZHANG et al., 2010; HJELMELAND et al., 2010; KATO et al., 2013). 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, enquanto que pH tecidual normal é de 7,4-7,5.

Essa acidificação tumoral pode ocorrer devido a uma baixa perfusão sanguínea que, por consequência, pode gerar hipóxia na área afetada. A falta de oxigenação no ambiente tumoral, a hipóxia, faz com que as células cancerosas invertam os passos normais da sua produção energética, ou seja, o destino do piruvato produzido na glicólise passa a ser o de fermentação láctica e não mais ciclo de Krebs. 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).

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 (CAMPBELL, 2000; CHAMPE et al., 2013; NELSON, COX, 2014)

Uma célula cancerígena em situação de hipóxia gera a sua energia através da glicólise e fermentação láctica, o que resulta em pouca quantidade de energia a cada ciclo. No entanto, para sobreviver, a célula maligna passa a captar cerca de 10 vezes ou 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 e, por consequência, secretam maior quantidade de ácido no meio extracelular (CAMPBELL, 2000; CHAMPE et al., 2013; NELSON, COX, 2014).

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 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 estromais (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; SMALLBONE et al., 2010; ZHANG 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 progressão do câncer. 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 ácido (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. 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) (MOLLERING et al., 2008;

BARAR, OMID, 2013). O resultado deste processo é uma seleção das células mais resistentes, com potenciais mais agressivos e invasivos.

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 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 na diminuindo o crescimento do tumor (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.

Invasão Tumoral e Metástase

Estudos demonstram que os tumores metastáticos têm o microambiente mais ácido do que os tumores primários, legitimando a teoria de que este ambiente pode interferir na seleção de células com maior potencial de invasão (FANG, GILLIES, GATEMBY, 2008; MOLLERING et al., 2008).

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 exposta 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. Tais efeitos implicam uma forte associação do baixo pH no processo de invasão tumoral.

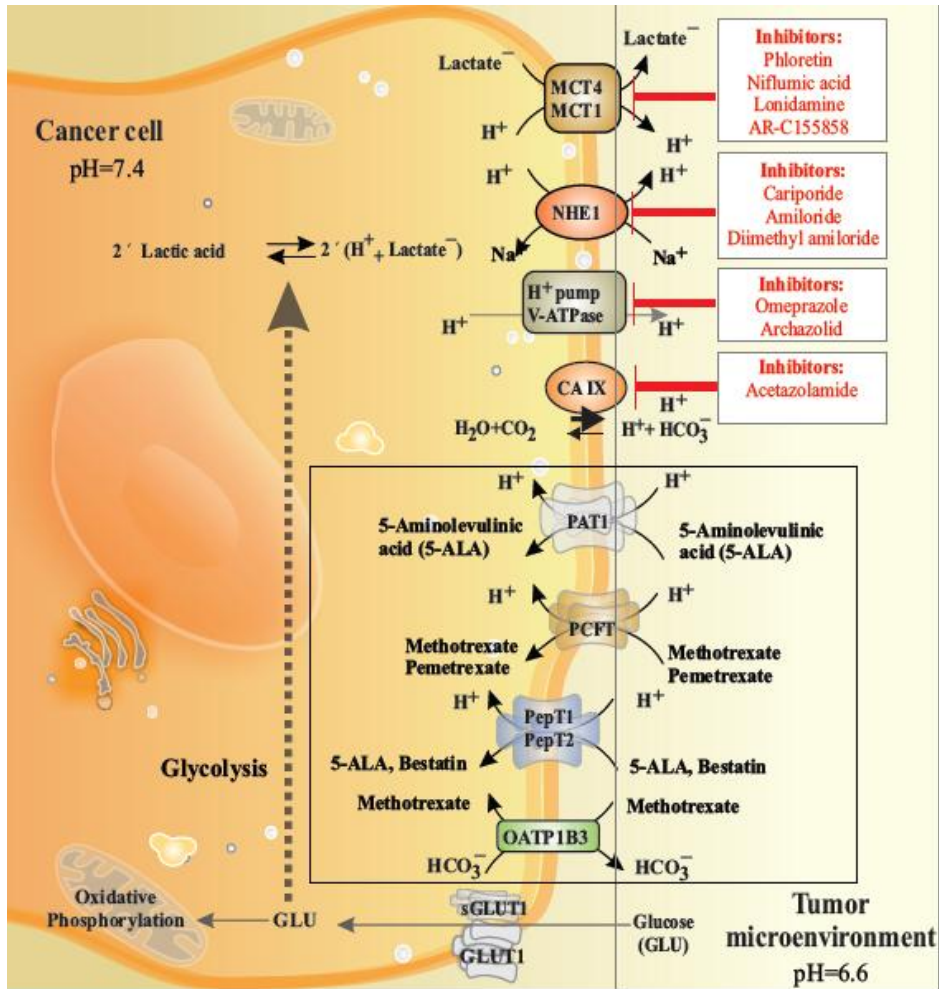


Figura 1. Representação dos reguladores-chave do pH e os principais mecanismos de transporte envolvidos na condução de quimioterápicos em tumores sólidos. O transporte da glicose é feito, principalmente, por um transportador de glicose (GLUT1) e metabolizado através do mecanismo de glicólise na produção 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 carbonica 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. *BioImpacts*, 2013, 3(4), 149-162.

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 tumoral, conclui-se que a acidez do microambiente pode levar a uma maior taxa de invasão celular e, conseqüentemente, a um maior risco de metástase (SOUNNNI, NOEL, 2005; HANAHAN, WEINBERG, 2000).

Alguns estudos mostraram claramente que o baixo pH resulta diretamente em maiores taxas de metástases (SCHLAPPACK et al., 1991; BENNETT et al., 1994) e maior comportamento invasivo (ROFSTAD, DANIELSEN, 2002; MARTINEZ-ZAGUILAN et al., 1996; ROZHIN et al., 1994; ROCHEFORT et al., 2000).

Resistência ao Tratamento Quimioterápico

A resistência tumoral a quimioterápicos pode ser originada a partir de uma série de fatores bioquímicos e fisiológicos (MAHONEY et al., 2003). Dentre os fatores fisiológicos, acredita-se que o pH ocupa um importante papel desse mecanismo. A acidez num tumor sólido pode afetar o gradiente iônico prejudicando a distribuição das drogas e modificar o fenótipo das células tumorais, deixando as células mais resistentes aos tratamentos

quimioterápicos por aumentar a resistência celular à apoptose (MAHONEY et al., 2003; DE MILITO A, FAIS, 2005; KATO et al., 2013; BARAR, OMID, 2013).

Em microambiente ácido o mecanismo de aprisionamento de íons (“*ion trapping*”) ou o efeito direto dos íons de gradiente na distribuição de drogas, interfere na resistência aos tratamentos quimioterápicos dificultando o transporte da droga. Esse modelo explica que, em tumores ácidos, as drogas quimioterápicas consideradas básicas vão se concentrar em áreas de pH ácido e, por consequência, dificultar a absorção da droga anti-neoplásica até o seu alvo principal, a célula cancerígena (RAGHUNAND, GILLIES, 2000; MAHONEY et al., 2003).

Assim como diversos temas que envolvem o processo da carcinogênese, o mecanismo de resistência tumoral ainda não foi bem elucidado na literatura. No entanto, sabe-se que em outros tipos de câncer o pH ácido tumoral já foi relacionado à maior agressividade tumoral e maior resistência à morte celular (D’ARCANGELO et al., 2000; FANG, GILLIES, GATENBY, 2008; FLACKE et al., 2009). VISIOLI et al., 2014 evidenciaram que o estresse ácido pode aumentar a resistência em células endoteliais ao tratamento com drogas anti-angiogênicas. Contudo, nenhum estudo foi realizado até o momento para avaliar os efeitos do microambiente ácido na resistência ao tratamento quimioterápico em relação ao câncer de boca.

Indiferenciação e Pluripotência

Estudos *in vitro* em linhagens de células tumorais demonstraram que a exposição dessas células a um ambiente ácido favorece um fenótipo mais agressivo (BRIZEL et al., 2001; FANG, GILLIES, GATEMBY, 2008; HJELMELAND et al., 2010). Hjelmeland et al. (2010) observaram que células tumorais de gliomas cultivadas em baixo pH tiveram seus fenótipos alterados, com um aumento significativo na expressão gênica de fatores de

transcrição associados a indiferenciação como Oct-4 e Nanog, concluindo que o microambiente ácido tumoral contribui para um pior prognóstico de gliomas.

Alguns dos principais marcadores utilizados para estudar esses defechos no caso de carcinomas são: Bmi-1 e CD44 (KRISHNAMURTHY; NÖR, 2012). A proteína Bmi-1 faz parte de um grupo de proteínas responsáveis por controlar o ciclo celular e a auto-renovação de células tronco teciduais. Acredita-se que ela possa influenciar no processo de tumorigênese, inativando os *loci* p16Ink4a e p19Arf dos genes supressores de tumor Rb (proteína do retinoblastoma) e p53 (fator de transcrição nuclear), respectivamente (MOLOFSKY et al., 2005). O aumento da sua expressão tem sido descrita como um marcador de prognóstico em diversos cânceres humanos (HAYRY et al., 2010; YU et al., 2011).

O CD44 é uma proteína transmembrana responsável por agir nas interações célula-célula e célula matriz. Esta proteína vem sendo descrita na literatura como um dos possíveis marcadores de células tronco-tumoral de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, importante no processo de migração, progressão, metástase e proliferação do câncer (KRISHNAMURTHY; NÖR, 2012; CHEN et al., 2014; HUANG et al., 2014). Diante do exposto, torna-se evidente que o microambiente ácido do tumor e seus efeitos nas células tumorais representam importantes objetos de estudo para uma melhor compreensão do câncer.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAR, J.; OMID, Y. Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy. *BioImpacts*, v. 3, n. 4, p. 149-162, 2013.

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.

BENNETT, D.C.; HOLMES, A.; DEVLIN, L. et al. Experimental metastasis and differentiation of murine melanoma cells: actions and interactions of factors affecting different intracellular signalling pathways. *Clin Exp Metast*, v. 12, p. 385–397, 1994.

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 22/01/2014.

BRIZEL, D.M.; SCHROEDER, T.; SCHER, R.L.; WALENTA, S.; CLOUGH, R.W.; DEWHIRST, M.W.; MUELLER-KLIESER, W. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 51, n. 2, p. 349-53, 2001.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752p.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Bioquímica Ilustrada. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 545p.

CHEN, J.; ZHOU, J.; LU, J.; XIONG, H.; SHI, X.; GONG, L. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, v. 14, p.15, 2014.

D'ARCANGELO, D.; FACCHIANO, F.; BARLUCCHI, L.M.; MELILLO, G.; ILLI, B.; TESTOLIN, L.; GAETANO, C.; CAPOGROSSI, M.C. 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.

DE MILITO, A.; FAIS, S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncology*, v. 1, N. 6 , p. 779-786, 2005.

FANG, J.S.; GILLIES, R.D.; GATENBY, R.A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol*, v. 18, p. 330-337, 2008.

FLACKE, J.; KUMAR, S.; KOSTIN, S.; REUSCH, H.P.; LADILOV, Y. Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression. *Apoptosis*, v. 14, p. 90–96, 2009.

FURNESS, S.; GLENNY, A.M.; WORTHINGTON, H.V.; PAVITT, S.; OLIVER, R.; CLARKSON, J.E.; MACCLUSKEY, M.; CHAN, K.K.; CONWAY, D.I. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 8, p. doi: 10.1002/14651858, 2010.

GILLIES, R.J.; RAGHUNAND, N.; KARZMAR, G.S.; BHUJWALLA, Z.M. MRI of the Tumor Microenvironment. *J Magn Reson Imaging*, v. 16, p. 430–450, 2002.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *The Next Generation. Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HAYRY, V.; MAKINEN, L.K.; ATULA, T.; SARIOLA, H.; MAKITIE, A.; LEIVO, I.; KESKI-SANTTI, H.; LUNDIN, J.; HAGLUND, C.; HAGSTROM, J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *British Journal of Cancer*, v. 102, p. 892-897, 2010.

HJELMELAND, A.B.; WU, Q.; HEDDLESTON, J.M.; CHOUDHARY, G.S.; MACSWORDS, J.; LATHIA, J.D.; MCLENDON, R.; LINDNER, D.; SLOAN, A.; RICH, J.N. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ*, v. 18, n. 5, p. 829-40, 2011.

HUANG, C.F.; XU, X.R.; WU, T.F.; SUN, Z.J.; ZHANG, W.F. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med*, v. 1, p.1-7, 2014.

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

KATO, Y.; OZAWA, S.; MIYAMOTO, C.; MAEHATA, Y.; SUZUKI, A.; MAEDA, T.; BABA, Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int*, v. 3, n. 1, p. 89, 2013.

KRISHNAMURTHY, S.; NÖR, J.E. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res*, v. 91, n. 4, p.334-340, 2012.

MAHONEY, B.P.; RAGHUNAND, N.; BAGGETT, B.; GILLIES, R.J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 1207-1218, 2003.

MARTINEZ-ZAGUILAN, R.; SEFTOR, E.A.; SEFTOR, R.E.B. ET AL. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metast* v.14, p.176–186, 1996.

MCCARTY, M.F.; WHITAKER, J. Manipulating Tumor Acidification as a Cancer Treatment Strategy. *Altern Med Rev*, v.15, p.264-272, 2010.

MOLOFSKY, A.V.; HE, S.; BYDON, M.; MORRISON, S.J.; PARDAL, R. BMI-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev*, v. 19, p. 1432- 1437, 2005.

MOELLERING, R.E.; BLACK, K.C.; KRISHNAMURTY, C.; BAGGETT, B.K.; STAFFORD, P.; RAIN, M.; GATENBY, R.A.; GILLIES, R.J. Acid treatment of

melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis*, v. 25, n. 4, p. 411-25, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica Lehninger*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328p.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 3rd Ed. St. Louis, Saunders Elsevier, 2008.

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

RAGHUNAND, N.; GILLIES, R.J. pH and drug resistance in tumours. *Drug Resistance Updates*, v. 3, p. 39-47, 2000.

PEIXOTO, I.C.; PEREGRINO, A.A.F.; OLIVEIRA, O.V.S.; RAMOS, R.S. Análise do perfil dos pacientes oncológicos sem possibilidades terapêuticas de cura atuais: verificação de demanda por cuidados paliativos em hospital universitário. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 10, p.53-63, 2011.

ROBEY, I.F.; BAGGETT, B.K.; KIRKPATRICK, N.D.; ROE, D.J.; DOSESCU, J.; SLOANE, B.F. ET AL. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res*, v. 69, p. 2260–2268, 2009.

ROCHEFORT, H.; GARCIA, M.; GLONDU, M. ET AL. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta*, v. 291, p. 157–170, 2000.

ROFSTAD, E.K.; DANIELSEN, T. Hypoxia induces metastasis of human melanoma cells: involvement of VEGF mediated angiogenesis. *Br J Cancer* v. 80, p. 1697–1707, 2002.

ROZHIN, J.; SAMENI, M.; ZIEGLER, G. ET AL. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res*, v. 54, p. 6517-6525, 1994.

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*, v. 64, p. 663–670, 1991.

SCIUBBA, J.J. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*, v. 2, p. 239-51, 2001.

SHERIDAN, C.; KISHIMOTO, H.; FUCHS, R.K.; MEHROTRA, S.; BHAT-NAKSHATRI, P.; TURNER, C.H. ET AL. CD44 +/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, v. 8, p. 59, 2006.

SILVA, A.S.; YUNES, J.A.; GILLIES, R.J.; GATENBY, R.A. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res*, v.69, p.:2677-2684, 2009.

SMALLBONE, K.; GAVAGHAN, D.J.; GATENBY, R.A.; MAINI, P.K. The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *Journal of Theoretical Biology*, v. 235, 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*, v. 5, p. 22, 2010.

SOUNNI, N.E; NOEL, A. Membrane-type matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochemie*, v. 89, p. 329-342, 2005.

VISIOLI, F.; WANG, Y.; NING, Y. ET AL. Glucose-Regulated Protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. *PlosOne*, v.9, n.6, 2014.

WARNAKULASURIYA, S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol*, v. 46, n. 6, p. 407-10, 2010.

YU, C.C.; LO, W.L.; CHEN, Y.W.; HUANG, P.I.; HSU, H.S.; TSENG, L.M.; HUNG, S.C.; KAO, S.Y.; CHANG, C.J.; CHIOU, S.H. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *J Oncol*, v. 2011, p. 2011.

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

4.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição a um microambiente ácido em células de linhagens de carcinoma espinocelular de boca, SCC-4 e SCC-9, em relação à capacidade migratória, à indiferenciação e pluripotência e na resistência ao tratamento com quimioterápico.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar uma revisão de literatura sobre os mecanismos que explicam o efeito da acidez extracelular na migração e invasão celular, bem como na resistência ao tratamento com quimioterápicos (Artigos 1 e 2, respectivamente);
- Avaliar a adaptação das células de carcinoma espinocelular bucal ao microambiente ácido, analisando a viabilidade celular e alterações no ciclo celular.
- Avaliar a capacidade de migração e invasão das células de linhagens de carcinoma espinocelular de boca expostas a um microambiente ácido (Artigo 3);
- Avaliar a expressão genica em relação à indiferenciação e pluripotência nas culturas de linhagens de carcinoma espinocelular de boca após a exposição ao microambiente ácido (Artigo 3);
- Avaliar os efeitos da exposição a um microambiente ácido na resistência ao tratamento de células de carcinoma espinocelular bucal com droga anti-câncer (Artigo 3).

Artigo de revisão da literatura submetido ao periódico “Cancer Investigation” (Fator de Impacto 2.231).

Cancer Investigation



**ACIDIFICATION OF THE TUMOR MICROENVIRONMENT:
EFFECTS ON TUMOR INVASION AND METASTASIS**

ACIDIFICATION OF THE TUMOR MICROENVIRONMENT: EFFECTS ON TUMOR INVASION AND METASTASIS

Abstract

Tumor metabolism disruption has become an important hallmark of cancer. High glycolysis and lactic fermentation contribute to the acidification of the tumor microenvironment. Exposition to acidic pH selects or induces the development of more aggressive phenotypes with increased potential for migration, invasion and metastasis. This article proposes to conduct a literature review on the main mechanisms to explain the relation between tumor pH and metastasis. To improve our knowledge on this subject may be an important key to the discovery of new therapies for cancer control and to development of new diagnostic and prognostic technology.

Key-words: tumor microenvironment; tumor acidosis; cell migration; tumor invasion; metastasis.

Introduction

According to the current understanding of carcinogenesis, cancer is considered a complex disease, where a new microenvironment arises. This complex tissue is composed by a combination of different cell types, where mutual interactions take place between cancer cells and stromal cells. Moreover, a new set of metabolic alterations are observed in solid tumors (1-4). An important feature of the tumor microenvironment is the acidification of the extracellular compartment (5-11). Studies have shown that the extracellular pH of solid tumors is consistently acidic, reaching significantly low pH values (12).

Tumor acidification may occur as a result of poor perfusion, possibly leading to hypoxia in the affected area. Decreased oxygenation in the tumor environment causes cancer cells to invert the normal steps of energy production, i.e., the pyruvate produced during glycolysis becomes a fuel for lactate fermentation, no longer entering the Krebs cycle. A cancer cell that generates its energy through lactate fermentation produces a small number of ATP molecules at each cell cycle. However, in order to survive, malignant cells uptake 10 times or more of glucose than a normal cell does, increasing the expression of glucose transporter 1 (GLUT1). Therefore, tumor cells resist in anaerobic environments increasing the uptake of glucose so they can produce enough energy to survive; as a consequence, they also secrete larger amounts of acid into the extracellular medium (13-15). However, even though hypoxia contributes to tumor acidification, the former is not always necessary in aggressive tumors, characterizing the so-called Warburg effect or "aerobic glycolysis", first described by Otto Warburg in 1930 (16). Warburg identified the

Cancer Investigation

presence of high levels of glycolysis even in normoxic tumors, suggesting that tumor acidification may occur regardless of hypoxia (Figure 1) (17,18).

Due to the high rates of glycolysis, naturally occur a greater production and accumulation of hydrogen and lactate ions in the cytoplasm, which would make the intracellular pH acidic and lead to cell death. In order to survive, cancer cell is able to reverse this situation through a phenomenon called the inverted pH gradient, which is capable of turning the intracellular pH alkaline and extracellular pH acidic. The reverse pH gradient occurs due to the ability of the cell to secrete protons with the aid of enzymes and transporters with buffering functions. The main molecules involved in this process are the carbonic anhydrases, vacuolar H⁺-ATPases, monocarboxylate transporters, Na⁺ dependent Cl⁻ / HCO₃⁻ exchangers, ATP synthase (Figure 1) (19-21).

The chronic exposure of the tumor to acidity induces apoptosis of normal cells and may act as a stressor and consequently as a selective pressure for tumor cells. Therefore, it is possible to infer that acidification may be an inherent characteristic of tumors (10,15,17,22,23). Although, there is consistent scientific evidence showing that acidic pH promotes tumor aggressiveness and increases the metastatic potential of cancer cells, the mechanisms through which acidity in the microenvironment influences tumor invasion have not been completely elucidated. Currently, it is believed that different interconnected factors influence these processes. The objective of the present article was to review the literature available on the effects of acidic stress on the tumor microenvironment, especially those influencing the migration and invasion potential of cancer cells.

Cancer Investigation

1. Induction of epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem-cell phenotype

Tumor invasion is characterized by a complex sequence of events occurring both inside and outside the cell. During tumor invasion, cells undergo reprogramming until they acquire the ability to migrate (18,24,25). Throughout this process, several changes take place: loss of junctional adhesion, morphologic changes, expression of matrix-degrading enzymes, resistance to apoptosis and increase in motility (24).

This differentiation is based on changes in cell phenotype, whereby an epithelial cell is capable of acquiring features of a mesenchymal cell with higher migration ability. This process is referred as epithelial-mesenchymal transition (EMT) (26,27). Following EMT and tissue invasion, cancer cells undergo new internal reprogramming and are converted back into their original epithelial form. This process is called mesenchymal-epithelial transition (MET) (24,27). E-cadherins are cell adhesion molecules highly expressed by epithelial cells, a cancer cell undergoing EMT decreases the expression of E-cadherin and increases the expression of Vimentin and N-cadherin, typical mesenchymal markers (Figure 2) (24,27).

In order to analyze the effects of tumor acidity, Peppicelli et al. (28) investigated melanoma lineages. The authors observed that cells cultured in acidic pH presented higher invasive potential and were associated with lower expression of E-cadherin and concomitant higher expression of N-cadherin and Vimentin. These data suggest that acidosis may contribute to the process of differentiation into a mesenchymal-like cell so that the tissue invasion process can be enhanced (24).

Cancer Investigation

Mesenchymal stem cells play extremely important roles in the pathogenesis of cancer, especially in cell growth, migration, invasion, metastasis and chemo-resistance (29-31). It is currently known that, when a mixture of mesenchymal stem cells and malignant epithelial cells is implanted in animals, significantly higher rates of tumor growth are observed when compared with implants containing only malignant epithelial cells (32). Studies discussing the relationship between mesenchymal stem cells and microenvironmental pH are still scarce. It was reported that malignant epithelial cells mixed with mesenchymal stem cells exposed to acidity showed a higher degree of tumor growth when compared with the same mixture cultured in neutral pH. Cell motility and the expression of EMT-related factors were found to be significantly higher in the group exposed to an acidic environment, as evidenced by the increased levels of N-cadherin, Snail, I κ B, and transforming growth factor-beta (TGF- β), concomitantly with decreased levels of E-cadherin. These findings suggested that mesenchymal stem cells associated with acidic pH have a crucial role in regulating factors that influence tumor invasion (32).

Cancer stem cells (CSCs) are a small fraction of undifferentiated cancer cells that exhibit stem cell-like features. They have the ability to self-renew and to originate new tumors. Recently, a link between EMT and CSC has been proposed, there is a hypothesis that invasive cells behave like stem cells, with the ability to differentiate into other cell type in order to complete the mechanisms of invasion and metastasis (24).

Under acidic stress, cells express transcription factors that are characteristic of a cancer stem cell phenotype. Hjelmeland et al. (9), found that glioma cells cultured at pH 6.5 showed a higher expression of transcription

Cancer Investigation

factors Oct4, Nanog, and Olig2, when compared to cells cultured at neutral pH. With the goal of testing this finding, the authors selected a new cell lineage, inhibited these transcription factors and exposed the cells to the acidic pH. The authors observed that cells in the acidic medium once again increased the expression of Oct4, Nanog, and Olig2. It was also observed a massive decrease in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the acidic group, suggesting that tumor acidity may facilitate preservation of tumor stem cells, preventing terminal differentiation.

Based on these reports, it is possible to infer that acidosis can both induce a cancer stem cell phenotype and lead to epithelial-mesenchymal transition, thus promoting tumor cells' ability to invade tissues.

2. Extracellular matrix degradation

It is believed that acidity may influence the tumor invasion process via the diffusion of positive hydrogen ions into the extracellular matrix, causing connective tissue remodeling (33). Estrella et al. (23) measured tumor pH in animals and reported that, in areas with normal or near-normal pH, no invasion was observed, whereas acidic areas showed a higher degree of local invasion. Also, in order to test the hypothesis that pH would mediate tumor invasion, the authors treated animals with sodium bicarbonate and found that pH neutralization decreased tumor growth and local invasion. The acidity can promote tumor invasion and extracellular matrix degradation (ECM), via the release, production, and/or activation of matrix proteolytic enzymes (23, 34). Studies have shown an increase of proteases in acidic environments, leading to a higher degree of collagen degradation (23, 35, 28).

Cancer Investigation

Proteins involved in tissue remodeling, e.g. metalloproteinases (MMPs), are known to play a crucial role in tumor cell invasion. The activation of MMPs is triggered by the urokinase plasminogen activator (u-PA), which is responsible for converting plasminogen in plasmin. Plasmin will start the fibrinolysis process and activate MMPs (36). When exposed to an acidic environment, the expression NF- κ B increases, as well as the MMPs and MMPs activator enzymes (cathepsins and urokinase) (34, 37). NF- κ B plays an important role activating one of the main extracellular proteases, MMP9 (38, 39). Peppicelli et al. (28) cultured melanoma cell lineages exposed to acidic pH (6.7) and observed increased expression of MMP9.

Cysteine cathepsins, such as cathepsins B, are part of a group of proteases that are synthesized in the endoplasmic reticulum and perform their function in the lysosome under acidic pH. These enzymes may be involved in the stages of cancer initiation, promotion, progression, and metastasis (37). They are known to be overexpressed and upregulated in different types of cancer and to be implicated in tumor invasion processes via collagen degradation and consequently extracellular matrix degradation (37,40). In acidic tumor environments, cathepsin B shows increased activity levels when compared with neutral environments, increasing extracellular matrix degradation and consequently the risk of metastasis (41,42). Rothberg et al. (42) analyzed cathepsin B activity in breast and colon cancer cells at pH 6.8 and found that overexpression of the enzyme was induced and it was directly associated with degradation of basement membrane type IV collagen. Other authors have already demonstrated that cathepsin B could also be related to an

increased release of MMPs (especially types 2 and 9), to a higher risk of invasion and to chemoresistance (Figure 2) (40,42).

Taking into consideration the important role of the functional activity of proteolytic enzymes in tumor invasion, the findings here summarized suggest that the acidity present in the tumor microenvironment may lead to higher degradation of the stroma, increased rates of cell invasion and consequently higher risk of metastasis (43, 34).

3. Reactive Oxygen Species (ROS) production and NF- κ B activation

It is known that, when ROS are imbalanced, changes in cell metabolism and in tumor behavior may occur. The literature reports a significant increase in ROS production in cells exposed to an acidic tumor microenvironment, and shows that these molecules may be involved in tumor invasion processes (44, 45). Gupta et al. (45) observed increased ROS production in acidic conditions and showed that treating malignant breast cancer cells with ROS inhibitors reduced tumor invasion. The authors suggested a signaling pathway to explain how acidosis promotes invasiveness of malignant breast cancer cells. Following exposure to an acidic medium, the authors detected large amounts of phosphorylated NF- κ B inside the nucleus, i.e., in an active form. It is known that NF- κ B is a transcription factor related to the EMT and a cancer stem cell phenotype (45, 46). They also observed inactivation of phosphatase and tensin homolog (PTEN), a tumor suppressor gene that regulates the AKT signaling pathway and may be inactivated by the presence of ROS. Therefore, the authors demonstrated that tumor acidity will increase ROS production. As a result, the PTEN gene will be inactivated and will not regulate the AKT signaling

Cancer Investigation

pathway. PTEN acts dephosphorylating PIP3 to PIP2, inhibiting AKT's ability to bind to the membrane and decreasing its activity. The latter, in turn, will be available within the cell and will activate NF- κ B. Finally, because this nuclear transcription factor is involved in several cellular processes of carcinogenesis (47), it could be related to a stronger invasive potential (Figure 3). Peppicelli et al. (28) also found a higher levels expression of NF- κ B in cells exposed to tumor acidity and a possible relationship with higher invasive potential. The relationship between NF- κ B/tumor acidity and cell migration has been little explored. However, some studies have suggested that this transcription factor is implicated in migration processes (48, 49).

NF- κ B is also related to the activation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) (46,47), which plays an important role in tumor angiogenesis (50). The interaction between VEGF and the tumor microenvironment is known to possibly affect the functioning of immune cells, tumor cells, and stromal fibroblasts, regardless of angiogenesis activation, thus promoting tumor invasion and progression (50,51). Moreover, VEGF expression can contribute to undifferentiation, resulting in the acquisition of an EMT cell phenotype and possibly leading to an increase in migration and invasion rates (50,52). Studies have shown increased VEGF expression in tumor cells in the presence of acidosis (46,53,54). Therefore, an acidic microenvironment may induce increased VEGF expression, not only promoting angiogenesis but also increasing the chances of tumor invasion and progression (Figure 3).

The involvement of ROS and NF- κ B in the pathogenesis of cancer is well established. The findings here discussed show that the role of these factors is maximized by exposure to acidic pH.

Cancer Investigation

4. Effects on cell motility

An important aspect to be explored within the scope of tumor invasion is the speed of cell migration. It is interesting to note that, under acidic stimulus, cells considered to be normal migrate in different ways, depending on their origin. Fibroblasts, for example, when exposed to an acidic medium, tend not to respond (44). Riemann et al. (44) have shown that endothelial cells (53) and vascular smooth muscle cells tend to decrease their migratory potential. Conversely, osteoclasts tend to increase their motility (44, 55). In general, carcinoma cell lineages, when exposed to acidic pH, increase their migratory potential when compared with cells cultured at neutral pH (44). This suggests that tumor acidity may lead to greater cell motility and thus influence tumor cell invasion and metastasis processes.

Different factors involved in carcinogenesis can influence a cell's ability to migrate and invade. This combination of factors causes major changes to the cell cytoskeleton, in the sense of facilitating movement. Cytoskeleton movement starts with cell polarization oriented toward the direction of migration, followed by emission of actin-rich protrusion, called invadopodia, and then by extension of the lamellipodium, which adheres to the substrate and drives the cell body forward, generating movement (56, 57, 58, 59).

The anhydrase carbonic IX (CA IX) expression is high in solid tumors with poor perfusion and acidic pH, and its presence has been associated with poor prognosis. Migration and invasion abilities are also related to overexpression of this metalloenzyme. Its role during the migration process may be related to one of its functions, namely, dissociation of carbonic acid into bicarbonate and hydrogen ions: bicarbonate is transported into the cell and alkalizes pH,

Cancer Investigation

whereas hydrogen ions remain outside the cell and contribute to cell acidification (Figure 1) (20,21,60,61). During migration, intracellular pH in the lamellipodium – front part of the cell – becomes more alkaline, whereas extracellular pH becomes more acidic. The reverse takes place at the rear portion of the cell: intracellular pH decreases and extracellular pH increases. During cell migration, as a result of hepatic growth factor (HGF) upregulation, CA IX is redistributed into the lamellipodium, where it will facilitate cell motility by dissociating carbon dioxide and releasing hydrogen ions and bicarbonate. Bicarbonate, when present in the extracellular medium, depends on specific transporters to be sent into the cell and thus increase the pH at its central part and facilitate movement (20, 21, 60, 61). Svastova et al. (20) observed the interaction between CA IX and bicarbonate transporters – NaHCO₃ cotransporter (NBCe1) and anion exchanger 2 (AE2). Moreover, Parks e Poyssegur (62) showed that inhibition of the bicarbonate cotransporter (SLC4A4) had a significant effect in terms of decreasing cell migration.

Another carrier involved in pH regulation and influencing the cell migration process is Na⁺ / H⁺ exchanger 1 (NHE1). NHE1 is a transmembrane protein that plays an important role in the maintenance of the inverted pH gradient of tumor cells and which has now been related to protease activation, extracellular matrix degradation and cellular motility. As mentioned earlier, for migration to occur, it is necessary to increase the acidity at the cell invasion frontier, this acidity will activate proteases and initiate extracellular matrix degradation. The literature showed that during migration there is an increased co-localization of NHE1 in invadopodia, suggesting that this protein is essential to release protons into the extracellular medium, acidifying it and activating proteases to ECM and

Cancer Investigation

thus facilitating cell motility. The activation of NHE1 in lamellipodium can be regulated by three different factors: activation of phosphoinositide-3-kinase (PIK3); activation of ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); or by the signaling pathway PKA (protein kinase A) -RHOA (ras-homologue protein family, member A) -ROCK1 (is rho-associated coiled-coil-containing protein Kinase 1) -MAPK14 (mitogen-activated protein kinase 14). NHE1 activation is also related to the activation of the CD44 hyaluronic acid receptor, which has been detected in a greater amount in the invadopodia. NHE1 inhibition and of molecules that are related to its activity, resulted in a significant decrease in extracellular matrix degradation and potential of invasion and migration (63-65).

Whereas, the understanding of molecular mechanisms involved in cell migration is still limited, numerous molecules and signaling pathways are currently known to be involved in the migration process. For instance, myosin plays an important role in the cytoskeleton during muscle contraction, as well in cell motility (66). ERK1/2 and p38 are two protein kinases that are known to participate in the carcinogenesis process, including the cell migration process, due to their ability to phosphorylate the myosin light chain. As demonstrated by Riemann et al. (44), at acidic pH, the motility of prostate cancer cells increased concomitantly with overexpression of ERK1/2 and p38. Conversely, when ERK1/2 and p38 were inhibited, motility decreased, but only in the group exposed to neutral pH. These findings suggest that, in the presence of an acidic stimulus, these protein kinases do not influence migration. Therefore, although ERK1/2 and p38 are important for increased migration, it is not through these proteins that acidity results in increased motility. According to the authors, this finding is in line with other studies, suggesting that the signaling pathways

Cancer Investigation

related to these protein kinases may be differently activated in different types of cancer and in different conditions.

The findings above showed that cell motility is an inherent feature of tumor progression. Extracellular acidity, in turn, seems to potentiate this process. Further studies including molecular analyses are necessary to investigate the pathways responsible to explain the correlation between acidity and cell motility.

5. Future perspectives: reversing tumor pH

We have shown that *in vivo* and *in vitro* studies support the hypothesis that acidosis may mediate tumor migration and invasion mechanisms and, consequently, influence distant metastatic processes. In general, in such studies, cancer cells are cultured in neutral and acidic environments and then implanted in immunocompromised animals for the analysis of tumor growth potential and metastasis development. Animals receiving cells cultured in acidic pH tend to develop a higher number of distant metastases (23,44,67,68). Moreover, *in vivo* studies have shown that tumor growth may be directly related with pH: in the presence of acidic pH, tumor increases in size; when treated with NaHCO_3 to neutralize extracellular pH, tumor growth decreases (23).

In addition to treatment with NaHCO_3 , other strategies have been proposed to reduce acidosis in solid tumors, with a main focus on inhibiting molecules involved in the pathogenesis of this process, e.g., protein kinases, CA IX, and reactive oxygen species (ROS), among others (45, 69). Inhibition of CA IX forces the cell to not perform homeostatic acid/base balancing and result in cell death. The CA IX inhibitor agent is named Indisulam, it has already

Cancer Investigation

shown significant anticancer activity and its effects are currently being tested in clinical trials (70).

Since high glycolysis rates and lactic fermentation are among the main causes of extracellular acidification, the investment in chemotherapeutic drugs capable of inhibiting these catabolic pathways has become a promising target in the development of new cancer therapies. There are current clinical trials of drugs targeting molecules that are directly involved in the catabolic process of glucose, such as glucose transporters (GLUT1), phosphofructokinase 2 (PFKFB3), hexokinases and pyruvate protein kinase M2 (PKM2) isorform. Drugs that act directly on lactate transporters block the uptake of lactate (MCT1-monocarboxylate transporter1) and inhibit lactate secretion (MCT4-monocarboxylate transporter 4), however, there are no clinical trials yet to assess the clinical potential of these drugs (70).

As adjunctive therapy, it is important to mention the role of proton pump inhibitors that prevent the passage of protons from the cytosol to the extracellular milieu, which would reduce the acidity of the tumor microenvironment. The advantage of using the proton pump inhibitors is that some of their pharmaceutical formulas are already in use for other therapeutic purposes, e.g. omeprazoles, and their toxicity is specific for cancer cells (71-73). *In vitro* and clinical studies have shown that the use of proton pump inhibitors reduced invasion and metastasis potentials, as well as, increased effect of immunotherapy, drug uptake and sensitivity to chemotherapy (71, 72, 74).

It is presumed, then, that the reversal of molecular mechanisms involved in acidification of the tumor microenvironment may result in the development of

Cancer Investigation

adjuvant therapies for cancer. However, there is a need for further research on this topic.

Final considerations

Investigation of the mechanisms related to tumor invasion and metastasis induced by acidosis, as well as of the pathways and molecules that influence these processes, has proven to be essential. The study of tumor acidosis has contributed to improve our knowledge of energy metabolism in tumor cells, cancer pathogenesis, tumor prognosis and the development of new therapies. The present review article is an attempt to shed light on the reprogramming that takes place inside the cell as a result of acidity, exposing the possible effects that make the cell able to adapt and create resistance mechanisms. Such acquired resistance results in more aggressive cancer cells, i.e., cells with higher ability to migrate, invade, and develop metastasis.

Declaration of Interest: The authors report no declarations of interest.

This work was supported by CNPQ (National Counsel of Technological and Scientific Development, Brazil), grant number 455496/2014-5.

REFERENCES

1. Adjei IM, Blanka S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. *J Funct Biomater* 2015;6(1):81-103
2. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 2010;17(2):135-47.
3. Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51(2):349-53.
4. Smallbone K, Gavaghan DJ, Gatenby RA, Maini PK. The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *J Theor Biol.* 2005(4);235:476-84.
5. Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(4):411-25.
6. 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* 2009;69(6):2677-84.
7. Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008;18(5):330-7.
8. Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* 2010;51(8):1167-70.

Cancer Investigation

9. Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ.* 2011;18(5):829-40.
10. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):89.
11. Zhou W, Liotta LA, Petricoin EF. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. *Cancer Lett* 2015;356:176-83.
12. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002;16(4):430-50.
13. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol.* 2013;4:354.
14. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4(11):891-9. doi:10.1038/nrc1478.
15. Gillies RJ, Gatenby RA. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* 2007;39(3):251-7.
16. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956; 24:309-1.
17. Peppicelli S, Toti A, Giannoni E, Bianchini F, Margheri F, Del Rosso M et al. Metformin is also effective on lactic acidosis-exposed melanoma cells switched to oxidative phosphorylation. *Cell Cycle* 2016;15(14):1908-18.
18. Huang L, Wu RL, Xu AM. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Am J Transl Res* 2015;7(11):2141-58.
19. Rashin SJ, Cardone RA, Harguindey S. Na⁺-H⁺ exchanger, pH regulation and cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2013; 8(1):85-99.

Cancer Investigation

20. Svastova E, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX: a hypoxia-controlled "catalyst" of cell migration. *Cell Adh Migr* 2013;7(2):226-31. doi:10.4161/cam.23257
21. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front Physiol* 2014;4:400.
22. Smallbone K, Maini PK, Gatenby RA. Episodic, transient systemic acidosis delays evolution of the malignant phenotype: Possible mechanism for cancer prevention by increased physical activity. *Biol Direct* 2010;5:22.
23. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornell HH, Ibrahim-Hashim A et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73(5):1524-35.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
25. Peppicelli S, Bianchini F, Calorini L. Metabolic reprogramming as a continuous changing behavior of tumor cells. *Tumour Biol* 2015;36(8):5759-62.
26. Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2005;118:4325-6.
27. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012;48(1):1-9.
28. Peppicelli S, Bianchini F, Torre E, Calorini L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2014;31(4):423-33.

Cancer Investigation

29. Cammarota F, Laukkanen MO. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Stromal Evolution and Cancer Progression. *Stem Cells Int* 2016;2016:4824573.
30. Choi H, Sheng J, Gao D, Li F, Durrans A, Ryu S et al. Transcriptome analysis of individual stromal cell populations identifies stroma-tumor crosstalk in mouse lung cancer model. *Cell Rep* 2015;10(7):1187-201.
31. Isella C, Terrasi A, Bellomo SE, Petti C, Galatola G, Muratore A et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet* 2015;47(4):312-9.
32. Peppicelli S, Bianchini F, Calorini L. Extracellular acidity, a "reappreciated" trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33(2-3):823-32
33. Gatenby RA, Gawlinski ET. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res* 1996;56(24):5745-53.
34. Sounni NE, Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie* 2005;87(3-4):329-42.
35. Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;14(2):176-86.
36. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 1999;82(2):259-70.
37. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl* 2014;8(5-6):427-37.

38. Shihab PK, Al-Roub A, Al-Ghanim M, Al-Mass A, Behbehani K, Ahmad R. TLR2 and AP-1/NF-kappaB are involved in the regulation of MMP-9 elicited by heat killed *Listeria monocytogenes* in human monocytic THP-1 cells. *J Inflamm (Lond)* 2015;12:32.
39. Li YF, Xu XB, Chen XH, Wei G, He B, Wang JD. The nuclear factor-kappaB pathway is involved in matrix metalloproteinase-9 expression in RU486-induced endometrium breakdown in mice. *Hum Reprod* 2012;27(7):2096-106.
40. Steffan JJ, Snider JL, Skalli O, Welbourne T, Cardelli JA. Na⁺/H⁺ exchangers and RhoA regulate acidic extracellular pH-induced lysosome trafficking in prostate cancer cells. *Traffic* 2009;10(6):737-53.
41. Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Dosesco J, Sloane BF et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res* 2009;69(6):2260-8.
42. Rothberg JM, Sameni M, Moin K, Sloane BF. Live-cell imaging of tumor proteolysis: impact of cellular and non-cellular microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824(1):123-32.
43. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
44. Riemann A, Schneider B, Gundel D, Stock C, Thews O, Gekle M. Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. *Pflugers Arch* 2014;466(11):2127-38.
45. Gupta SC, Singh R, Pochampally R, Watabe K, Mo YY. Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-κB pathway. *Oncotarget* 2014;5(23):12070-82..

Cancer Investigation

46. Peppicelli S, Bianchini F, Contena C, Tombaccini D, Galorini L. Acidic pH via NF-kappaB favours VEGF-C expression in human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2013;30(6):957-67.
47. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* 2011;30(14):1615-30.
48. Penzo M, Habel DM, Ramadass M, Kew RR, Marcu KB. Cell migration to CXCL12 requires simultaneous IKKalpha and IKKbeta-dependent NF-kappaB signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(9):1796-804.
49. Papanastasiou AD, Sirinian C, Kalofonos HP. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res.*2012;14(4):R112.
50. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013;13(12):871-82.
51. Hansen W, Hutzler M, Abel S, Alter C, Stockmann C, Kliche S et al. Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* 2012;209(11):2001-16.
52. Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell* 2010;17(4):319-32.
53. D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic

fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* 2000;86(3):312-8.

54. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* 2001;61(16):6020-4.

55. Ahn H, Kim JM, Lee K, Kim H, Jeong D. Extracellular acidosis accelerates bone resorption by enhancing osteoclast survival, adhesion, and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418(1):144-8.

56. Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 2009;26(4):273-87. doi:10.1007/s10585-008-9174-2.

57. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 2010;8(5):629-42.

58. Linder S, Wiesner C, Himmel M. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:185-211.

59. Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E et al. NaV1.5 Na(+) channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* 2013;126:4835-42.

60. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 1999;80(11):1697-707.

61. Stock C, Mueller M, Kraehling H, Mally S, Noel J, Eder C et al. pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20(5):679-86.

Cancer Investigation

62. Parks SK, Pouyssegur J. The $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Co-Transporter SLC4A4 Plays a Role in Growth and Migration of Colon and Breast Cancer Cells. *J Cell Physiol* 2015;230(8):1954-63.
63. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na^+/H^+ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005;5(10):786-95.
64. Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, Busco G, Guerra L, Paradiso A et al. Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 2005;16(7):3117-27.
65. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na^+/H^+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2004;279(26):26991-7007.
66. Callan-Jones AC, Voituriez R. Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories. *Curr Opin Cell Biol* 2016;38:12-7.
67. Ibrahim-Hashim A, Cornell HH, Abrahams D, Lloyd M, Bui M, Gillies RJ et al. Systemic buffers inhibit carcinogenesis in TRAMP mice. *J Urol* 2012;188(2):624-31.
68. Ribeiro MD, Silva AS, Bailey KM, Kumar NB, Sellers TA, Gatenby RA et al. Buffer Therapy for Cancer. *J Nutr Food Sci* 2012;2:6.
69. Fais S, Venturi G, Gatenby B. Microenvironmental acidosis in carcinogenesis and metastases: new strategies in prevention and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33(4):1095-108.

Cancer Investigation

70. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pages M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 2016.
71. Luciani F, Spada M, Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(22):1702-13.
72. Yeo M, Kim DK, Kim YB, Oh TY, Lee JE, Cho SW et al. Selective induction of apoptosis with proton pump inhibitor in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8687-96.
73. Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M et al. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. *PLoS One* 2014;9(2):e88193.
74. Wang BY, Zhang J, Wang JL, Sun S, Wang ZH, Wang LP et al. Intermittent high dose proton pump inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy in metastatic breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:85.

Cancer Investigation

Figure captions

Figure 1. This figure shows the energetic metabolism in normal and tumor cells. The left side of the figure demonstrates a normal cell under normoxic conditions, where the cell carries out its output energy through oxidative phosphorylation. The right side shows the tumor energy metabolism through lactic fermentation, even under normoxic situation (Warburg effect). In the extracellular compartment, there is an increased secretion of hydrogen ions and lactate turning the pH acidic. In order to obtain enough energy through lactic fermentation cells increase consumption of glucose achieved by increased expression of glucose transporters 1 (GLUT1), resulting in the acidification of the extracellular environment. MCT4 transporter is responsible to export lactate, whereas NHE1 export hydrogen ions. Moreover, there is an increased expression of carbonic anhydrase IX, which induces catalysis of carbon dioxide and generates NaHCO_3 and hydrogen ions as final products. Bicarbonate is sent into the cell via its NBC1/2 transporter, and hydrogen ions acidify the microenvironment.

Figure 2. The left side of the figure shows cells under neutral pH, presence of vascularization with intact extracellular matrix and expression of epithelial markers (E-cadherin). The right side of the figure shows tumor cells in an acidic environment resulting in phenotype alteration, with increase expression of stemness-related transcription factors (Snail, Oct-4). Under acidic conditions, cells show a fusiform morphology, high expression of EMT markers (Vimentin and N-cadherin) and increased release of metalloproteinases and cathepsin B. The extracellular matrix is degraded and disorganized.

Cancer Investigation

Figure 3. The acidic extracellular pH induces the formation of reactive oxygen species, which in turn inactivates the PTEN gene. Inactivation of the PTEN will prevent the dephosphorylation of PIP3 to PIP2, and consequently will prevent the inactivation of AKT. In turn, AKT may contribute to increased activation of NF- κ B, by inducing phosphorylation and subsequent degradation of inhibitor of κ B (I κ B). Activated NF- κ B, will regulate the gene expression of VEGF. The consequence of the deregulation in these signaling pathways is increased angiogenesis, migration and invasion.

Peer Review Only

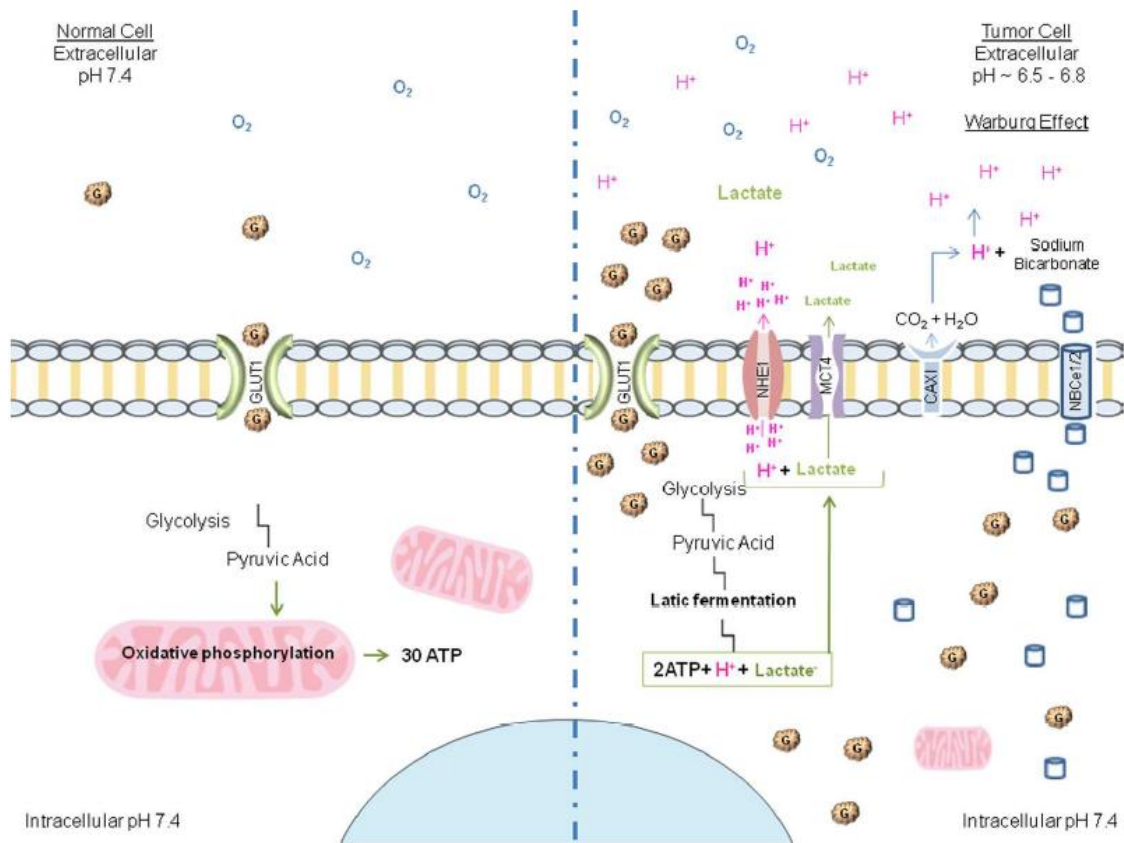


Figure1. This figure shows the energetic metabolism in normal and tumor cells. The left side of the figure demonstrates a normal cell under normoxic conditions, where the cell carries out its output energy through oxidative phosphorylation. The right side shows the tumor energy metabolism through lactic fermentation, even under normoxic situation (Warburg effect). In the extracellular compartment, there is an increased secretion of hydrogen ions and lactate turning the pH acidic. In order to obtain enough energy through lactic fermentation cells increase consumption of glucose achieved by increased expression of glucose transporters 1 (GLUT1), resulting in the acidification of the extracellular environment. MCT4 transporter is responsible to export lactate, whereas NHE1 export hydrogen ions. Moreover, there is an increased expression of carbonic anhydrase IX, which induces catalysis of carbon dioxide and generates NaHCO_3 and hydrogen ions as final products. Bicarbonate is sent into the cell via its NBC1/2 transporter, and hydrogen ions acidify the microenvironment.

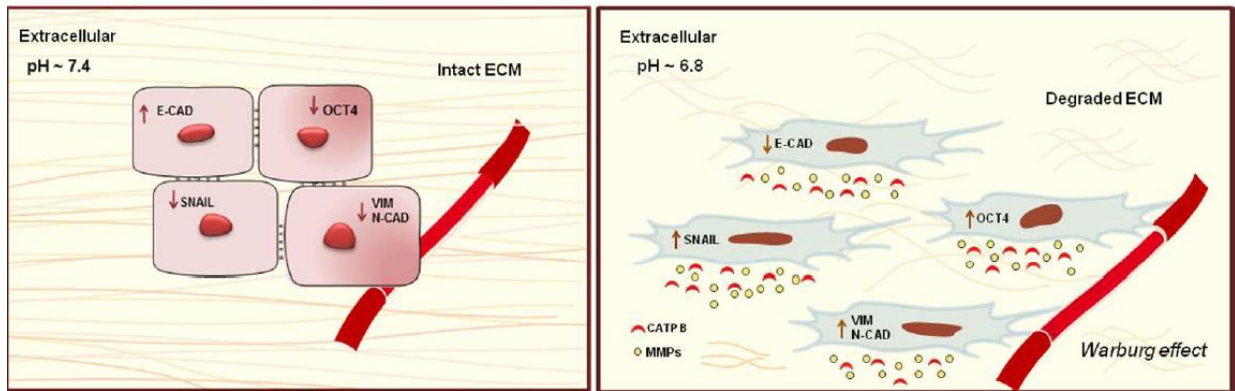


Figure 2: The left side of the figure shows cells under neutral pH, presence of vascularization with intact extracellular matrix and expression of epithelial markers (E-cadherin). The right side of the figure shows tumor cells in an acidic environment resulting in phenotype alteration, with increase expression of stemness-related transcription factors (Snail, Oct-4). Under acidic conditions, cells show a fusiform morphology, high expression of EMT markers (Vimentin and N-cadherin) and increased release of metalloproteinases and cathepsin B. The extracellular matrix is degraded and disorganized

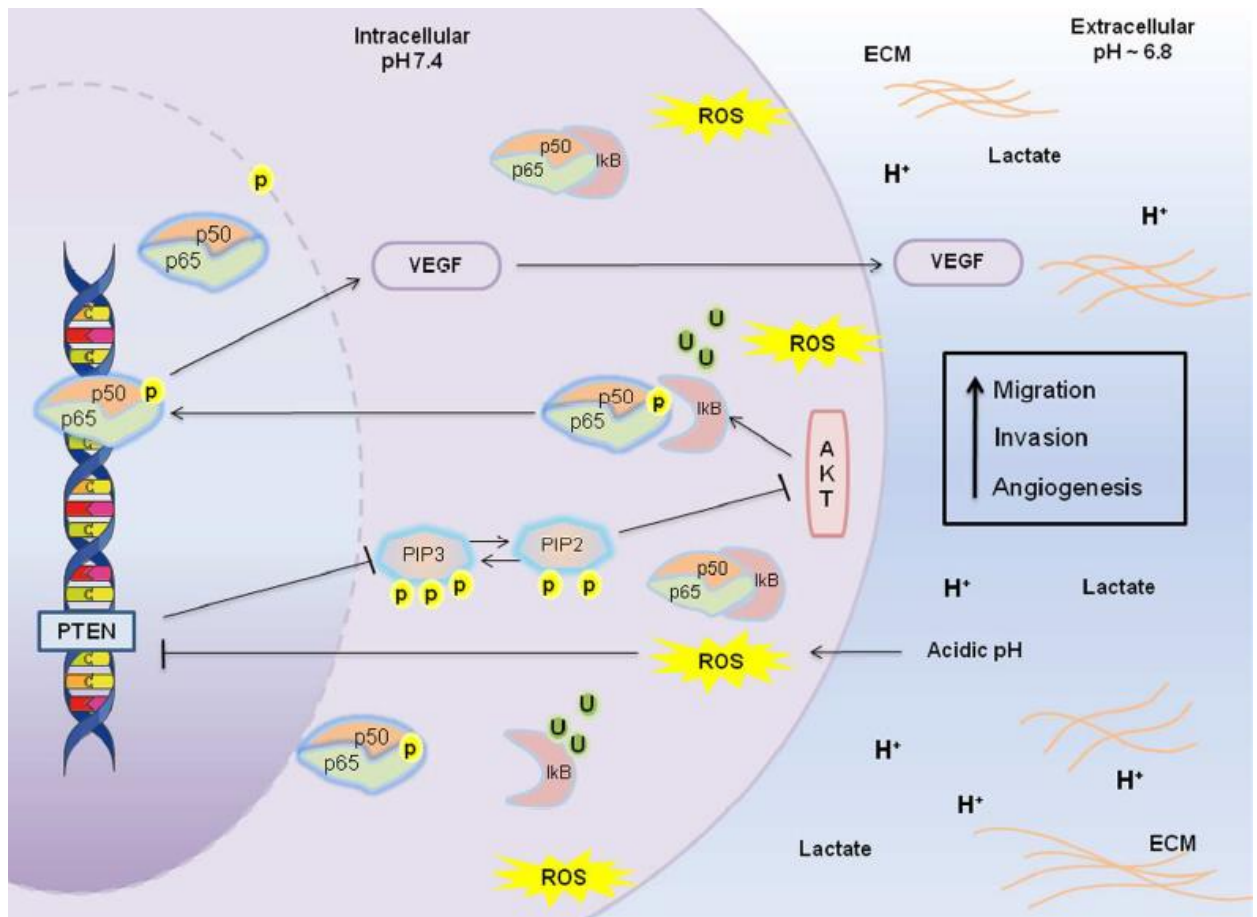


Figure 3. The acidic extracellular pH induces the formation of reactive oxygen species, which in turn inactivates the PTEN gene. Inactivation of the PTEN will prevent the dephosphorylation of PIP3 to PIP2, and consequently will prevent the inactivation of AKT. In turn, AKT may contribute to increased activation of NFκB, by inducing phosphorylation and subsequent degradation of inhibitor of κB (IκB). Activated NF-κB, will regulate the gene expression of VEGF. The consequence of the deregulation in these signaling pathways is increased angiogenesis, migration and invasion.

A influência da acidez extracelular na resistência ao tratamento anti-tumoral

Periódico para submissão: Oncology

Fator de impacto: 2.152

RESUMO

Introdução: O estudo dos efeitos das alterações metabólicas do microambiente tumoral tem se destacado nas últimas décadas devido a sua complexa influência na progressão do câncer. A acidez extracelular é uma consequência das alterações metabólicas que surgem no câncer e atua na seleção de células cancerígenas com potenciais mais agressivos e mais resistentes a quimioterápicos. Contudo, não é clara a relação entre esses dois eventos.

Objetivo: Realizar uma revisão de literatura com intuito de elucidar os mecanismos biológicos do papel da acidez extracelular na resistência a quimioterápicos

Métodos: A pesquisa foi realizada na base de dados PUBMED de acordo com as palavras-chave “cancer” e “acidosis” ou “acidic” e “chemoresistance” ou “drug resistance”. Somente foram inclusos artigos em língua inglesa.

Resultados: Foram encontrados 209 artigos. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 12 artigos foram selecionados.

Conclusões: A acidez do microambiente tumoral pode desencadear a resistência através de diferentes mecanismos: transportadores de efluxo de drogas; inibição da bomba de prótons; indução da Unfolded Protein Response (UPR); indução de autofagia.

Palavras-chave: microambiente tumoral; acidose; resistência a quimioterápicos.

1. Introdução

O pH ácido extracelular é uma característica marcante do microambiente de tumores sólidos [1–8]. Acredita-se que a acidez é gerada por baixa perfusão sanguínea, hipóxia ou reprogramação do metabolismo energético celular. Todas essas situações levam a célula tumoral a aumentar as taxas de glicólise e fermentação láctica, resultando numa maior produção de íons de hidrogênio e lactato, que serão encaminhados para fora da célula e, assim, acidificarão o meio extracelular [1,9]. A acidose extracelular é capaz de causar uma seleção de células no microambiente tumoral, levando à apoptose as células menos resistentes [2,4]. A literatura demonstra que as células selecionadas nesse tipo de microambiente exibem características de células tronco tumorais, possuem maiores potenciais de invasão e metástase e, influenciam num fenômeno de extrema importância clínica: a falha ao tratamento quimioterápico [1,2,4,10–13].

A resistência a quimioterápicos no tratamento do câncer pode ser classificada como intrínseca (fatores pré-existentes no tumor que tornam as células com menor potencial de sensibilidade à droga) ou adquirida (o tumor torna-se resistente durante a terapia) [14]. Dentre os principais mecanismos biológicos já conhecidos que influenciam o processo de resistência a quimioterápicos, destacam-se: a capacidade de reparo de DNA; aumento dos níveis de efluxo de drogas; maior potencial de inativação das drogas e de proteínas pró-apoptóticas; alterações no metabolismo; mutações nos alvos celulares das drogas; entre outros [14,15]. Contudo, a heterogeneidade celular intra-tumoral e as alterações metabólicas do microambiente tumoral atuam tanto na resistência intrínseca quanto na adquirida, desempenhando, assim, papel fundamental no desencadeamento dos mecanismos biológicos que levam à diminuição da sensibilidade das células cancerígenas às drogas anticâncer.

A literatura demonstra que, quanto mais tardio é o estágio do tumor, maior será o metabolismo da glicose, a acidose extracelular e a resistência a quimioterápicos [16]. No

entanto, os mecanismos biológicos que fazem com que a acidez extracelular induza a quimioresistência necessitam de maior compreensão. O objetivo do presente estudo é, portanto, realizar uma revisão sistemática da literatura a fim de elucidar os mecanismos biológicos que levam a resistência quimioterápica oriunda da acidose.

2. Metodologia

2.1. Estratégias de Busca

A pesquisa foi realizada na base de dados PUBMED no mês de julho de 2016. Buscou identificar todos os estudos que continham as seguintes palavras-chave: “cancer” e “acidosis” ou “acidic” e “chemoresistance” ou “drug resistance”. Estudos duplicados foram identificados e descartados. Na primeira etapa, os artigos foram selecionados pela leitura do título e do resumo. No segundo passo do processo de triagem, os artigos foram submetidos aos critérios de inclusão e exclusão e revisados por três autores. Os artigos que geraram algum desacordo foram revisados novamente até chegar a um consenso. Além disso, foi realizada uma busca manual na lista de referências dos artigos selecionados.

2.2. Critérios de Inclusão e exclusão

Estudos que avaliaram os efeitos da acidificação do microambiente tumoral no tratamento quimioterápico em estudos *in vitro* e *in vivo* foram incluídos. Revisões de literatura, cartas ao editor ou artigos que não estavam na língua inglesa foram excluídos.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, todos os estudos incluídos foram submetidos à avaliação metodológica e extração de dados por três revisores que examinaram os estudos de forma independente.

3. Resultados e discussão

A busca na base de dados resultou num total de 209 artigos. Após 8 referências duplicadas serem descartadas, foram analisados 201 artigos através da leitura sequencial de títulos, resumos e artigos completos. A descrição dos resultados está descrita na Figura 1.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão propostos na metodologia, o número de artigos selecionados foi 11. Além destes, um artigo presente na lista de referências dos artigos selecionados foi incluído [17], totalizando 12 artigos finais (Tabelas 1 e 2), os quais foram categorizados nos seguintes tópicos:

1. Transportadores de efluxo de drogas (5 artigos);
2. Inibição das bombas de prótons (4 artigos);
3. Indução de UPR (2 artigos);
4. Indução de autofagia (1 artigo).

A seguir serão discutidos os artigos encontrados de acordo com os tópicos em que eles foram classificados.

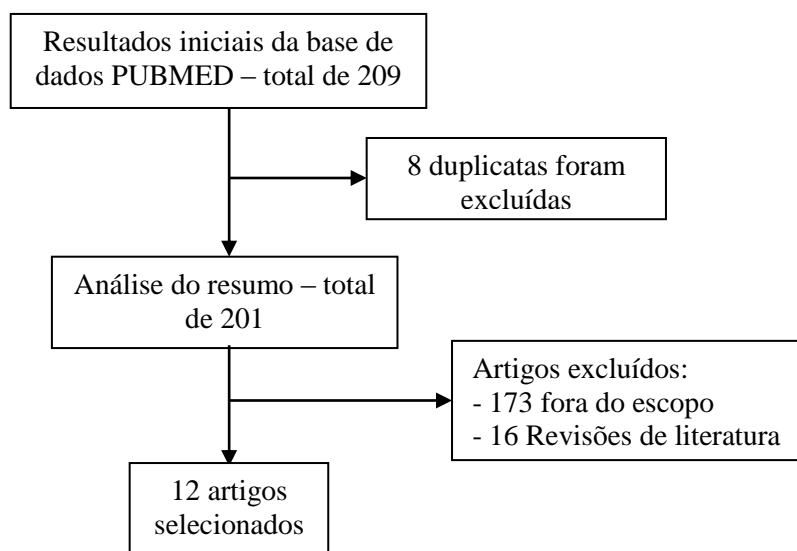


Figura1: Fluxograma demonstrando a busca de dados e a seleção dos artigos desta revisão.

3.1. Transportadores do efluxo de drogas

A absorção intracelular do quimioterápico, além de depender do pH e de fatores químicos da droga, necessita fazer o uso de transportadores para atravessar a membrana plasmática. A célula pode desenvolver um mecanismo anti-quimioterápico ao expulsar a droga do seu interior, realizando o fenômeno chamado de efluxo de drogas. Para que isso ocorra, faz-se necessário a ativação de glicoproteínas transportadoras de membrana. As proteínas ABC (do inglês *ATP-Binding Cassette*) representam o principal grupo de transportadores de efluxo de drogas [18,19].

Os transportadores ABC são uma grande família de proteínas presentes em membranas plasmáticas e compartimentos intracelulares, tais como as mitocôndrias, peroxissomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e lisossomos. O genoma humano contém 48 genes ABC, que são classificados em sete subfamílias distintas - designadas por ABCA-ABCG [20]. Essas proteínas desempenham importantes papéis fisiológicos, transportando compostos hidrofóbicos de uma grande variedade de substratos incluindo peptídeos, lipídeos e agentes quimioterápicos, utilizando a energia da hidrólise de ATP contra seus gradientes de concentração [20–22]. Cheng e To (2012) avaliaram o papel do transportador ABCG2 em culturas de células de carcinoma de cólon humano (HCT-116, S1 e sua sub-linhagem resistente S1M1-80) expostas a baixo pH. Demonstraram que, ao diminuir o pH extracelular, houve um aumento da regulação dos níveis de transcrição de ABCG2 e da resistência aos quimioterápicos cisplatina e mitoxatoma. No entanto, nesse artigo, o papel dos transportadores ABCG2 na resistência a quimioterápicos foi superficialmente investigado por não ser o objetivo principal do estudo [18].

Há aproximadamente quinze proteínas ABC envolvidas na resistência multidrogas (MDR), tais como Pgp, MRP1 e BCRP [23]. A Glicoproteína-P (Pgp) está presente na

membrana celular e possui importante na eliminação de toxinas do corpo, sendo estrategicamente explorada como um potencial tratamento em doenças nas quais há acúmulo excessivo de proteínas/proteínas mal dobradas, como é o caso do Alzheimer [24]. Trata-se de uma glicoproteína produto do gene MDR1 (Multiple Drug Resistance 1), também conhecida como ABCB1, ou seja, um dos 48 transportadores ABC. Em células cancerígenas, induz à resistência multidrogas, agindo como uma bomba de efluxo e transportando os quimioterápicos para fora da célula [25].

Um grupo de pesquisadores tem trabalhado com o papel da Pgp na resistência a quimioterápicos induzida pela acidez [17,26–28] (Tabela 1). O primeiro artigo do grupo, publicado no ano de 2006, demonstrou que, ao expor a um microambiente ácido a sub-linhagem de câncer de próstata de rato (AT1) por um período de 3 a 6 horas, a atividade relativa da Pgp duplicou, e a citotoxicidade para os quimioterápicos Daunorrubicina (DAU) e Cisplatina (CIS) foram reduzidos. Na análise quantitativa da morte celular, observou-se que, com a CIS, houve uma redução na atividade de caspase 3, porém, a morte celular não foi significativamente diferente das células incubadas com esta droga em diferentes pH, indicando que a citotoxicidade da CIS foi marginalmente afetada pelo ambiente ácido. No entanto, ao analisar a morte celular induzida pela DAU, percebeu-se que a mesma foi marcadamente reduzida pelo ambiente ácido. Ao inibir a Pgp com a droga Verapamil em condições ácidas, observou-se o aumento da atividade de caspase-3 somente para a DAU, quando comparada com o grupo tratado com DAU sem Verapamil. Verificou-se também que, em condições ácidas, o aumento da atividade de Pgp estava relacionado com a diminuição dos níveis intracelulares de cálcio e da Proteína Quinase C (PKC). A partir destes experimentos, os autores concluíram que a quimioresistência à droga DAU gerada pela acidose extracelular poderia ser resultado do aumento do efluxo de drogas (aumento de

Pgp), que, por sua vez, foi provocado pela diminuição da concentração de cálcio intracelular e da atividade da PKC [17].

No ano de 2008, o mesmo grupo investigou a cascata de ativação da Pgp na resistência a quimioterápicos gerados pela acidez, a partir da análise de proteínas que já tinham envolvimento comprovado com o mecanismo de resistência, as PKC e as Proteínas Ativadas por Mitógeno (MAP), p38 e ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1). Foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*, utilizando o mesmo tratamento e a mesma linhagem de células do estudo prévio. As análises *in vitro* demonstraram que, apesar da inibição da PKC provocar o aumento das Pgp no grupo tratado com meio neutro, no grupo ácido tratado com DAU e inibidor de PKC não houve diferença de expressão da Pgp. Assim, demonstraram que as PKC não interferem no mecanismo de resistência a quimioterápicos gerados pela acidez extracelular. Já a inibição conjunta de ERK1 e p38, resultou no restabelecimento da citotoxicidade da DAU. No entanto, ao verificar os níveis intracelulares dessas proteínas quinases, observou-se que apenas a p38 encontrava-se ativada. Os estudos *in vivo* confirmaram a análise intracelular da p38 e demonstraram que apenas a inibição dessa proteína é capaz de aumentar a morte celular em tumores ácidos. Disso concluiu-se que p38 possivelmente faz parte da ativação do mecanismo de resistência da Daunorrubina gerado pela acidez extracelular [26].

Em 2011, Thews et al. conduziram um estudo, para aprofundar e elucidar, *in vivo*, o papel da p38 e da ERK1/2 na quimioresistência provocada pela hipóxia e acidez extracelular na ativação de Pgp. Inicialmente, células da linhagem de câncer de próstata de rato (R3327-AT1) foram implantadas em camundongos para formação de tumor. Os animais receberam terapia acidificante por meio da combinação de hipóxia inalatória com injeção intravenosa de altas doses de glicose e aplicação de MIBG (um inibidor do complexo I da cadeia respiratória). Os níveis de oxigênio e o pH foram rigorosamente controlados. Em áreas de

tumores ácidos, foi observado um aumento da atividade da Pgp. Ao tratar os animais com DAU, verificou-se que a citotoxicidade desse quimioterápico diminuiu em aproximadamente 30% no grupo em que a acidez foi induzida, quando comparado com o grupo controle. Ao inibir a p38, percebeu-se uma restauração parcial da sensibilidade à droga. Porém, não houve diferença estatística na diminuição da quimioresistência entre os grupos analisados. Assim, concluímos que os achados *in vivo* confirmaram parcialmente os achados *in vitro* anteriores, em relação ao potencial de p38 na diminuição da quimioresistência da DAU gerada pela acidez [27].

Com intuito de analisar o papel da Pgp em relação a acidez extracelular e a resistência a diferentes quimioterápicos, Thews et al. (2014) realizaram outro estudo *in vitro e in vivo*, com a mesma linhagem celular dos estudos anteriores (R3327-AT1). Os resultados *in vitro* demonstram que a acidose extracelular não alterou os níveis de expressão da Pgp, mas reduziu a citotoxicidade de três drogas quimioterápicas – DAU, CIS e DOC. Ao tratar as células com o inibidor da Pgp (Verapamil), observaram um aumento da citotoxicidade apenas para DAU e DOC. Acredita-se que essa seletividade da ação da Pgp deve-se a sua afinidade por drogas hidrofóbicas, eletricamente neutras ou positivas, que agem como substrato da Pgp, como é o caso das drogas DAU e DOC. Os resultados *in vivo* confirmaram que a indução da acidez em animais levou a resistência apenas para as drogas DAU e DOC – para CIS novamente não houve alteração nos resultados. Assim, é possível supor que a acidez extracelular gera quimioresistência, a qual pode ser revertida com a inibição da Pgp quando houver indicação do uso das drogas DAU e DOC [28].

Todos os artigos abordados nesse tópico mostraram que a acidez extracelular no microambiente do tumor leva a célula tumoral a ativar uma maior quantidade de transportadores do tipo ABC1 e ABC2, resultando no aumento do efluxo de drogas e num genótipo de resistência a quimioterápicos.

3.2 Inibição da bomba de prótons

As bombas de prótons, como as (H⁺)-Vacuolar-ATPase (V-ATPases), são estruturas responsáveis pelo transporte de prótons contra o gradiente de concentração, impulsionada por ATP, com o objetivo de importar solutos, manter a composição iônica intracelular e balancear a pressão osmótica entre compartimentos intra e extracelulares. As V-ATPases são enzimas de multi-subunidades que podem estar presentes na membrana de organelas e na membrana plasmática da célula. As V-ATPases regulam o transporte de prótons, utilizando energia liberada pela hidrólise do ATP, tanto do citosol para o lúmen de vesículas intracelulares ácidas, quanto do citosol para o ambiente extracelular [29,30]. No câncer, ocorre um aumento da quantidade dessas bombas e é possível observar sua influência durante o fenômeno de gradiente inverso de pH – quando a célula tumoral torna o pH extracelular ácido e o pH intracelular neutro –, atuando com alta intensidade na captação e extrusão de prótons para garantir a homeostase ácido/base da célula [31].

No mecanismo de resistência a quimioterápicos, a criação do gradiente reverso do pH pode interferir no metabolismo das drogas, diminuindo a absorção e a retenção do medicamento dentro da célula. Isso pode acontecer devido a dependência que o mecanismo de absorção da droga possui do pH [31,32], como por exemplo: drogas consideradas ácidas fracas possuem afinidade por ambientes alcalinos para conseguir interagir com a membrana plasmática das células e penetrar no seu interior; e o inverso também pode acontecer com as drogas bases fracas. Em microambiente ácido, esse mecanismo farmacológico pode estar comprometido devido ao fenômeno denominado aprisionamento de íons (“*ion trapping*”), ou seja, o efeito direto dos íons no gradiente de distribuição de drogas. Este modelo explica que, em tumores ácidos, as drogas quimioterápicas consideradas básicas vão se concentrar em áreas de baixo pH e, por consequência, não vão conseguir penetrar nas células,

dificultando, assim, a absorção intracelular da droga [33,34]. A DOX, por exemplo, que pertence à família de antaciclina, penetra na membrana celular quando na sua forma neutra, porém se torna relativamente impermeável quando protonada. Assim, o pH extracelular ácido pode protonar a Doxurubicina e inibir sua entrada na célula. Ela também pode ser sequestrada para compartimentos intracelulares ácidos, sem chegar ao núcleo – seu sítio de atuação [35].

As bombas de prótons podem contribuir para o fenômeno do *ion trapping*, garantindo o gradiente de pH invertido no microambiente tumoral e aumentando a resistência a quimioterápicos. A maior parte dos artigos encontrados neste estudo correlaciona o aumento da resistência a quimioterápicos em microambiente ácido com o aumento das bombas de prótons, em especial as V-ATPases. Dada à vasta regulação que as bombas de prótons possuem na homeostasia do pH celular, o aumento da sua expressão em carcinomas foi relacionado a maiores potenciais de migração, invasão [36] e resistência a quimioterápicos [31,35,37,38]. Dessa forma, a aposta em terapias que possam inibir esse processo torna-se promissora.

A terapia combinada de quimioterápicos com inibidores das bombas de prótons têm se mostrado uma possibilidade para aumentar a sensibilidade das células tumorais ao tratamento. As drogas inibidoras das bombas de prótons impedem o transporte de íons, diminuindo, assim, a acidez extracelular.

Ao cultivarem diferentes linhagens de carcinomas (mama, melanoma e cólon humano) em meio ácido e, em seguida, tratarem com o quimioterápico Cisplatina, Federici et al. (2014) observaram que a captação e sensibilidade à droga foi diminuída para as linhagens de melanoma (Me30966) e câncer de mama (MCF7), quando comparadas com as mesmas células cultivadas em pH neutro. As células cultivadas em pH ácido produziram exossomos com maior concentração de Cisplatinas, o que pode ser um dos mecanismos de maior

resistência. Ao utilizarem o pré-tratamento na linhagem de melanoma (Me30966) com o inibidor da bomba de prótons (Lansoprazol), os autores observaram que houve aumento na absorção de Cisplatina em comparação às células não pré-tratadas com esse inibidor. Com o tratamento de Lansoprazol em condições ácidas, a quantidade de Cisplatina presente nos exossomos diminuiu 50%, suportando a hipótese de que o pré-tratamento com inibidor da bomba de prótons aumenta a retenção da droga pela célula e inibe a excreção da droga via exossomos [31].

Com intuito de explorar o mecanismo de morte gerado na célula cancerígena por meio da inativação das bombas de prótons, Huang et al. (2013) analisaram diferentes linhagens de células de câncer gástrico (SGC7901, BGC823, AGS). Observaram que o uso de Pantoprazol, inibidor da bomba de prótons, foi capaz de aumentar a sensibilidade das células à cisplatina e reverter a sensibilidade em células onde foi induzida a resistência. A taxa de apoptose induzida pelo Pantoprazol na linhagem SGC7901 com uma dose moderada (40 µg/mL) foi duas vezes maior, comparada às células não tratadas, enquanto que a mesma dose não induziu apoptose significativa em células epiteliais normais (GES-1). Estes achados sugerem que os efeitos diretos citotóxicos específicos do Pantoprazol em células de câncer gástrico estavam relacionados à indução de apoptose. Além disso, o tratamento com Pantoprazol causou uma diminuição dose-dependente na produção e secreção de IL-6 (Interleucina-6), concomitantemente com a redução dos níveis de STAT3 fosforilado (Signal Transducers and Activators of Transcription 3). A redução dos níveis de ativação de STAT3 também resultou na diminuição da expressão de seus genes-alvo: Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), ciclina D1 e c-Myc. Assim, o mecanismo de indução de apoptose pelo tratamento com Pantoprazol pode ser por inibição da via IL6/STAT3 [37].

A importância da V-ATPase no efeito do tratamento quimioterápico também foi avaliado no câncer de mama. Fan et al. (2012) observaram que a proteína LASS2 (Homo

Sapiens Longevity Assurance Homolog 2 of Yeast LAG1) é capaz de interagir e inibir a V-ATPase. Baixos níveis de LASS2 estavam associados a tumores de mama com pior prognóstico. *In vitro*, realizaram a transfecção com lentivírus para superexpressar LASS2 na linhagem de câncer de mama MCF-7 resistente a DOX (Doxorrubicina). O aumento de LASS2 aumentou o efeito da DOX, além de aumentar a sensibilidade a outras drogas como a Cisplatina e 5-Fluoracila. Nessas células, detectaram que LASS2 inibiu a função da V-ATPase, se ligando à sua subunidade C. Além disso, a transfecção com LASS2 resultou no aumento do pH lisossomal. Assim, a DOX que antes ficava sequestrada nestes compartimentos ácidos no citosol, estava mais presente no núcleo celular, induzindo aumento das taxas de apoptose. Ainda foi possível observar que os tumores xenográficos induzidos com as células que superexpressavam LASS2 eram significativamente menores do que os controles após o tratamento com DOX [35].

Lozupone et al. (2015) detectaram que TM9SF4, que é uma proteína transmembrana pertencente à Superfamília Transmembrana-9 (TM9SF), também participa da regulação da V-ATPase, favorecendo sua estruturação e ativação. O silenciamento de TM9SF4 reverteu o gradiente de pH em duas linhagens de câncer de cólon, acidificando o pH intracelular e alcalinizando o pH do lúmen de vacúolos ácidos. Além disso, reduziu o acúmulo de prótons com um consequente aumento do pH extracelular. Dessa forma, o silenciamento de TM9SF4 sensibilizou as células HCT116 e SW480 ao tratamento com 5-Fluoracila, inibindo sua proliferação e induzindo à apoptose [38].

Os artigos citados neste capítulo demonstram que as bombas de prótons, em especial a V-ATPase, são responsáveis pelo gradiente reverso de pH do microambiente tumoral, o qual possui um efeito direto no tratamento quimioterápico. A inibição das bombas de prótons parece reverter a resistência ao tratamento.

3.3. Via da Unfolded Protein Response (UPR)

A acidose crônica do meio extracelular pode causar stress no retículo endoplasmático (RE) e, conseqüentemente, ativar a via da proteína mal dobrada (UPR), contribuindo assim para a adaptação celular e a resistência a quimioterápicos. O retículo endoplasmático é uma organela responsável pela síntese, modificação e dobramento tridimensional de proteínas [39,40]. Diferentes tipos de estresses no microambiente podem resultar em acúmulo de proteínas mal dobradas, visto que esse processo é auxiliado por proteínas chaperonas, as quais dependem de energia e de níveis ótimos de cálcio intracelular. No câncer, a hipóxia, privação de nutrientes, produção de proteínas mutadas e pH ácido podem causar estresses no RE e ativar a UPR [41,42]. A ativação da UPR resulta na super regulação da chaperona GRP78 (Glucose regulated protein 78), proteína que é altamente expressa no câncer e associada a maior resistência a morte celular e ao tratamento quimioterápico [42,43].

Visioli et al. (2014) analisaram a ação da acidez prolongada em células endoteliais e verificaram que os mecanismos de adaptação celular e resistência a quimioterápicos anti-angiogênicos frente ao stress ácido poderia ser causado pela ativação da UPR. As células que foram expostas a baixo pH tinham maior expressão de GRP78 e, concomitantemente, apresentavam maior resistência à citotoxicidade induzida pela droga Sunitinib. A inibição de GRP78 reverteu a sensibilidade à droga Sunitinib. Além disso, células endoteliais obtidas diretamente do estroma de carcinomas espinocelulares apresentaram expressão gênica de GRP78 em torno de 600 vezes maior que as células endoteliais de tecidos saudáveis. Visto os resultados apresentados, pode-se concluir que a ativação da UPR pode contribuir para o aumento da resistência a quimioterápicos causado pela acidez do microambiente tumoral [43].

A UPR também pode ser ativada pela ação das proteínas de choque térmico (do inglês Heat Shock Proteins – HSP). As HSPs são um grupo de proteínas que se apresentam ativas

em situações de estresse e são classificadas de acordo com seu peso molecular. As HSP pequenas (sHSP), em especial a HSP 27, possuem função semelhante às chaperonas. Em situações de stress crônico, podem ser acionadas pela via MAPK/MK2 (Proteína Quinase p38 Ativada por Mitógeno/Proteína Quinase 2), inibindo a apoptose celular [44–47]. Singh et al. (2011) demonstraram, *in vitro*, que linhagens de adenocarcinoma gástrico eram resistentes a Doxorubicina quando expostas a meio com pH 6.7. Ao analisar o papel das HSP no mecanismo de resistência a Doxorubicina, os autores verificaram que a acidez extracelular induziu a ativação de p38 MAPK, a qual, por sua vez, induziu MK2 a fosforilar e ativar a HSP27. HSP fosforiladas podem impedir a apoptose por diferentes mecanismos celulares, incluindo a UPR [45]. Foi demonstrado, em estudos anteriores [48], que a resistência ao quimioterápico Cisplatina também está relacionada ao aumento da expressão de HSP 27 e à exposição crônica ao pH 6.7 em células de câncer mamárias.

3.4. Autofagia

A autofagia é um mecanismo biológico intracelular caracterizado por realizar reações catabólicas dos componentes citoplasmáticos para garantir a homeostase da célula em situações de stress [49,50]. Essa característica é de fundamental importância para garantir o funcionamento e a sobrevivência celular. No entanto, em casos de stress prolongado, a autofagia pode induzir a morte celular programada [51,52]. Logo, a autofagia representa um papel ambíguo numa célula saudável, promovendo mecanismos que atuam tanto na sobrevivência quanto na morte celular. Essa ambiguidade também é encontrada nas células cancerígenas.

No contexto do câncer, a autofagia pode auxiliar tanto como um inibidor da carcinogênese quanto na sua promoção e progressão. Entendendo o câncer como um distúrbio genético que causa um prolongado stress celular, é possível inferir a que autofagia

funcione como um mecanismo supressor do câncer, auxiliando na degradação de proteínas mutadas, organelas danificadas e diminuindo a instabilidade genética. Os mecanismos biológicos da autofagia envolvidos nesta função protetora podem estar associados ao reparo de DNA e na degradação de patógenos e proteínas pró-tumorais como, por exemplo, o Papiloma Vírus Humano (HPV), p53 mutante, entre outros [49,53–55].

Contudo, a autofagia também pode servir como agente pró-tumoral, garantindo a sobrevivência das células cancerígenas. Isso pode ocorrer devido à capacidade da autofagia realizar reações anabólicas, principalmente em situações de hipóxia e de baixa perfusão sanguínea – onde há constante privação de nutrientes –, garantindo a síntese de energia e de moléculas que contribuam para o crescimento celular [49,53–55].

Além de auxiliar no crescimento do tumor, a autofagia também protege as células do tratamento quimioterápico [49]. O aumento da ativação da autofagia resulta em maior resistência a quimioterápicos, e a inibição da autofagia aumenta a sensibilidade às drogas. No entanto, a resposta protetora da autofagia à quimioterapia dependerá do tipo medicamento utilizado e do tipo de câncer tratado [56]. A quimioresistência mediada pela autofagia pode ser explicada pela ativação de vias de sinalização, tais como: via do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico); via PI3K/AKT/ mTOR; sinalização de MAPK14/p38 α ; entre outras [57].

Tumores sólidos que contém microambiente ácido possuem maiores níveis de autofagia [56,58]. A literatura demonstra que a autofagia pode ser um mecanismo protetor da célula cancerígena frente à acidose crônica, visto que em experimentos prolongados de exposição à acidez observou-se o aumento da expressão gênica de ATG5 (Autophagy protein 5) e dos níveis da proteína LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), os quais exercem importantes papéis na via autofágica [9, 10]. Ao tratar animais com substâncias básicas, como o bicarbonato de sódio, nota-se a redução de desenvolvimento de

tumores e menor expressão de LC3, sugerindo que a autofagia desempenha uma função protetora da célula cancerígena frente à acidez crônica [56].

Apesar de a autofagia e a acidez extracelular apresentarem-se, individualmente, como objetos de estudo importantes nos mecanismos de adaptação e resistência a quimioterápicos, as vias que a suportam essa interação ainda são pouco exploradas. O uso da droga cloroquina, um inibidor de autofagia, tem se mostrado promissora para terapia coadjuvante em ensaios clínicos, pois sua função é inibir a degradação lisossomal da via autofágica e, com isso, fazer com que não haja acúmulo de grande quantidade da proteína LC3-II no seu interior. No entanto, Pellegrine et al. (2014) verificaram que o uso da cloroquina como terapia individual em modelos xenográficos não foi capaz de interferir no crescimento dos tumores. Ao tratar linhagens de células de melanoma e câncer de cólon de útero com pH baixo e cloroquina, verificaram que, quanto mais ácido o pH do meio, menor a sensibilidade à cloroquina. Tal mecanismo foi avaliado pela diminuição dos níveis da proteína LC3-II em culturas com baixo pH e pela quantificação dos níveis de cloroquina por cromatografia líquida, a qual demonstrou ser sete vezes menor quando comparado ao pH neutro. Ao inibir a autofagia com Bafilomicin A1 e Lysn-01 (dimérico derivado da cloroquina), houve aumento da resposta autofágica em baixo pH. Visto os resultados apresentados, os autores revelam que a capacidade de inibição da autofagia com cloroquina em células cancerígenas está diretamente relacionada ao pH do microambiente tumoral [59].

4. Discussão e perspectivas futuras

Torna-se evidente que a absorção da droga quimioterápica pela célula cancerígena é dependente do pH intra e extracelular. Drogas consideradas bases fracas, por exemplo, necessitam de um pH interno ácido e pH extracelular básico para aumentar a sua absorção.

Raghunand e Gillies (2000) demonstraram que quanto mais ácido é o tumor, menor é a absorção de drogas bases fracas e maior a absorção de drogas ácidas fracas [34].

O gradiente de pH inverso do tumor deixa o pH extracelular ácido e o intracelular neutro. Assim, a solução para diminuir a resistência ao tratamento de quimioterápicos seria escolher de acordo com o pH do medicamento a ser utilizado? Como sabemos, existe uma grande variação nas condições metabólicas do microambiente tumoral e uma capacidade plástica das células tumorais, as quais podem mudar a sua forma de funcionar a depender do ambiente a qual esta inserida [60,61]. Dessa forma, o pH no microambiente tumoral pode variar constantemente, podendo ser heterogêneo em diferentes áreas do tumor. Além disso, a literatura já demonstrou que a acidez gera a resistência mesmo em drogas quimioterápicas que são bases fracas, como é o caso da 5-Fluoracila [38,62]. Dessa forma, concluímos que a célula cancerígena é capaz de criar mecanismos moleculares internos para resistir a quimioterápicos e que a escolha da droga baseada apenas no pH não é suficiente para subverter a resistência. É importante ressaltar que existem outros mecanismos além da acidose que levam a resistência a quimioterápicos, tais como: capacidade de reparo do DNA, algumas mutações genéticas; resistência a apoptose; entre outros.

Nossos resultados demonstraram que quatro mecanismos biológicos podem explicar a resistência a quimioterápicos gerada pela acidez do microambiente do tumor: aumento dos moduladores do efluxo de drogas; ativação das bombas de prótons; ativação da via UPR; e ativação da autofagia. De acordo com a nossa revisão, o mecanismo mais estudado na literatura é o de moduladores do efluxo de drogas. Foi possível observar que a maior parte dos estudos sobre essa temática tem sido realizado por um mesmo grupo de pesquisadores [17,26–28]. Este grupo tenta elucidar a função da proteína transportadora do tipo ABC, a Pgp, na relação acidez/quimioresistência. Os quimioterápicos utilizados pelo grupo foram DAU, CIS e DOC. Em todos os estudos, notou-se que a Pgp representa um importante papel

no mecanismo de resistência a quimioterápicos gerado pela acidez. No entanto, a via que atua mediando esses mecanismos ainda precisa ser elucidada. A aplicação clínica de inibidores da Pgp foi testada através de ensaio clínico com uso de Palicetacel em pacientes com câncer cervical, de ovário, mama, pulmão e rins. Até o presente momento, já foi demonstrado que o uso do inibidor da Pgp pode aumentar a retenção do quimioterápico dentro da célula, contudo, os efeitos adversos ainda necessitam ser melhor elucidados [63].

O tópico “inibição da bomba de prótons” foi o que estudos a maior variabilidade de quimioterápicos, para avaliar o papel da quimioresistência frente à acidez. Pode-se observar que os inibidores das bombas de prótons são eficazes no aumento da sensibilidade dos quimioterápicos CIS, DOX e 5-FU. Esses inibidores são largamente comercializados e utilizados em pacientes com doenças produtoras de altos níveis de acidez, como a úlcera peptídica. Os mais utilizados são: omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol e dexlansoprazol [64]. Como são medicamentos considerados seguros para administração, o uso dos mesmos pode ser de grande valia como terapia coadjuvante no aumento da eficácia do tratamento quimioterápico em tumores sólidos ácidos [31,65–67]. No entanto, para o uso de inibidores de bombas de prótons no tratamento do câncer, deve-se atentar para a interação droga-droga. O tipo de pH do quimioterápico indicado para cada tipo de paciente deve ser avaliado, para evitar implicações terapêuticas e clínicas indesejadas. Em casos de indicações de quimioterápicos ácidos fracos não é necessário usar inibidores das bombas de prótons. Já em casos de quimioterápicos bases fracos, deve-se analisar se a droga possui solubilidade dependente de pH. Se a droga for solúvel em baixo pH, o uso de PPI torna-se contra-indicado, pois a sua administração pode inativar os efeitos antitumorais da droga base fraca [61].

Os tópicos “via da UPR” e “autofagia” obtiveram menor representatividade numérica nesta revisão. Entretanto, vale ressaltar que ambos representam importantes papéis na

relação causa/consequência tanto da acidez quanto da resistência a quimioterápicos. Por esse motivo, necessitam de melhores investigações técnicas para avaliar a interação entre esses mecanismos. Enquanto que, as bombas de prótons e os moduladores de efluxo de droga causam resistência por impedir que a droga entre na célula e atue, os efeitos da ativação da UPR e da autofagia estão associados à uma maior resistência a morte celular, ou seja, tornam a célula mais resistente à morte de uma forma geral, assim seus efeitos não estão diretamente relacionados ao tipo de droga utilizada.

Diante do exposto, fica claro a importância do pH do microambiente tumoral para o sucesso do tratamento anti-câncer. Até o presente momento, a literatura reporta quatro processos envolvidos na resistência a quimioterápicos gerados pela acidez extracelular. Contudo, nota-se a necessidade de estudos que explorem esses mecanismos para que possamos compreender, de forma mais ampla, os mecanismos biológicos que envolvem a resistência a quimioterápicos gerados pela acidez extracelular.

Tabela 1: Descrição dos artigos selecionados- estudos *in vitro*

Categoria	Autor e Ano	Tipo de Câncer estudado	Quimioterápico testado	pH avaliado	Mecanismos avaliados	Principais resultados
Efluxo de drogas	Thews et al. (2006)	Câncer de próstata de rato (AT1)	DAU e CIS	6.6 e 7.4	Citotoxicidade aos quimioterápicos, indução de apoptose (caspase 3),	A exposição a acidose demonstrou que atividade relativa da Pgp aumentou e a citotoxicidade para DAU e CIS foram reduzidos. A Pgp foi inibida e a atividade da caspase-3 aumentou quando comparada com a DAU sozinha.
Efluxo de drogas	*Sauvant et al. (2008)	Câncer de próstata de rato (AT1)	DAU e CIS	6.6 e 7.4	Atividade da Pgp, indução de apoptose	Em microambiente ácido, a inibição conjunta de ERK1 e p38 resultou no restabelecimento da citotoxicidade da DAU, porém, observou-se que apenas a p38 encontrava-se ativada.
Efluxo de drogas	*Thews et al. (2014)	Câncer próstata de rato (R3327-AT1)	DAU, CIS, DOC	6.6 e 7.4	Citotoxicidade, indução apoptose (caspase-3)	A acidose reduziu a citotoxicidade de DAU, CIS e DOC e a incubação adicional de verapamil aumentou a citotoxicidade para DAU e DOC. O ambiente ácido não levou a uma maior expressão de Pgp.
Efluxo de drogas	Cheng, To (2012)	Cólon humano - HCT-116, S1, S1M1-80 (resistente)	CIS e Mitoxatroma	5.0	Transcrição de ABCG2 e crescimento sob condições adversas (pH ácido, hipóxia e depleção de glicose)	Após o pré-tratamento com depleção de glicose (2-DG), pH ácido e hipóxia, as linhagens HCT-116 e S1 apresentaram aumento de ABCG2 (2 a 4 vezes). O pH ácido não alterou significativamente o nível de ABCG2 em células S1
Bomba de prótons	*Federici et al. (2014)	Melanoma e câncer de mama	CIS	6.5,7.2 e meio não tamponado	Absorção da droga, viabilidade celular, secreção por exossomos.	Em pH ácido, a absorção e sensibilidade da CIS foram diminuídas; pH ácido causou maior excreção da droga por exossomos; o pré-tratamento com Lansoprazol aumentou a absorção da CIS (linhagem de melanoma), comparado ao grupo não pré-tratado, assim como diminuiu a quantidade de droga nos exossomos.

Bomba de prótons	Huang et al., 2013	Câncer gástrico	CIS	6.5 , 7.4	Viabilidade celular, indução de apoptose seletiva, inativação da via IL/STAT3	A exposição à acidez combinada com o uso do pantoprazol foi capaz de aumentar a sensibilidade das células a CIS e reverter à sensibilidade em células onde foi induzida a resistência.
Bomba de prótons	Lozupone et al. 2015	Câncer de cólon	5-FU	NA	Silenciamento de TM9SF4	Silenciamento de TM9SF4 reverteu o gradiente de pH em duas linhagens de câncer de cólon, sensibilizando as células ao tratamento com 5-FU
Bomba de prótons	*Fan et al. 2013	Câncer de mama (MCF-7)	DOX, CIS e 5-FU	NA	Transfecção com LASS2, análise do ciclo celular,	O aumento de LASS2 aumentou o efeito da DOX, CIS e 5-FU. O aumento no pH lisossomal diminuiu o sequestro de DOX no citosol, ficando mais droga disponível no núcleo.
UPR	Singh et al (2011)	Adenocarcinoma gástrico	DOX	6.0, 6.7, 7.2	Tratamento com DOX; morte celular; quantificação intracelular da droga, quantificação dos níveis de caspase, p38 MPK, MK2 e Hsps27; inibição de Hsps	O baixo pH induz a resistência a DOX, aumentando a apoptose pela ativação das Hsps através da via p38 MAPK/MK2.
UPR	Visioli et al (2014)	Carcinoma espinocelular de boca	Sunitinib	7.4 e 7.0	Ativação da UPR: quantificação de Grp78, ATF4 e CHOP em células endoteliais e a resistência a quimioterápicos por meio de SRB	A acidez extracelular aumenta a ativação da UPR e sua inibição restabelece a resistência a quimioterápicos
Autofagia	*Pelegri et al (2014)	Melanoma, câncer de colo de útero e osteosarcoma	Cloroquina, bafilomycin A1 (BafA1), Lys-01	6.5, 6.8, 7.4	Tratamento com cloroquina, viabilidade celular, quantificação LC3-II por westwern blott, quantificação cloroquina e Lys1 por cromatografia líquida	O pH ácido neutraliza a ação da cloroquina, impedindo a inibição da autofagia.

Tabela 2: Descrição dos artigos selecionados- estudos *in vivo*

Categoria	Autor e Ano	Tipo de Câncer estudado	Quimioterápico testado	pH avaliado	Mecanismo de indução da acidose extracelular	Principais resultados
Efluxo de drogas	*Sauvant et al. (2008)	Câncer de próstata de rato (AT1)	DAU e CIS	6.6 e 7.4	Os animais foram induzidos a respiração anaeróbica por meio do tratamento com a combinação de hipóxia inspiratória, hiperglicemia e metaiodo-Benzilguanidina (MIBG).	A acidose induziu resistência a DAU, a qual foi abolida com inibição de p38.
Efluxo de drogas	Thews et al. (2011)	Câncer próstata de rato (R3327-AT1)	DAU	6.6 e 7.4	Mesmo mecanismo publicado por Sauvant et al.(2008)	Inibição da p38 restaurou minimamente a sensibilidade à DAU. No entanto, para cisplatina não houve diferença.
Efluxo de drogas	*Thews et al. (2014)	Câncer próstata de rato (R3327-AT1)	DAU, CIS, DOC	6.6 e 7.4	Mesmo mecanismo publicado por Sauvant et al.(2008)	A drogas DAU e DOC tiveram sua citotoxicidade diminuída pelo meio ácido.
Bomba de prótons	*Federici et al. (2014)	Melanoma e câncer de mama	CIS	6.5, 7.2, meio não tamponado	Não houve indução de acidose extracelular, apenas tratamento com PPI.	O grupo de animais tratados com PPI demonstrou que houve aumento da absorção da CIS dentro da célula e diminuiu a quantidade de droga nos exossomos, quando comparados ao grupo não tratado com PPI.
Bomba de prótons	*Fan et al. 2013	Câncer de mama (MCF-7)	DOX, CIS e 5-FU	NA	Não houve indução de acidose extracelular, apenas indução do expressão de LASS2.	Os tumores induzidos com maior expressão de LASS2 eram menores do que os controles após tratamento com DOX.
Autofagia	*Pelegri et al (2014)	Melanoma, câncer de colo de útero e osteosarcoma	Cloroquina, bafilomycin A1 (BafA1), Lys-01	6.5, 6.8, 7.4	Não houve indução de acidose extracelular, apenas tratamento com cloroquina.	Apenas foi analisada a expressão da proteína LC3, a qual mostrou-se elevada apenas nas regiões de normóxia, nas regiões de hipóxia não houve expressão.

5. Referências bibliográficas

- [1] Smallbone K, Gavaghan DJ, Gatenby RA, Maini PK. The role of acidity in solid tumour growth and invasion 2005;235:476–84. doi:10.1016/j.jtbi.2005.02.001.
- [2] Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:411–25. doi:10.1007/s10585-008-9145-7.
- [3] 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* 2009;69:2677–84. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2394.
- [4] Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008;18:330–7. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.011.
- [5] Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* 2010;51:1167–70. doi:10.2967/jnumed.109.068981.
- [6] Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 2011;18:829–40. doi:10.1038/cdd.2010.150.
- [7] Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 2013;13:89. doi:10.1186/1475-2867-13-89.
- [8] Zhou W, Liotta LA, Petricoin EF. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. *Cancer Lett* 2015;356:176–83. doi:10.1016/j.canlet.2013.11.003.
- [9] Justus CR, Dong L, Yang L V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 2013;4 DEC:1–9. doi:10.3389/fphys.2013.00354.
- [10] Martínez-Zaguilán R, Seftor E a, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:176–86. doi:10.1007/BF00121214.
- [11] Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. Pericellular pH Affects Distribution and Secretion of Cathepsin B in Malignant Cells. *Cancer Res* 1994;54:6517–25.
- [12] Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, et al. Cathepsin D in breast cancer: Mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 2000;291:157–70. doi:10.1016/S0009-8981(99)00226-0.
- [13] Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornell HH, Ibrahim-Hashim A, et al.

- Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73:1524–35. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.
- [14] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13:714–26. doi:10.1038/nrc3599.
- [15] Tezcan O, Ojha T, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Targeting cellular and microenvironmental multidrug resistance. *Expert Opin Drug Deliv* 2016;13. doi:10.1080/17425247.2016.1214570.
- [16] Vishvakarma NK, Kumar A, Singh V, Singh SM. Hyperglycemia of tumor microenvironment modulates stage-dependent tumor progression and multidrug resistance: Implication of cell survival regulatory molecules and altered glucose transport. *Mol Carcinog* 2013;52:932–45. doi:10.1002/mc.21922.
- [17] 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;8:143–52. doi:10.1593/neo.05697.
- [18] Cheng GMY, To KKW. Adverse Cell Culture Conditions Mimicking the Tumor Microenvironment Upregulate ABCG2 to Mediate Multidrug Resistance and a More Malignant Phenotype. *ISRN Oncol* 2012;2012:746025. doi:10.5402/2012/746025.
- [19] Dlugosz A JA. ABC Transporters in the Development of Multidrug Resistance in Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 2016;22:4705–16.
- [20] Gillet J-P, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2007;1775:237–62. doi:10.1016/j.bbcan.2007.05.002.
- [21] Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: Why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev* 2013;32:211–27. doi:10.1007/s10555-012-9402-8.
- [22] Ueda K. ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;75:401–9. doi:10.1271/bbb.100816.
- [23] Li W, Zhang H, Assaraf YG, Zhao K, Xu X, Xie J, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat* 2016;27:14–29. doi:10.1016/j.drug.2016.05.001.
- [24] Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, et al. β -Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 2001;76:1121–8. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00113.x.

- [25] Ponte-Sucre A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;76:279–86. doi:10.1007/s00253-007-1017-6.
- [26] Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, Riemann A, Gekle M, et al. 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;123:2532–42. doi:10.1002/ijc.23818.
- [27] Thews O, Nowak M, Sauvant C, Gekle M. Hypoxia-induced extracellular acidosis increases p-glycoprotein activity and chemoresistance in tumors in vivo via p38 signaling pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 701, 2011, p. 115–22. doi:10.1007/978-1-4419-7756-4-16.
- [28] Thews O, Riemann A, Nowak M, Gekle M. Impact of hypoxia-related tumor acidosis on cytotoxicity of different chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol* 2014;812:51–8. doi:10.1007/978-1-4939-0620-8_7.
- [29] Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Sun-Wada G-H, Wada Y, et al. The a3 isoform vacuolar type H⁺-ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Mol Cancer Res* 2011;9:845–55. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0449.
- [30] Stransky L, Cotter K, Forgac M. The Function of V-ATPases in Cancer. *Physiol Rev* 2016;96:1071–91. doi:10.1152/physrev.00035.2015.
- [31] Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M, Borghi M, et al. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0088193.
- [32] Fais S. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism: Symposium. *J Intern Med* 2010;267:515–25. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02225.x.
- [33] Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1219–29. doi:10.1016/S0006-2952(03)00468-4.
- [34] Raghunand N, Gillies RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat* 2000;3:39–47. doi:10.1054/drup.2000.0119.
- [35] Fan S, Niu Y, Tan N, Wu Z, Wang Y, You H, et al. LASS2 enhances chemosensitivity of breast cancer by counteracting acidic tumor microenvironment

- through inhibiting activity of V-ATPase proton pump. *Oncogene* 2012;1682–90. doi:10.1038/onc.2012.183.
- [36] Lu Q, Lu S, Huang L, Wang T, Wan Y, Zhou CX, et al. The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer. *Diagn Pathol* 2013;8:1–7. doi:10.1186/1746-1596-8-145.
- [37] Huang S, Chen M, Ding X, Zhang X, Zou X. Proton pump inhibitor selectively suppresses proliferation and restores the chemosensitivity of gastric cancer cells by inhibiting STAT3 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2013;17:585–92. doi:10.1016/j.intimp.2013.07.021.
- [38] Lozupone F, Borghi M, Marzoli F, Azzarito T, Matarrese P, Iessi E, et al. TM9SF4 is a novel V-ATPase-interacting protein that modulates tumor pH alterations associated with drug resistance and invasiveness of colon cancer cells. *Oncogene* 2015;34:5163–74. doi:10.1038/onc.2014.437.
- [39] Hotamisligil GS, Davis RJ. Cell Signaling and Stress Response. *Signal Transduct* 2014;346–58. doi:10.1101/cshperspect.a006072.
- [40] Xiang C, Wang Y, Zhang H, Han F. The role of endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disease. *Apoptosis* 2016;0:0. doi:10.1007/s10495-016-1296-4.
- [41] Le Reste P-J, Avril T, Quillien V, Morandi X, Chevet E. Signaling the unfolded protein response in primary brain cancers. *Brain Res* 2016;1642:59–69. doi:10.1016/j.brainres.2016.03.015.
- [42] Senft D, Ronai ZA. Adaptive Stress Responses During Tumor Metastasis and Dormancy. *Trends in Cancer* 2016;2:429–42. doi:10.1016/j.trecan.2016.06.004.
- [43] Visioli F, Wang Y, Alam GN, Ning Y, Rados P V., N??r JE, et al. Glucose-regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. *PLoS One* 2014;9:1–9. doi:10.1371/journal.pone.0101053.
- [44] Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994;78:1027–37. doi:10.1016/0092-8674(94)90277-1.
- [45] 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;68:1041–51. doi:10.1007/s00018-010-0503-7.
- [46] Bakthisaran R, Tangirala R, Rao CM. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*

- 2015;1854:291–319. doi:10.1016/j.bbapap.2014.12.019.
- [47] Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, Rausei S, Boni L, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2015;360:114–8. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.026.
- [48] Wachsberger PR1, Landry J, Storck C, Davis K, O’Hara MD, Owen CS, Leeper DB CR. Mammalian cells adapted to growth at pH 6.7 have elevated HSP27 levels and are resistant to cisplatin. *Int J Hyperth* 1997;13:251–5.
- [49] Gomes LR, Vessoni AT, Menck CFM. Microenvironment and autophagy cross-talk: Implications in cancer therapy. *Pharmacol Res* 2016;107:300–7. doi:10.1016/j.phrs.2016.03.031.
- [50] Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005;5:726–34. doi:10.1038/nrc1692.
- [51] Lin L, Baehrecke EH. Autophagy , cell death , and cancer 2015.
- [52] Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973;7:253–66. doi:10.1002/tera.1420070306.
- [53] Li X, Gong Z, Zhang L, Zhao C, Zhao X, Gu X, et al. Autophagy knocked down by high-risk HPV infection and uterine cervical carcinogenesis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:10304–14.
- [54] Wang H-Y, Yang G-F, Huang Y-H, Huang Q-W, Gao JUN, Zhao X-D, et al. Reduced expression of autophagy markers correlates with high-risk human papillomavirus infection in human cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2014;8:1492–8. doi:10.3892/ol.2014.2417.
- [55] Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X. p53 signaling and autophagy in cancer: A revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy* 2011;7:565–71. doi:10.4161/auto.7.6.14073.
- [56] Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, Schramm KJ, Haller E, Proemsey JB, et al. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. *Cancer Res* 2012;72:3938–47. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3881.
- [57] Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2013;4:e838. doi:10.1038/cddis.2013.350.
- [58] Marino ML, Pellegrini P, Di Lernia G, Djavaheri-Mergny M, Brnjic S, Zhang X, et al. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic

- stress. *J Biol Chem* 2012;287:30664–76. doi:10.1074/jbc.M112.339127.
- [59] Pellegrini P, Strambi A, Zipoli C, Hägg-Olofsson M, Buoncervello M, Linder S, et al. Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: Implications for cancer therapies. *Autophagy* 2014;10:562–71. doi:10.4161/auto.27901.
- [60] Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;1–21. doi:10.1038/nrclinonc.2016.60.
- [61] Zhang L, Wu F, Lee SC, Zhao H. pH-Dependent Drug-Drug Interactions for Weak Base Drugs: Potential Implications for New Drug Development. *Clin Pharmacol Ther* 2014;96:266–77. doi:10.1038/clpt.2014.87.
- [62] Skarsgard LD, Skwarchuk MW, Vinczan A, Kristl J CD. The cytotoxicity of melphalan and its relationship to pH, hypoxia and drug uptake. *Anticancer Res* 1995;15:219–23.
- [63] Kelly RJ, Robey RW, Chen CC, Draper D, Luchenko V, Barnett D, et al. A Pharmacodynamic Study of the P-glycoprotein Antagonist CBT-1 in Combination With Paclitaxel in Solid Tumors. *Oncologist* 2012;17.
- [64] Strand D, Kim D, Daejin, Peura DA. 25 Years of Proton Pump Inhibitors: A Comprehensive Review. *Gut Liver* 2016;1–11. doi:10.5009/gnl15502.
- [65] Shi Y, Tang B, Yu PW, Tang B, Hao YX, Lei X, et al. Autophagy Protects against Oxaliplatin-Induced Cell Death via ER Stress and ROS in Caco-2 Cells. *PLoS One* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0051076.
- [66] Kiyoshima T, Yoshida H, Wada H, Nagata K, Fujiwara H, Kihara M, et al. Chemoresistance to concanamycin A1 in human oral squamous cell carcinoma is attenuated by an HDAC inhibitor partly via suppression of Bcl-2 expression. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0080998.
- [67] Petrangolini G, Supino R, Pratesi G, Dal Bo L, Tortoreto M, Croce AC, et al. Effect of a novel vacuolar-H⁺-ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:939–46. doi:10.1124/jpet.106.103481.

Análise do comportamento do câncer de boca em microambiente ácido

Periódico para submissão: Oral Oncology

Fator de impacto: 4.286

Qualis: A1

Resumo

Objetivos: avaliar o comportamento de linhagens de carcinoma espinocelular de boca em microambiente ácido por meio da análise do perfil migratório, capacidade de expressar células do tipo tronco tumorais e de resistir a quimioterápicos.

Materiais e métodos: linhagens de células de carcinoma de boca (SCC-4, SCC-9) e queratinócitos (HaCat) foram expostas ao meio de cultura ácido por 7 e 21 dias, depois recondicionadas ao meio neutro. A proliferação das células foi verificada pelo ensaio clonogênico. A capacidade de migração celular foi avaliada pelo ensaio de cicatrização de feridas e time-lapse. O perfil de expressão gênica para marcadores de EMT e de células-tronco tumorais foi avaliado por PCR em tempo real. A resistência ao quimioterápico Cisplatina foi determinada pelo ensaio de viabilidade celular de Sulforodamina B. Foram utilizados os testes estatísticos ANOVA e ANOVA de duas vias, seguidos do teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de $p < 0.05$.

Resultados: observou-se que todas as linhagens modificaram seu aspecto morfológico. As células de carcinoma espinocelular demonstram um fenótipo mesenquimal e maior potencial de migração quando comparadas aos queratinócitos bucais, que por sua vez, diminuíram o potencial de migração quando expostos ao meio ácido ($p < 0.05$). Observamos o aumento da expressão de N-caderina ($p < 0.05$) concomitante a diminuição de E-caderina ($p < 0.05$) após o tratamento com pH 6.8. A exposição crônica à acidez aumentou

a capacidade de produzir orosferas (SCC4: $p=0.007$ / SCC9: $p= 0.1202$) e a expressão gênica de CD44 ($p=0.0325$). No entanto, a expressão de Bmi-1 foi reduzida ($p=0.0572$). A resistência à cisplatina foi detectada para os grupos de exposição contínua a acidez ($p<0,05$). A citotoxicidade do quimioterápico foi restaurada após o condicionamento das células em meio neutro por um período de sete dias ($p>0,05$).

Conclusão: a exposição ao microambiente ácido aumenta o grau de agressividade das linhagens de carcinoma espinocelular de boca, tornando-as mais resistentes à morte e com maior capacidade migratória.

Palavras-chave: Acidez extracelular; Câncer de boca; baixo pH.

1. Introdução

O carcinoma espinocelular de boca (CEC) é uma das neoplasias mais frequente do corpo humano, apresentando-se com baixas taxas de sobrevivência – em torno de 50% em 5 anos [1,2]. Caracteriza-se por ser comumente detectado em estágios avançados, onde o tratamento de primeira escolha é a ressecção cirúrgica, seguido da radioterapia e quimioterapia como tratamentos coadjuvantes [3–5]. Apesar de a quimioterapia ser um tipo de tratamento importante em outros tipos de câncer, para o CEC o seu uso ainda não é efetivo [5]. Para evitar tratamentos agressivos e mutiladores para os pacientes portadores de CEC, entende-se a necessidade da busca de terapias mais efetivas, fazendo-se necessário compreender melhor o comportamento biológico do CEC.

Atualmente, entende-se o câncer como um microambiente tumoral, onde há múltiplos fatores que vão interferir no desenvolvimento e comportamento do tumor [6,7]. A desregulação do metabolismo energético é uma característica marcante do microambiente tumoral [7]. O princípio desta desregulação é a capacidade que a célula cancerígena desenvolve de inverter o tipo de metabolismo da glicose, deixando de produzir sua energia

pela fosforilação oxidativa para produzir através da fermentação láctica. A implicação desta inversão é que as células precisam de uma maior quantidade de reações de glicólise para produzir a energia necessária para sobreviver. Dessa forma, liberam para o meio extracelular uma grande quantidade de íons de hidrogênio e lactato, diminuindo seu pH e o tornando ácido [7,8].

A exposição crônica da célula tumoral à acidez pode resultar numa seleção de células tumorais com fenótipos mais agressivos [9–12]. A literatura já demonstrou que células de melanoma, câncer de mama, próstata, pulmão, entre outros, quando expostas a baixo pH, podem demonstrar maiores potenciais de invasão, metástase, aumentar a população de células-tronco tumorais, diminuir a sensibilidade a quimioterápicos. Trabalhos com espécimes de biópsia também demonstraram que o aumento dos níveis de lactato está relacionado com pior prognóstico [13-14]. Contudo, estudos *in vivo* demonstraram que, ao tratar animais com terapias tamponantes, é possível observar diminuição do crescimento do tumor, menor risco de metástases e aumento das curvas de sobrevivência [15–18]. Por isso, terapias que visam eliminar os mecanismos de acidificação tumoral, agindo no tamponamento e em alvos moleculares do metabolismo glicolítico, vêm sendo desenvolvidas ao longo dos últimos anos [19].

Apesar da literatura já ter demonstrado que o pH do CEC de boca pode se apresentar ácido, entre 6.56 e 6.97 [20], o perfil do seu comportamento frente à acidez ainda não foi investigado. Portanto, o presente estudo tem o objetivo de demonstrar os efeitos da exposição a um microambiente ácido em células de carcinoma espinocelular de boca, identificando o perfil de proliferação, migração, do fenótipo de célula tronco tumoral e da resistência a quimioterápicos. Para mimetizar o dinamismo do microambiente tumoral, estudamos o comportamento celular de duas formas: criamos um modelo de exposição contínua ao pH ácido em diferentes tempos experimentais e também um modelo onde após a

exposição à acidez, as células foram recondicionadas ao meio neutro. Pretende-se, com isso, contribuir um melhor entendimento da biologia tumoral do carcinoma espinocelular de boca, abrindo a possibilidade para respaldar o desenvolvimento de novas terapias e o avanço na busca de melhores índices de sobrevida dos pacientes acometidos por esse tipo de câncer.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultivo Celular

Foram utilizadas linhagens de células tumorais de Carcinoma Espinocelular de Boca (SCC-4 e SCC-9/Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ) e Queratinócitos Humanos (HaCat /Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ) . Inicialmente, os grupos foram divididos em neutro e ácido. O grupo de células do meio neutro foram cultivadas em meio *Eagle* modificado por Dulbecco com grande concentração de glicose (DMEM, 12100046, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific, 12657FBS), 5mM de HEPES (Thermo Scientific, 15630080), 2g de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, S5761, St. Louis, Missouri, EUA), 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Thermo Scientific, 15240062). As células do grupo ácido foram cultivadas com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Thermo Scientific), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific, 12657), 5mM de HEPES (Thermo Scientific, 15630080) e 25mM de Pipes (Sigma-Aldrich, P1851, St. Louis, Missouri, EUA), 100U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina (Thermo Scientific, 15240062) e acidificados com ácido clorídrico a 5M (Merck, Darmstadt, Alemanha, HC886668). Ambos os grupos foram mantidos em ambiente úmido a 37°C e a 5% de CO₂. O controle do pH foi mensurado com pHmetro (Analion, Ribeirão Preto, SP, Brazil, PM608) e os meios foram trocados a cada 2-3 dias.

Um grupo de células foi mantido em meio ácido (6.8) durante o período de 7 e de 21 dias, os quais foram denominados de “7D” e “21D”. Outro grupo de células foi mantido em meio com pH acidificado (6.8) durante 7 e 21 dias e posteriormente foi recondicionado em meio neutro por 7 dias, sendo denominados “7+7D” e “21+7D”. O grupo controle foi mantido em meio neutro constantemente (7.4). As trocas de meio aconteciam a cada dois dias.

2.2. Ensaios de migração celular

2.2.1. Time lapse

O padrão de migração individual das células foi analisado utilizando o ensaio de *time lapse*. Para tanto, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 . Em um microscópio invertido, uma área contendo entre dez e vinte células foi selecionada e o vídeo do *time lapse* foi realizado a partir da obtenção de uma fotografia tirada a cada dez minutos ao longo de um intervalo de vinte horas. O material obtido foi analisado e a movimentação de cada célula foi mapeada no software ImageJ.

2.2.2. Cicatrização de ferida

Para avaliar a migração das células tumorais, foram realizados ensaios de cicatrização de ferida nos quais as células foram plaqueadas na concentração de 7×10^5 . Após atingirem confluência, foram feitos dois riscos formando uma cruz no centro da placa, com o auxílio de uma ponteira. 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 (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.

2.3. Ensaios para verificação da propriedades de Células Tronco-tumorais

2.3.1 Orosferas

Confeccionou-se uma camada de baixa aderência com pó de agarose (Kasvi, Curitiba, PR, Brazil) em placas de 6 poços e foram semeadas 5000 células por poço. Sete dias após o plaqueamento, o número de colônias foi quantificado no microscópio invertido. Foram consideradas orosferas as colônias não aderentes que possuíam ≥ 25 células. [21].

2.3.2 PCR em tempo real

Foram comparadas a expressão gênica de marcadores de células-tronco tumorais (Bmi-1, CD44) e de transição epitélio-mesênquima (E-Caderina, N-Caderina) dos diferentes grupos analisados. O RNAm foi extraído com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, OH, USA), seguido da técnica de fenol e clorofórmio. O CDNA foi preparado com o kit superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Para a realização da reação do PCR em tempo real, foram utilizados os primers Taqman (Thermo Scientific): Bmi-1 (Hs00409825_g1); CD44 (Hs01073861_m1), E-caderina (Hs01023894_m1); N-caderina (Hs00983056_m1). Todas as reações foram realizadas em triplicatas e normalizadas para GAPDH (Hs02758991_g1) e B-actina (Hs01060665_g1).

2.4. Ensaio para proliferação e determinação da viabilidade celular

2.4.1. Clonogênico

Após as células receberem tratamento ácido de acordo com o seu respectivo grupo, foram lavadas com PBS e submetidas a ação de tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Scientific, 25200056). Foram plaqueadas 1000 células numa placa de seis poços. O meio foi trocado a cada 2 dias e, após quinze dias, os poços foram lavados com PBS, fixados com metanol

(Sigma-Aldrich, 322415, St. Louis, Missouri, EUA) e corados com cristal violeta a 0,25% (Sigma-Aldrich, C5042). Para contagem, os poços foram divididos em quatro quadrantes com auxílio de uma caneta com ponta de tungstênio. As colônias foram contadas em microscópio invertido e foram consideradas colônias a partir de 50 células.

2.4.2. Ensaio da Sulforodamina B

As células foram semeadas numa concentração de 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços. A Cisplatina foi adicionada vinte e quatro horas após (Bedford Lab, Bedford, OH) em diferentes concentrações. Após 72 horas, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10%, coradas com SRB 0,4% (Sigma-Aldrich) e lavadas em ácido acético a 1%. As placas foram lidas num leitor de microplacas a 560 nm. Os resultados foram normalizados contra a densidade de plaqueamento do controle inicial e livre de drogas. Os dados foram obtidos a partir de triplicatas de cada condição e são representativos de três experimentos independentes.

2.5. Análise estatística

Inicialmente, foi realizada a análise da distribuição dos dados. Para a comparação estatística dos grupos, quando a distribuição for normal, foram utilizados os testes ANOVA e ANOVA de duas vias, seguidos do teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). O nível de significância considerado foi de $p < 0.05$.

3. Resultados

A exposição crônica à acidez diminui a proliferação celular e alterações morfológicas em células epiteliais de carcinoma espinocelular de boca

Morfologicamente, é possível observar as alterações que a exposição à acidez do meio causa em todas as linhagens celulares. Nota-se que todas as linhagens de células

estudadas modificaram seu aspecto. Quanto maior o grau de exposição à acidez, maiores são as proporções de vacúolos e alterações morfológicas celulares (Figura 1A). Para o cultivo do grupo de 21 dias em meio ácido, foi necessário iniciar o tratamento das placas com altos níveis de confluência (90-100%), pois se percebeu que, quanto menor a confluência da placa, menores as chances das células sobreviverem a esse tipo de tratamento. Outro ponto importante é que as células não sobreviviam à realização de passagens contínuas em meio ácido (Figura Suplementar 1).

Quando as linhagens de células foram comparadas, notou-se que as células epiteliais não tumorais HaCat foram menos resistentes ao meio ácido do que as SCC-4 e as SCC-9. As HaCat, por serem queratinócitos normais, visivelmente eram as linhagens que mais sofriam com o meio ácido. Para resistir à exposição crônica ao meio ácido, estas células tinham que iniciar o tratamento com a placa 100% confluenta. Durante os primeiros 7 dias, as células mudavam seu aspecto estrutural, diminuía o seu tamanho e havia muita morte celular. Ao recondicioná-las no meio neutro por mais sete dias, as HaCat se recuperavam e retornavam à sua morfologia original. No entanto, a exposição ao meio ácido por 21 dias resultou em morte celular maciça e, mesmo recondicionando-as em meio neutro, não foi possível observar a recuperação das células remanescentes (Figura 1A).

As SCC-9 também sofreram bastante no meio ácido. Nos primeiros 7 dias, notou-se que houve uma grande quantidade de morte celular. As células referidas perderam seu aspecto epitelióide e demonstram uma aparência achatada e fusiforme, semelhante às células mesenquimais. Ao recondicionar ao meio neutro, as SCC-9 continuaram com o fenótipo adquirido. Após 21 dias de exposição ao meio ácido (6.8), poucas células sobreviveram. Quando recondicionadas em meio neutro, houve um crescimento marcado da quantidade de células grandes arredondadas com vacúolos no seu interior e menor capacidade de recuperação (Figura 1A).

As SCC-4 foram mais resistentes ao meio ácido. Nos primeiros 7 dias, houve mudança da morfologia semelhante às descritas nas SCC-9 (Figura 1A). Houve também morte celular e diminuição da viabilidade e proliferação (Figura 1B). Ao recondicionar as SCC-4 em meio neutro, a maior parte das células recuperou a viabilidade e a morfologia epitelióide. Após 21 dias de exposição, foi possível notar um aumento do aspecto fusiforme e diminuição da viabilidade. Ao recondicionar em meio neutro, as células se recuperaram lentamente.

O ensaio de proliferação demonstrou que, quanto maior é a exposição à acidez, menor é a capacidade proliferativa (Figuras 1B e 1C). Acreditamos que a exposição crônica, como no tempo de 21 dias em meio ácido representa um forte estresse celular, o que impõe a necessidade de mais tempo para que as mesmas se recuperem, quando recondicionadas ao meio neutro (Figura 1D).

A acidez extracelular aumenta a migração de linhagens de CEC de boca e induz a transição epitélio-mesênquima

Os resultados demonstram que na migração coletiva, pelo ensaio de cicatrização de feridas, as células SCC-4 têm maior potencial de migração quando comparadas às SCC-9 e às HaCat (Figuras 2A e 2B). O grupo “7+7D” das SCC-4 apresentou maior potencial de migração coletiva quando comparado ao grupo “21+7D” e às outras linhagens. Para a linhagem SCC-9, não houve diferença entre os grupos analisados. Nas HaCat, o meio ácido causou uma perda no potencial da migração coletiva (Figura 2B).

Na análise de migração individual das células, observou-se que a linhagem SCC-4 quanto mais exposta ao meio ácido, maior sua capacidade para percorrer maiores distâncias e com maior velocidade. As células da linhagem SCC-9 conseguiram percorrer uma maior distância e com maior velocidade, quando comparadas às outras linhagens. No entanto, o

grupo experimental desta linhagem não obteve diferença estatística, quando comparado ao grupo controle. Para as HaCat, não houve diferença entre os grupos analisados (Figuras 2C e 2D).

A exposição ao meio ácido causou alterações morfológicas, levando a um fenótipo de célula mesenquimal nas linhagens de CEC (Figura 2E). Para investigar se as alterações observadas eram devido à indução da transição epitélio-mesênquima (EMT), foi avaliada a expressão gênica de marcadores epiteliais e mesenquimais nas células SCC-4. Observou-se que, quanto maior a exposição ao meio ácido, maior é a expressão de N-caderina e menor a de E-caderina, concluindo que a exposição prolongada ao meio ácido induz a EMT (Figura 2F).

A exposição ao meio ácido induz o fenótipo de células-tronco tumorais em linhagens de carcinoma espinocelular.

O ensaio de orosferas foi realizado nas linhagens de células SSC-4 e SCC-9. Para ambas as linhagens, os resultados demonstraram que os grupos mais expostos ao meio ácido foram capazes de formar mais esferas (Figura 3A). Já a análise da expressão gênica de marcadores de células-tronco tumorais da linhagem SCC-4 mostrou aumento da expressão de CD44 apenas para os grupos “7D” e “21D”. Ao recondicioná-los em meio neutro, a expressão de CD44 diminuiu (Figura 3B). Para o marcador Bmi-1, houve diminuição da expressão em todos os grupos experimentais (Figura 3B).

A acidez extracelular causa aumento da resistência à cisplatina em células de carcinoma de boca.

Maior resistência à cisplatina foi observada nos grupos “7D” e “21D” das linhagens de células SCC-4. Disso depreende-se que, a exposição à acidez, resulta em maior a

resistência ao quimioterápico referido (Figura 4A). Ao diluir a droga em meio neutro, observou-se uma restauração parcial da citotoxicidade da droga (Figura 4B). Após recondicionamento por 7 dias em meio neutro, a sensibilidade foi totalmente restaurada.

4. Discussão

A busca da diminuição de tratamentos agressivos e mutiladores, assim como das altas taxas de mortalidade de pacientes acometidos pelo carcinoma espinocelular de boca, são os principais objetivos das pesquisas nesta área. Neste sentido, expandir o conhecimento sobre o microambiente tumoral do CEC é um ponto fundamental. A acidose extracelular do microambiente do tumor é característica que leva ao aumento da agressividade de tumores sólidos. O pH extracelular do CEC de boca é ácido e os resultados deste estudo demonstram que linhagens de células expostas a acidez produzem características agressivas, assim como foi evidenciado por outros estudos com diferentes tipos de câncer [9,11,22,23].

Neste estudo, assim como em outros já publicados [10,23], foi possível observar que a exposição à acidez pode levar a alterações no fenótipo da célula, aumentando a quantidade de vacúolos no seu interior e mudando a característica do citoesqueleto para um aspecto mesenquimal. Assim, hipotetizamos que o ambiente ácido pode levar a um maior potencial de migração celular. Ao analisar a capacidade migratória das linhagens de câncer de boca, foi possível notar que, uma vez expostas ao pH ácido, quando as células eram recondicionadas em meio neutro, houve aumento da migração celular e da expressão gênica de marcadores que evidenciam a transição epitélio-mesênquima. O mesmo efeito já foi observado em outros tipos de câncer [9,10,18,24]. Para verificar se esse efeito é específico em células tumorais, repetimos os experimentos com as células epiteliais HaCat, e observamos um resultado inverso: o tratamento com meio ácido reduziu a capacidade

migratória dessas células epiteliais. Essa observação sugere que a reprogramação genética que acontece na célula cancerosa modifica os efeitos da acidez.

É importante que outros aspectos que influenciam os processos de invasão e de metástases sejam investigados também, como a degradação de matriz extracelular. Em tumores de melanoma, câncer de mama, próstata, pulmão, entre outros, já foi observado que o pH ácido do meio pode induzir a expressão de metaloproteinases de matriz, catepsina B e outras enzimas que fazem parte do processo de degradação de colágeno e matriz extracelular [23,25]. Dessa forma, a acidose extracelular pode ser considerada como um dos grandes propulsores para a invasão tumoral e para geração de metástases.

Outra característica importante associada à agressividade tumoral é a capacidade de desdiferenciação para um fenótipo com características semelhantes ao de células-tronco tumorais [26]. Um ensaio bastante utilizado na literatura para o estudo das células-tronco tumorais é o ensaio de orosferas, onde as células são desafiadas a proliferar e formar esferas em uma situação de anoiquia, ou seja, quando são impedidas de se aderir a um substrato[21]. Os nossos resultados demonstraram que as duas linhagens de CEC estudadas foram capazes de produzir mais orosferas, denotando a capacidade de reproduzir esse fenótipo. Quando comparamos à proliferação celular em situação de aderência (tanto pelo ensaio clonogênico quanto pelo SRB), as células em pH ácido proliferavam menos, mas quando desafiadas em uma situação de extremo estresse (anoiquia) observamos maior capacidade de produzir esferas, sugerindo que o tratamento ácido aumenta a fração de células-tronco tumorais nessa população.

Ao avaliar esta capacidade por meio da expressão gênica de marcadores de células-tronco tumorais [21] na linhagem SCC-4, observou-se que, quando comparado ao grupo controle, houve um aumento dos níveis de CD44. No entanto, observamos uma diminuição de outro marcador de pluripotência, o Bmi-1. A proteína Bmi-1 está altamente expressa em

diversos tipos de câncer, no entanto, no CEC bucal sua alta expressão pode estar associada a estágios iniciais da carcinogênese bucal [27]. Sua função é controlar o ciclo celular, atuar na auto-renovação de células-tronco tumorais e na sobrevivência da célula [28]. Os níveis de Bmi-1 nos grupos expostos a acidez ficaram abaixo do grupo controle. Outro fator que pode explicar a baixa regulação de Bmi-1 nas células expostas a acidez neste estudo é que uma das suas funções é controlar o ciclo celular [27]. Nossos resultados demonstraram que, nos grupos experimentais expostos a acidez, houve uma redução da proliferação celular. Contudo, o papel de Bmi-1 em células de CEC de boca expostas ao meio ácido ainda não foi bem elucidado e necessita ser melhor explorado.

A resistência a quimioterápicos é outra consequência que a acidose provoca em tumores sólidos. Os mecanismos que mediam essa interação ainda não são bem explícitos na literatura. No entanto, já é sabido que o pH tem efeito direto na distribuição e absorção de drogas quimioterápicas por meio do mecanismo de aprisionamento de íons (*ion trapping* – efeito dos íons na distribuição de drogas) [29–31]. A Cisplatina é um quimioterápico ácido fraco – que se apresenta comercialmente como base fraca [32]. Drogas consideradas bases fracas, ao entrar em contato com o microambiente tumoral ácido, tornam-se protonadas fora da célula e não conseguem ser absorvidas e realizar sua função terapêutica. Nossos resultados demonstraram que, em pH ácido, as células foram mais resistentes, porém, quando houve diluição da droga em meio neutro para impedir o *ion trapping*, essa resistência foi parcialmente revertida, sugerindo que a resistência observada não pode ser explicada apenas pelo fenômeno de *ion trapping*.

Ao recondicionar por um período maior em meio neutro (7 dias), a sensibilidade foi totalmente revertida. Na comparação entre os grupos expostos a acidez, a expressão de Bmi-1 foi maior nos grupos “7D” e “21D” em comparação ao grupo “7+7D”. Esses grupos de exposição contínua à acidez, também se mostraram mais resistentes a Cisplatina. Tais

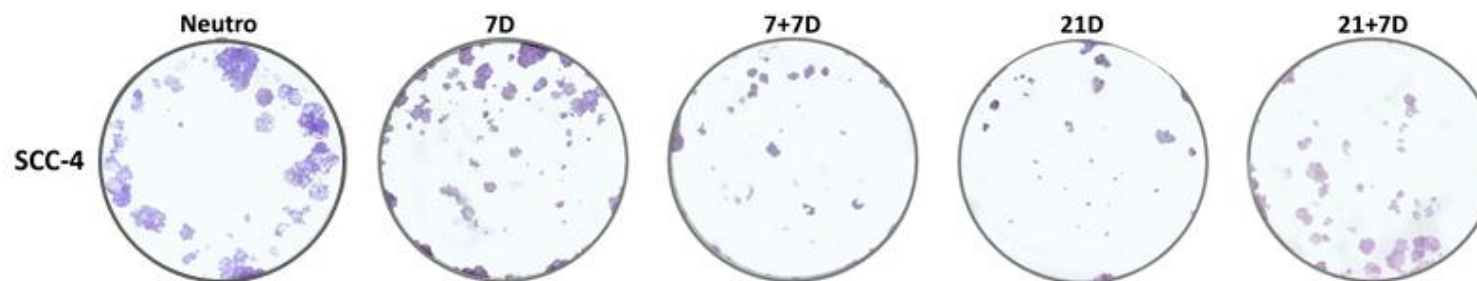
achados corroboram com o análise realizada por Nör et al (2014), onde verificaram que havia aumento na expressão de Bmi-1 em células resistentes a Cisplatina, quando comparados a células não resistentes a esses quimioterápicos.

Considerando que as condições do microambiente tumoral não são estáticas, mas sim muito dinâmicas, neste estudo, utilizamos dois sistemas para estudar o efeito do pH no comportamento celular: a exposição contínua à acidez e o condicionamento ao pH neutro. Observamos que a exposição contínua aumenta a resistência celular e, quando recondicionadas por um período de 7 dias, a resistência é revertida. Assim, podemos sugerir que uma alternativa terapêutica à resistência induzida pela acidose extracelular é a utilização concomitante de inibidores de bomba de prótons. A inibição da V-ATPase com o uso de Pantoprazol em células de câncer gástrico aumenta a sensibilidade à Cisplatina [33]. Porém, atuar restaurando o pH neutro do meio extracelular deve ser avaliado com cautela, visto que uma vez expostas à acidez, quando recondicionadas em pH neutro, as células tumorais tiveram sua capacidade migratória impulsionada.

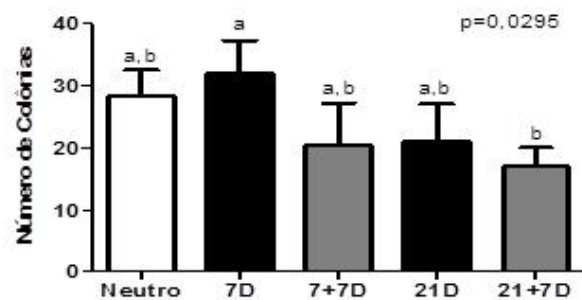
Após a análise do comportamento das células de câncer bucal, observamos que o pH ácido diminui o potencial de proliferação, aumenta a capacidade migratória, induz um fenótipo semelhante à célula-tronco tumoral e aumenta a resistência ao tratamento quimioterápico. Visto a capacidade da célula em se comportar de maneira agressiva, tanto em exposição contínua a acidez quanto no condicionamento em meio neutro, é imprescindível investir em medidas alcalinizantes de forma coadjuvante ao tratamento de tumor.

Figura 1 – A, ensaio clonogênico da linhagem SCC-4 nos diferentes grupos experimentais; B, quantificação do número de colônias nos diferentes grupos experimentais da linhagem SCC-4 (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey); C, ensaio da Suforadamina B para verificar a viabilidade celular nos diferentes grupos experimentais da linhagem SCC-4.

A)



C)



D)

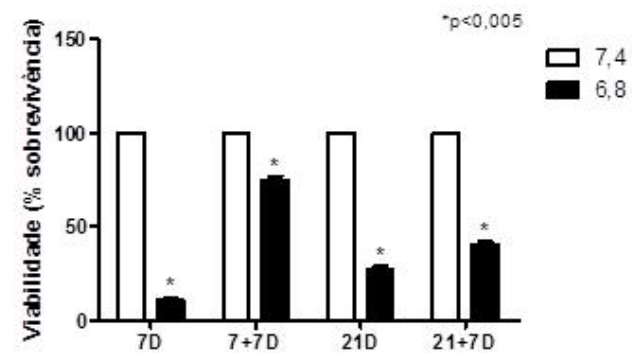


Figura 2 – Perfil migratório das linhagens SCC-4, SCC-9 e HaCat em microambiente ácido. A, Quadro comparativo entre os diferentes grupos do ensaio de cicatrização de feridas da células SCC-4; B, tabela comparativa do fechamento de feridas nos tempos de 10 e 24 horas (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey); C, comparação entre a distância e a velocidade média percorrida pelas células dos diferentes grupos experimentais(*p*, ANOVA, post-hoc Tukey); D, Aspecto morfológico das células SCC-4 expostas ao pH ácido por sete dias (seta branca) em comparação às células mantidas em pH 7,4; E, Quantificação por PCR em tempo real de N-Caderina e E-Caderina da linhagem SCC-4, os níveis de expressão foram normalizados para GPDH e B-actina (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey).

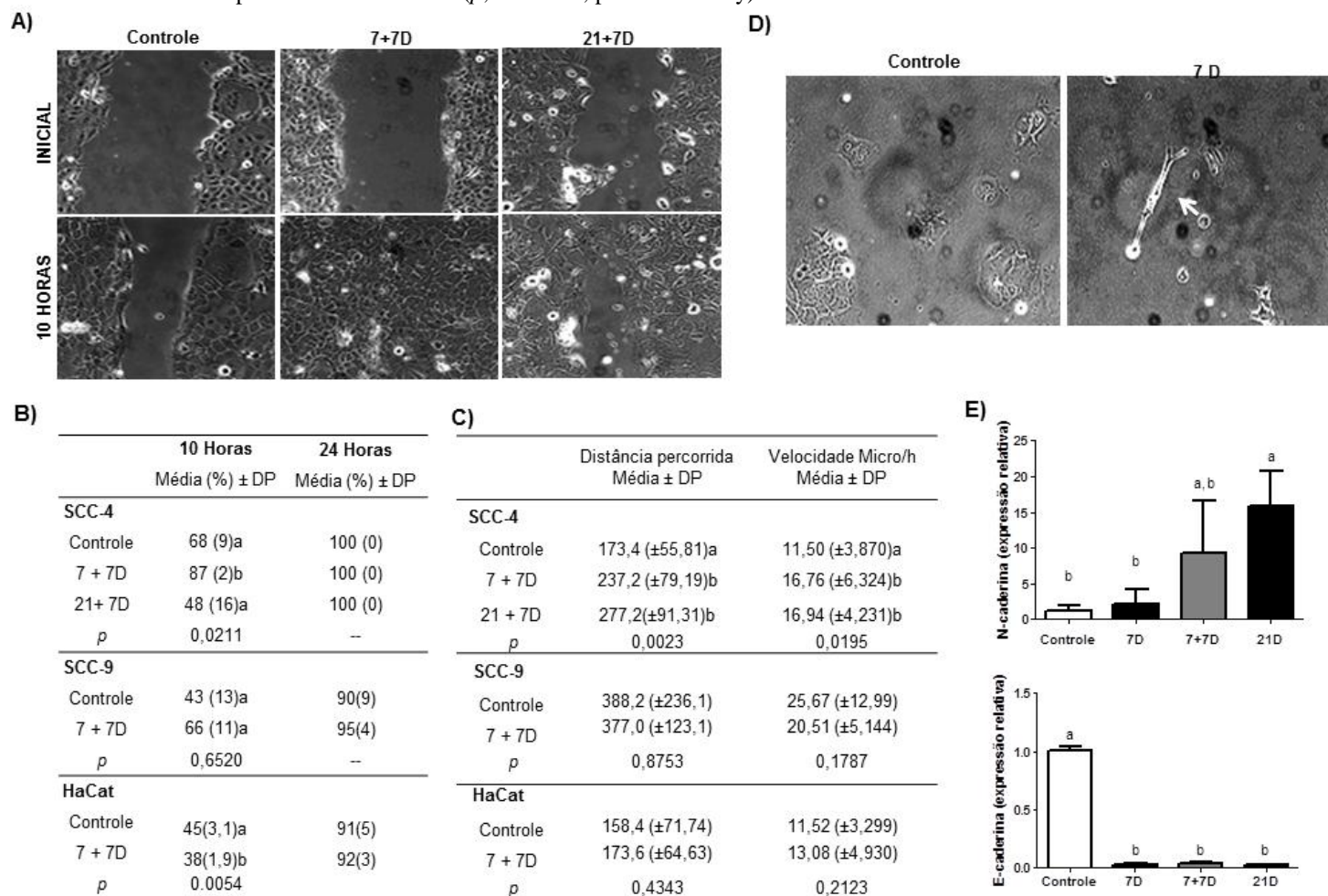


Figura 3 – Análise do perfil de população de células tronco tumorais nas linhagens de SCC-4 e SCC9. A, Quantificação do número de esferas formadas no período de 7 dias em placas de baixa aderência com agarose nos diferentes grupo experimentais nas linhagens SCC-4 e SCC-9 (p , ANOVA, post-hoc Tukey). B, Análise da expressão gênica de CD-44 e Bmi-1 por PCR em tempo real da linhagem SCC-4, os níveis de expressão foram normalizados para GPDH e B-actina (p , ANOVA, post-hoc Tukey).

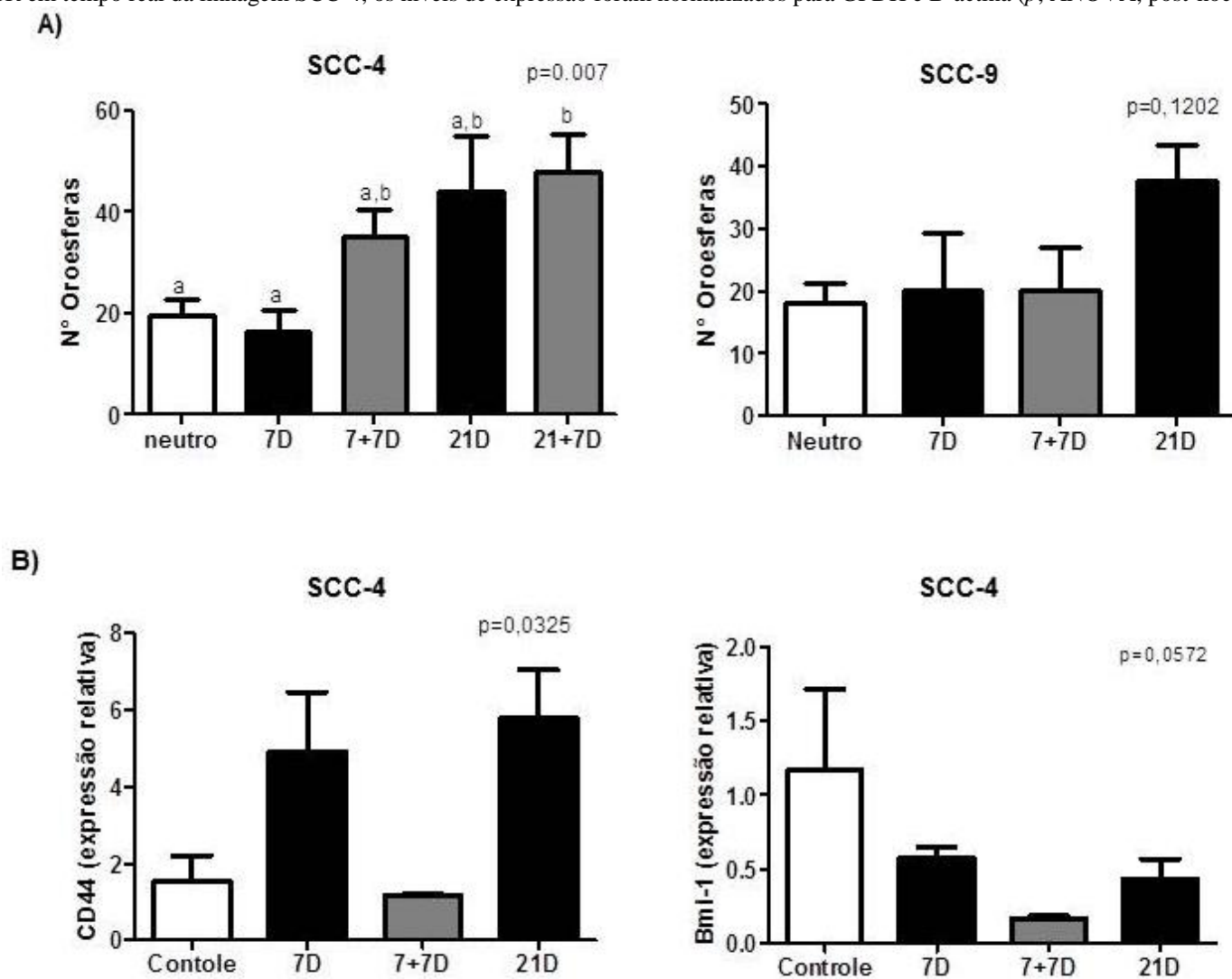


Figura 4 – A, Perfil de resistência ao quimioterápico cisplatina na linhagem de células SCC-4 para os grupos 7D e 21D. B, Resistência ao quimioterápico cisplatina com o grupo 21D com a droga diluído em meio neutro e resistência ao quimioterápico cisplatina com o grupo 7+ 7D (*p*, ANOVA de duas vias, post-hoc Bonferroni), *******p*<0,01, ********p*<0,001.

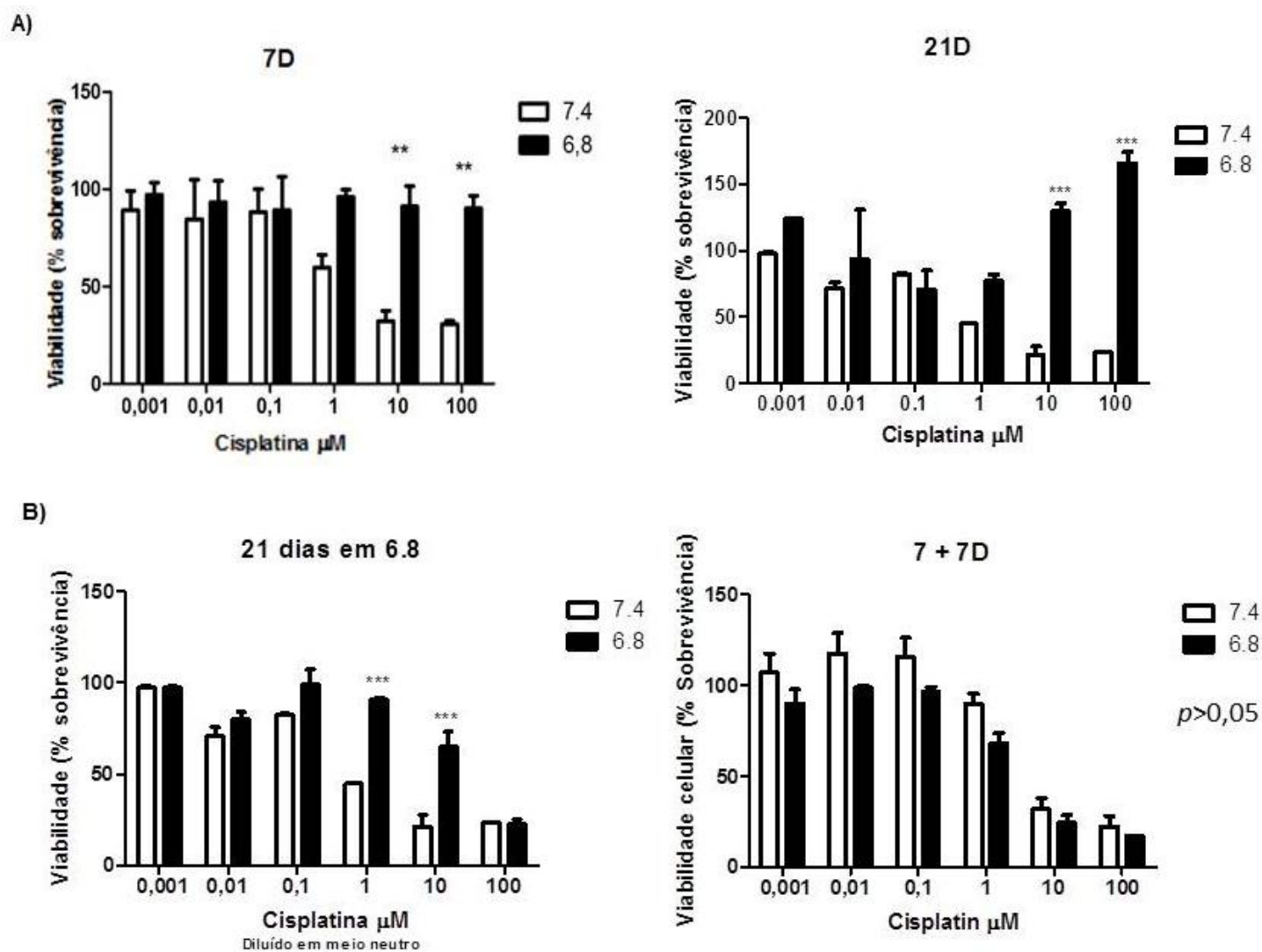
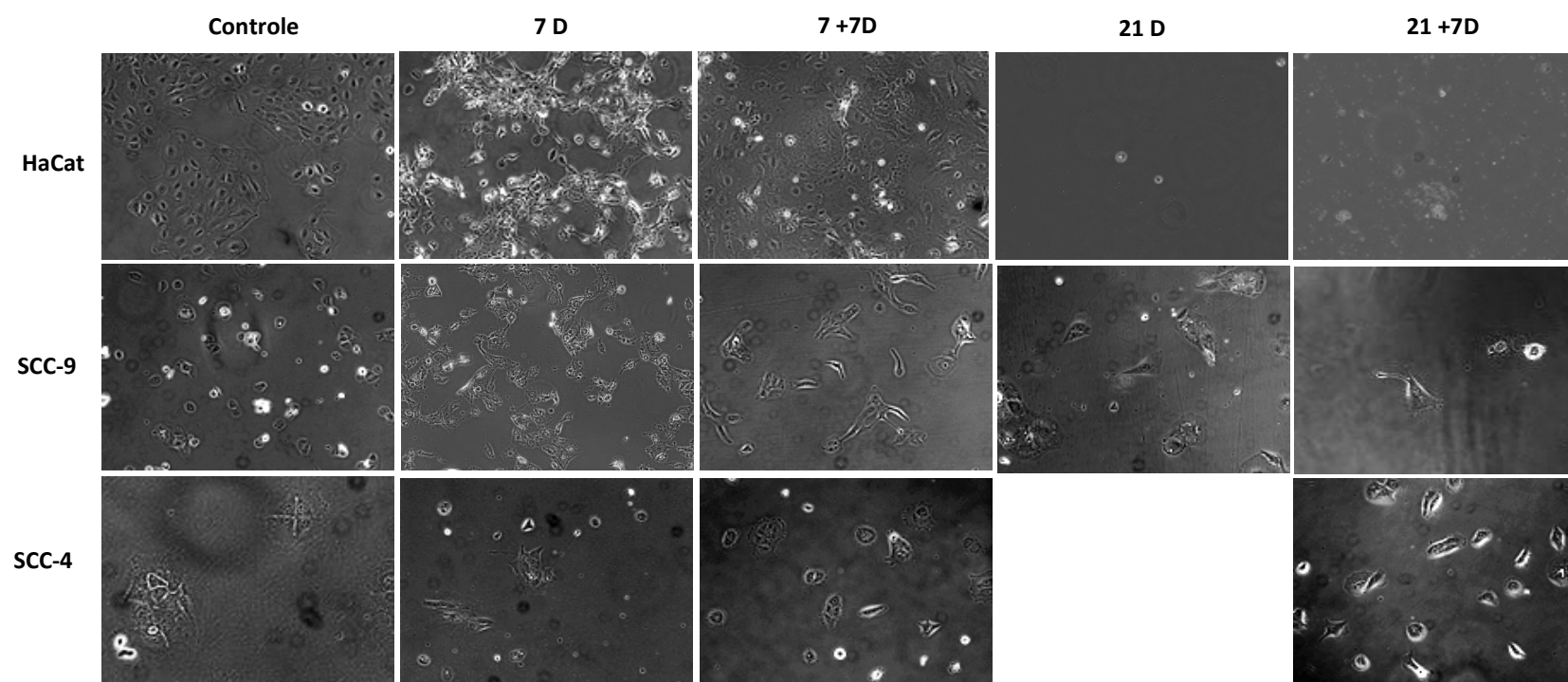
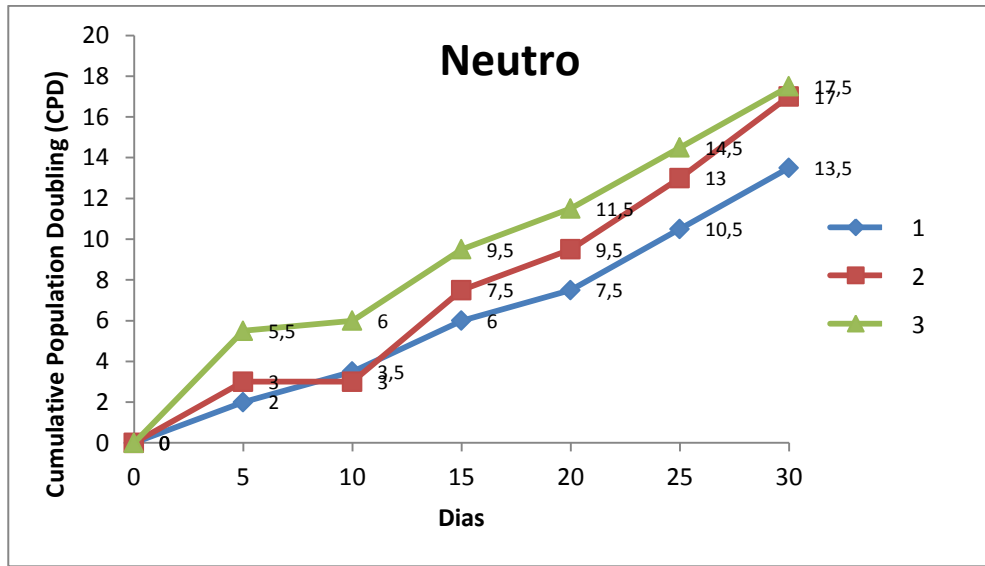


Figura suplementar 1 – A, Perfil morfológico das linhagens HaCat, SCC-9 e SCC-4 nos períodos de tratamentos utilizados nos grupos experimentais. B e C, Crescimento exponencial da população de células expostas ao meio neutro e ao meio ácido das células SCC-4 (Amostras em triplicatas – 1,2,3).

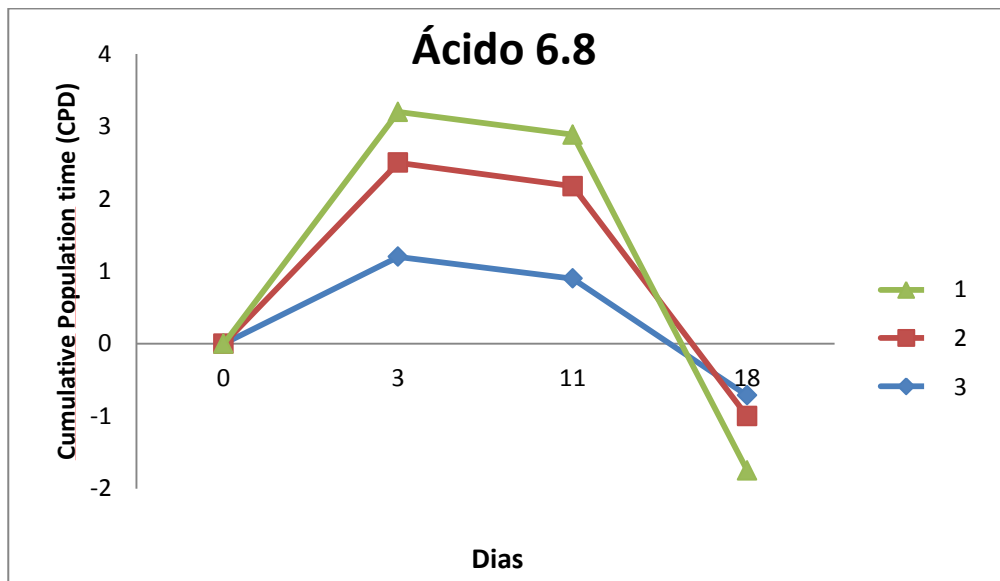
A)



B)



C)



5. Referências bibliográficas

- [1] Argiris A, Karamouzis M V, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* (London, England) 2008;371:1695–709. doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X.
- [2] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309–16.
- [3] Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suarez C, Owen RP, et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2010;267:1001–17. doi:10.1007/s00405-010-1206-2.
- [4] Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol* 2014;110:551–74. doi:10.1002/jso.23724.
- [5] Gore SM, Crombie AK, Batstone MD, Clark JR. Concurrent chemoradiotherapy compared with surgery and adjuvant radiotherapy for oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2014;37:518–23.
- [6] Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco 2000;100:57–70.
- [7] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [8] Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891–9. doi:10.1038/nrc1478.
- [9] Smallbone K, Gavaghan DJ, Gatenby RA, Maini PK. The role of acidity in solid tumour growth and invasion 2005;235:476–84. doi:10.1016/j.jtbi.2005.02.001.
- [10] Moeller RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:411–25. doi:10.1007/s10585-008-9145-7.
- [11] Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 2011;18:829–40. doi:10.1038/cdd.2010.150.
- [12] Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73:1524–35. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.
- [13] Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 2000;60:916–21.
- [14] Blatt S, Voelxen N, Sagheb K, Pabst AM, Walenta S, Schroeder T, et al. Lactate as a

- predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin Oral Investig* 2016. doi:10.1007/s00784-015-1699-6.
- [15] Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, et al. The Potential Role of Systemic Buffers in Reducing Intratumoral Extracellular pH and Acid-Mediated Invasion Extracellular pH and Acid-Mediated Invasion 2009;2677–84. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2394.
- [16] Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Sloane BF, Hashim AI, et al. NIH Public Access 2010;69:2260–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5575.Bicarbonate.
- [17] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006;8:59. doi:10.1186/bcr1610.
- [18] Gupta SC, Singh R, Pochampally R, Watabe K, Mo Y-Y. Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF- κ B pathway. *Oncotarget* 2014;5:12070–82. doi:10.18632/oncotarget.2514.
- [19] Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;1–21. doi:10.1038/nrclinonc.2016.60.
- [20] Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *J Craniofac Surg* 2007;18:1051–4. doi:10.1097/scs.0b013e3180de63eb.
- [21] Krishnamurthy S, Nor JE. Orosphere assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck* 2013;35:1015–21.
- [22] Peppicelli S, Bianchini F, Torre E, Calorini L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2014;31:423–33. doi:10.1007/s10585-014-9637-6.
- [23] Peppicelli S, Bianchini F, Toti A, Laurenzana A, Fibbi G, Calorini L. Extracellular acidity strengthens mesenchymal stem cells to promote melanoma progression. *Cell Cycle* 2015;14:3088–100. doi:10.1080/15384101.2015.1078032.
- [24] 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* 2009;69:2677–84. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2394.
- [25] Rothberg JM, Sameni M, Moina K, Sloanea BF. Live-Cell Imaging of Tumor

- Proteolysis: Impact of Cellular and Non-Cellular Microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824:123–132.
- [26] Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012;48:1–9. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.10.004.
- [27] Kang MK, Kim RH, Kim SJ, Yip FK, Shin K-H, Dimri GP, et al. Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. *Br J Cancer* 2007;96:126–33. doi:10.1038/sj.bjc.6603529.
- [28] Molofsky A V, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardoll R. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 2005;19:1432–7. doi:10.1101/gad.1299505.vageau.
- [29] Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1219–29. doi:10.1016/S0006-2952(03)00468-4.
- [30] Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1207–18. doi:10.1016/S0006-2952(03)00467-2.
- [31] Raghunand, Natarajan; Gilles RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat* 2000;3:39–47.
- [32] Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin 2007;63:12–31. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.02.001.
- [33] Huang S, Chen M, Ding X, Zhang X, Zou X. Proton pump inhibitor selectively suppresses proliferation and restores the chemosensitivity of gastric cancer cells by inhibiting STAT3 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2013;17:585–92. doi:10.1016/j.intimp.2013.07.021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entender os processos moleculares que mediam a progressão do câncer ainda é um desafio para a ciência. Trata-se de uma doença que possui extrema habilidade em criar mecanismos de adaptação, em desenvolver a capacidade de se expandir e sobreviver a diferentes tipos de ambientes. Por esse motivo é que o estudo dos fatores que influenciam a adaptação das células cancerígenas, como o microambiente tumoral, é de fundamental importância. O metabolismo do tumor é uma característica do microambiente do tumoral que resulta em acidez extracelular e vem sendo bastante discutido na última década, pelo papel que representa na progressão e na sobrevivência da célula cancerígena.

Apesar dos efeitos da acidez extracelular no câncer terem sido pouco estudados até o presente momento, os resultados dos estudos publicados têm demonstrado efeitos significativos na progressão de tumores sólidos. Conclui-se, portanto, que a acidez extracelular aumenta os potenciais de migração e invasão, assim como o risco de formar metástases, e acaba produzindo fenótipos mais agressivos que resiste a tratamentos quimioterápicos.

Entretanto, a literatura vem demonstrando que é possível utilizar estratégias terapêuticas capazes de diminuir os efeitos da acidez na progressão do câncer. Estudos *in vivo* comprovaram que o uso de substâncias tamponantes, como bicarbonato de sódio, em modelos animais leva à diminuição do tamanho do tumor e do número de metástases. Há também evidências que demonstram que uma dieta com alimentos alcalinos, como a dieta mediterrânea, pode reduzir o risco relativo do desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como, por exemplo, o de mama. Além disso, existe a evidência de estudos clínicos que visam inibir o metabolismo da glicose e, com isso, impedir a acidez do microambiente do tumor. Assim é possível constatar os potenciais terapêuticos que o conhecimento sobre o

metabolismo tumoral gera para o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento do câncer.

Embora tenha sido comprovado que o câncer de boca apresenta pH ácido, até o presente momento não há nenhuma análise do perfil do comportamento desse tumor frente à acidez. Com este estudo, constatou-se a influência da acidez extracelular no carcinoma espinocelular bucal quanto aos mecanismos de migração, indução de células-tronco tumorais e resistência a quimioterápicos. Desse modo, ressalta-se que a análise dos efeitos da acidez extracelular em carcinoma espinocelular de boca torna-se fundamental para garantir o uso de medicamentos e práticas tecnológicas capazes de diminuir as altas taxas de mortalidade, aumentar a sobrevida dos pacientes e reduzir a agressividade dos tratamentos.

Apesar de o modelo experimental de cultura de células bidimensional (2D) ser fundamental para a análise comportamental do câncer, deve-se levar em consideração as limitações da sua técnica. A desvantagem da cultura de células em 2D é que a mesma não oferece condições que mimetizam complexidade do microambiente tumoral. Para tentar simular o dinamismo do microambiente, nós realizamos nosso estudo expondo as células em meio ácido e as recondicionando em meio neutro. Ainda assim, entendemos que essa não seria a melhor maneira de confirmar os nossos resultados. Por esse motivo, pretendemos avançar as nossas investigações a partir de estudos prolongados em modelos animais.