

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

JÚLIA SILVEIRA NUNES

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS DE LINHAGEM DE CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE BOCA EXPOSTAS A UM MICROAMBIENTE ÁCIDO

Porto Alegre  
2018

JÚLIA SILVEIRA NUNES

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS DE LINHAGEM DE CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE BOCA EXPOSTAS A UM MICROAMBIENTE ÁCIDO

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

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre  
2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Júlia Silveira

Análise do comportamento das células da linhagem de carcinoma espinocelular de boca expostas a um microambiente ácido / Júlia Silveira Nunes. -- 2018. 45 f.

Orientadora: Fernanda Visioli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Câncer bucal. 2. Acidez tumoral. 3. Migração celular. 4. Resistência a quimioterápicos. 5. Pluripotência. I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Durante todos os meus 6 anos dedicados ao curso de Odontologia, fui muito além do aprendizado de técnicas de excelência. Diversas vezes tive dúvidas, angústias, cansaços e medos, mas sempre me mantive determinada e de cabeça erguida para seguir em frente. Hoje me torno Cirurgiã-Dentista e tenho certeza do amor que venho construindo por essa profissão.

Agradeço aos meus pais, Isabel e Edson, por me darem todo o suporte necessário para que eu chegasse até aqui, por sempre vibrar comigo toda e qualquer vitória e me ajudarem a aprender com os meus erros. Sem eles, nada disso seria possível!

Ao meu irmão, Wagner, que mesmo nunca morando comigo, não deixou faltar amor e preocupação fraternal.

Ao meu afilhado, Bernardo, por todos os abraços mais apertados e por fazer aflorarem em mim os sentimentos mais lindos.

A toda a minha família, por estar desde meu nascimento presente de forma ativa na minha vida mostrando que eu nunca estarei sozinha. Eu amo todos vocês!

Ao meu companheiro e grande amor, Marcos, por ser meu melhor amigo, apoiar e dividir comigo os meus sonhos e também por ter me dado uma segunda família.

Aos meus amigos e amigas por todas as risadas, festas e momentos bons que passamos juntos.

A todo grupo da Patologia e em especial ao grupo da Profª Fernanda, com o qual eu tenho certeza de que unidos levaremos a ciência longe.

Às duas pessoas com quem eu dividi arduamente esse trabalho de conclusão de curso, Viviane e Bianca. Tenho certeza que juntas aprendemos muito, descobrimos coisas

novas, vimos que a pesquisa no Brasil não é nada fácil, mas, principalmente, construímos uma grande amizade.

Por fim, à minha orientadora, Fernanda, por ter me dado a oportunidade de entrar no mundo da Patologia e me estimular a aprender cada vez mais. Ela é um exemplo de professora em quem eu me espelho diariamente.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

O microambiente tumoral é caracterizado por baixos níveis de oxigênio, diminuição dos nutrientes disponíveis e um pH tecidual ácido. Já foi demonstrado em tumores malignos sólidos que quanto mais ácido o pH tecidual, mais agressivo é o tumor. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o comportamento de células de carcinoma espinocelular bucal (SCC-4) expostas a um microambiente ácido. Foram comparadas as células expostas ao meio de cultura ácido (pH 6.8) de maneira contínua (7D e 21D) e com acondicionamento (7+7D e 21+7D) com células mantidas em meio de cultura neutro (pH 7.4). Nos ensaios para avaliação da adaptação celular frente ao pH acidificado observamos menos de 50% de sobrevivência celular nos tempos 7D e 21D e diminuição do número de colônias formadas após 7 dias de exposição. Houve aumento das taxas de apoptose no tempo 21D e diminuição nas taxas de necrose, sem alterações significativas na distribuição das diferentes fases do ciclo celular. Na avaliação da capacidade migratória para linhagem SCC-4, o tempo 7+7D teve 86,68% de fechamento médio da ferida no tempo 10h e uma maior velocidade individual média de percurso. A expressão relativa de marcadores característicos da transição epitélio-mesênquima mostrou aumento da expressão de N-caderina e diminuição da E-caderina, porém no tempo 21+7D a expressão de E-caderina aumentou. Características de indiferenciação celular foram avaliadas e a capacidade de formar oesferas em placas de baixa aderência foi maior no tempo 21+7D e a expressão gênica dos marcadores de célula-tronco tumoral CD44 e NANOG estava aumentada nos tempos 7D e 21D e para o marcador Bmi-1 essa diferença não foi significativa. As células apresentaram resistência ao tratamento quimioterápico com Cisplatina nos tempos 7D e 21D nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu$ M, mas esta resistência foi revertida nos tempos 7+7D e 21+7D sem diferença significativa entre as concentrações da droga. Concluímos que a acidez extracelular diminui a proliferação, induz a indiferenciação e a pluripotência, aumenta a resistência ao quimioterápico Cisplatina e após o acondicionamento ao pH neutro potencializa a capacidade migratória das células de carcinoma espinocelular de boca.

Palavras-chave: Câncer bucal. Acidez tumoral. Migração celular. Resistência a quimioterápicos. Pluripotência.

## ABSTRACT

The tumoral microenvironment is characterized by low levels of oxygen, nutrients deprivation and an acid pH tissue. It has already been demonstrated in solid malignant tumors that acidic pH tissue is associated with more aggressive tumors. Therefore, the objective of this study is to evaluate in vitro effects of the exposition of oral squamous cell carcinoma (SCC-4) to an acid microenvironment. It was compared cells exposed to acid culture medium (pH 6.8) continuously (7D and 21d) and intermittently (7+7D and 21+7D) with the cells maintained at neutral culture medium (pH 7.4). Investigating cell adaptation against acidified pH we observed less than 50% of cell survival at 7D and 21D times and a decrease in the number of colonies formed after 7 days of exposure. There was an increase in apoptosis rates at 21D time and a decrease in necrosis rates, without significant changes in cell cycle phase's distribution. In the evaluation of migratory capacity for SCC-4 cell line, 7 + 7D time had 86.68% mean wound closure at 10h and a higher individual migratory velocity. Relative expression of epithelial-mesenchymal transition markers showed increased N-cadherin expression and decreased E-cadherin, but at 21 + 7D time E-cadherin expression increased. Characteristics of cell indifferenciation were evaluated and the capacity to form orospheres on low adhesion condition was greater at time 21 + 7D and the gene expression of CD44 and NANOG tumor stem markers was increased at the 7D and 21D times, withouth significance in Bmi-1 expression. The cells became resistant to Cisplatin at 7D and 21D times in 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M and 100  $\mu$ M concentrations, but this resistance was reversed at 7 + 7D and 21 + 7D times with no significant difference between drug concentrations. We conclude that extracellular acidity decreases proliferation, induces indifferenciation and pluripotency, increases resistance to the chemotherapeutic Cisplatin and after reconditioning at neutral pH potentiates the migratory capacity of oral squamous cell carcinoma.

**Keywords:** Oral cancer. Tumor acidity. Cell migration. Resistance to chemotherapy. Pluripotency.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>09</b>
1.1	INVASÃO TUMORAL E METÁSTASE.....	14
1.2	INDIFERENCIAÇÃO E PLURITOTÊNCIA.....	15
1.3	RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>



## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Considerado um problema de saúde pública importante, o câncer é uma das principais causas de morte da população mundial. Estima-se um aumento em 20% da incidência desta doença na última década e projeta-se o diagnóstico de mais de 27 milhões de novos casos no mundo até o ano de 2030 (WARNAKULARUSUYA et al. 2010; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). De acordo com os últimos dados do Instituto Nacional do Câncer, durante o biênio 2016-2017 surgirão cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O câncer da cavidade oral pertence ao conjunto de tumores que acometem a região de cabeça e pescoço. Nesse contexto, o carcinoma espinocelular ou epidermóide de boca é a neoplasia maligna da cavidade oral 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; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O câncer de boca está entre os tipos mais comuns de neoplasias malignas que atingem a população brasileira ocupando o quinto lugar em prevalência em homens e o décimo segundo lugar em mulheres. Estima-se que em 2016 surgiram no Brasil 11.140 novos casos da doença em homens e 4.350 em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Apesar dos grandes esforços e dos avanços em pesquisa nessa área, o tratamento quimioterápico é coadjuvante e ainda baseia-se, principalmente, na atividade proliferativa das células tumorais, resultando em uma redução temporária e pouco significativa do tamanho da massa tumoral. No entanto, na grande maioria dos casos, o tumor volta a crescer e se torna resistente à droga previamente administrada. Por essa razão, a remoção cirúrgica agressiva, por vezes mutiladora, permanece como abordagem predominante no tratamento dos pacientes portadores dessa neoplasia, mesmo com a doença em estágios iniciais (SCIUBBA, 2001; FURNESS et al., 2011).

Dessa forma, sabe-se que, atualmente, a quimioterapia não traz melhora significativa na sobrevida dos pacientes (FURNESS et al., 2011). Além disso, dados recentes da literatura têm demonstrado taxas de sobrevida variando entre 46 e 54% em 5 anos, e mantendo-se inalteradas há décadas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016; PEIXOTO et al., 2011).

Um grande número de pesquisas científicas tenta encontrar soluções mais eficazes para o tratamento desta doença e diminuir sua alta taxa de mortalidade. No entanto, a concretização de tal desfecho ainda se mantém um desafio e acredita-se que isto se deva à grande complexidade e dinamicidade do processo de carcinogênese, o qual necessita de muitos estudos para o alcance de sua total compreensão (SMALLBONE et al., 2005; HANNAH; WEINBERG, 2011).

Uma das formas para melhor entendimento deste processo é a consideração do câncer como um microambiente tumoral e não estritamente como um conjunto de células geneticamente modificadas e com taxas proliferativas alteradas. Nesta concepção, o tumor é parte de um ambiente no qual ocorrem interações entre as células cancerosas e o estroma que envolve: os fibroblastos, as células endoteliais e as células do sistema imune, bem como um conjunto de alterações metabólicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; GILLIES et al., 2002; ONUCHIC et al., 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; ADJEI; BLANKA, 2015). Através da interação com as células tumorais, o componente estromal ajuda a promover o crescimento e progressão do tumor (EREZ et al., 2010; ADJEI; BLANKA, 2015).

Uma característica marcante do microambiente tumoral é a acidificação do meio extracelular, o qual pode atingir valores significativamente baixos. (BRIZEL et al., 2001; GILLIES et al., 2002; SMALLBONE et al., 2005; MOELLERING et al., 2008; SILVA et al., 2009; FANG; GILLIES; GATEMBY, 2008; ZHANG; LIN; GILLIES, 2010; HJELMELAND et al., 2010; KATO et al., 2013; ZHOU; LIOTTA; PIETRICOIN, 2015). 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 o pH tecidual normal situa-se entre de 7,4-7,5.

Esta acidificação do microambiente tumoral pode ocorrer devido ao não acompanhamento da neoformação vascular frente à intensa proliferação das células

cancerosas, gerando quadros de hipóxia e levando as células tumorais a inverterem seus passos normais de produção de energia. Ou seja, o destino do piruvato produzido na glicólise passa a ser o da fermentação láctica e não mais o 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 (SMALLBONE et al., 2005; JUSTUS; DONG; YANG, 2013).

Sabe-se que o mecanismo de produção de energia ocupa uma posição central no metabolismo das células, plantas e microorganismos. Tal processo é liderado pela quebra da molécula de glicose (glicólise), cujo produto final são duas moléculas de piruvato. Essas moléculas de piruvato podem ter três destinos diferentes, os quais são: ciclo de Krebs, cujo produto secretado é essencial para iniciar a fase da fosforilação oxidativa e gerar energia para uma célula eucarionte em condições aeróbicas, nesse processo o produto final é em torno de 30 a 32 moléculas de ATP; fermentação alcoólica, uma via utilizada para produzir energia em ambiente anaeróbico que tem como produto final o etanol; e a fermentação láctica que também é uma via é utilizada em ambientes anaeróbicos, secreta o ácido láctico e produz apenas duas moléculas de ATP na sua fase final (CAMPBELL, 2000; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2013; NELSON; COX, 2014).

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

Apesar de a hipóxia contribuir para a acidificação tumoral, isso nem sempre está presente em tumores agressivos. Este fenômeno foi primeiramente descrito por “Otto

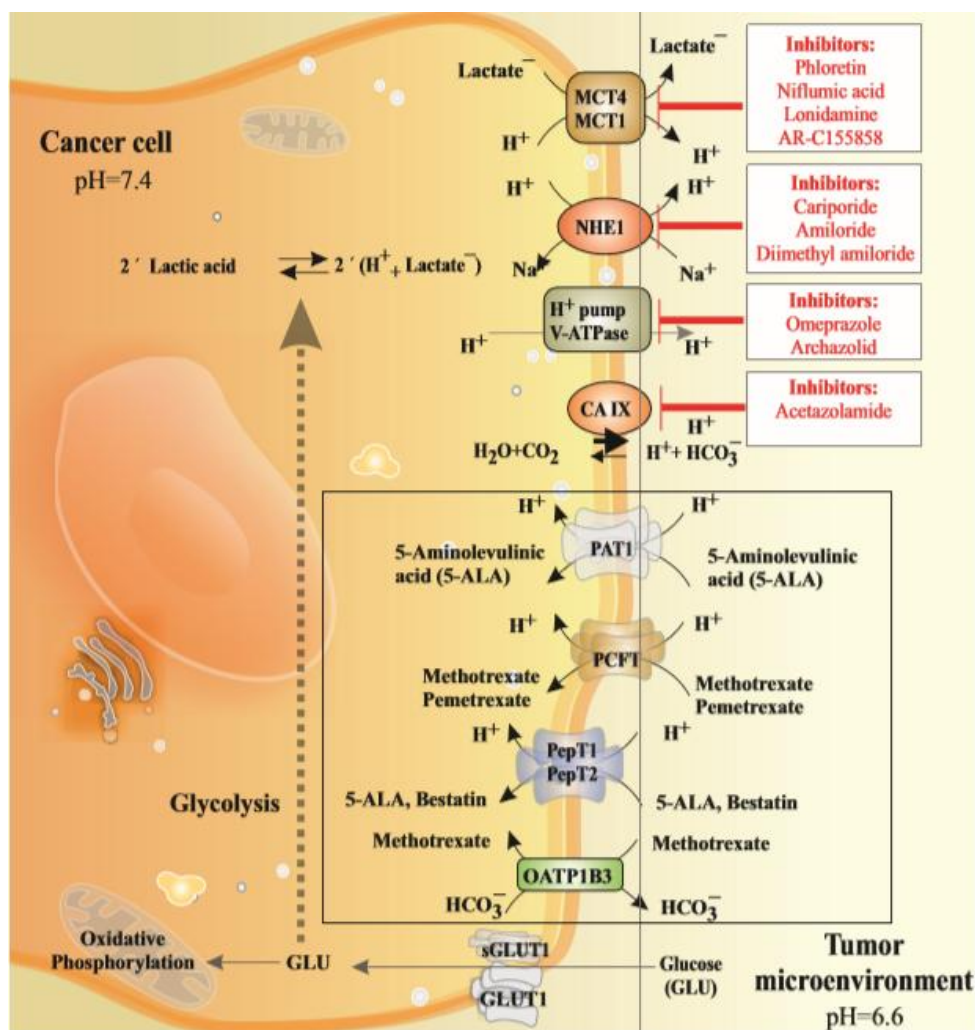
Warburg” em 1930. O efeito Warburg, que identificou a presença de glicólise e fermentação láctica mesmo em situações de normóxia em tumores, indica que a acidificação tumoral pode acontecer independentemente da hipóxia. Portanto, a acidificação pode ser uma característica intrínseca do metabolismo tumoral, que provavelmente oferece uma vantagem competitiva sobre as células (GILLIES et al., 2002).

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

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

Na Figura 1 observa-se que 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), acidificando o citoplasma. O AL é colocado para fora da célula por meio de transportadores, tais como:  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  (NHE1); transportadores monocarboxilato (MCT 1 e 4); Anidrase carbonica IX (IX CA) e  $\text{H}^+$  V-ATPase bomba. Estas maquinarias de transporte poderiam ser inativadas com inibidores específicos, descritos nas caixas vermelhas da Figura 1. As células cancerosas mantêm o pH intra e extracelular em 7.4 e 6.6, respectivamente. Por fim, o transporte de alguns quimioterápicos é realizado por transportadores de superfície celular, os quais estão inseridos na caixa preta da Figura 1.

Figura 1 – Representação dos reguladores chave do pH e os principais mecanismos de transporte envolvidos na condução de quimioterápicos em tumores sólidos.



Fonte: Adaptado de BARAR; OMID, 2013, p. 158.

Devido à importância da acidificação do microambiente, diferentes modalidades terapêuticas estão sendo consideradas para manipular o pH tumoral: terapia alcalinizante para aumentar o pH do ambiente extracelular; a inibição de bombas de prótons diminuindo o pH intracelular das células tumorais, e assim aumentando o pH extracelular; entre outras (FIGURA 1) (ROBEY et al., 2009; MCCARTY; WHITAKER, 2010). Modelos de estudos experimentais *in vivo*, nos quais são testadas terapias para aumentar o pH do ambiente tumoral, têm demonstrado resultados significativos (ROBEY et al., 2009; SHERIDAN et al., 2006; SILVA et al., 2009). Robey et al. (2009) verificaram que, em camundongos, o tratamento de tumores de mama com intuito de

augmentar o pH tecidual com bicarbonato de sódio esteve associado com a redução da invasão, ratificando a possibilidade terapêutica da manipulação do pH.

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

## 1.1 INVASÃO TUMORAL E METÁSTASE

Já foi demonstrado por alguns estudos que o baixo pH da massa tumoral resulta em um comportamento invasivo das células tumorais (ROZHIN et al., 1994; MARTINEZ-ZAGUILAN et al., 1996; ROCHEFORT et al., 2000; ROFSTAD; DANIELSEN, 1999; SMALLBONE, 2005; ESTRELA et al., 2013) e, conseqüentemente, em maiores taxas de metástases (SCHLAPPACK; ZIMMERMANN; HILL, 1991; BENNETT et al., 1994). Além disso, estudos também demonstraram que os tumores metastáticos têm o microambiente tumoral mais ácido do que os de tumores primários (FANG; GILLIES; GATEMBY, 2008; MOLLERING et al., 2008).

O mecanismo de invasão no processo de carcinogênese envolve diversos mecanismos celulares interligados entre si que ainda não foram bem elucidados na literatura (MOLLERING, 2008). Já é sabido que proteínas que estão envolvidas no processo de remodelação do tecido, as metaloproteinases (MMPs), têm um papel crucial na invasão de células cancerígenas. Acredita-se que o microambiente ácido também possa interferir nos processos de degradação de matriz extracelular e de invasão, a partir da ativação dessas enzimas proteolíticas. Quando expostas a um ambiente ácido, a expressão das MMPs aumenta, assim como a expressão das enzimas ativadoras de plasminogênio (catepsinas e uroquinase), sendo estas últimas as responsáveis, junto com outros receptores específicos, por secretar as MMPs. Considerando o papel importante das MMPs na invasão do tumoral, conclui-se que a acidez do microambiente pode levar a uma maior taxa de invasão celular e, conseqüentemente, a um maior risco de metástase (SOUNNNI; NOEL, 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Mollering et al. (2008) verificaram que a exposição de linhagens de células de melanoma à um meio ácido pode alterar o fenótipo celular e aumentar o potencial invasivo. Para tal análise, os autores expuseram esta linhagem a um baixo pH (6.7) durante 1, 2 e 3 meses e após cada mês as recondicionaram ao pH neutro (7.4), as quais foram comparadas às células cultivadas em pH neutro (7.4) continuamente. Os resultados desse estudo demonstraram que houve um aumento significativo do potencial de invasão celular, principalmente no tempo de exposição por 2 e 3 meses. Tais efeitos implicam em uma forte associação do baixo pH com o processo de invasão tumoral.

## 1.2 RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

A resistência tumoral ao tratamento quimioterápico pode ser originada a partir de fatores bioquímicos e fisiológicos (MAHONEY et al., 2003). Dentre os fatores fisiológicos, acredita-se que o pH do microambiente tumoral ocupa um importante papel para tal fato. A acidez no tumor sólido pode afetar o gradiente iônico celular prejudicando a distribuição das drogas e também pode modificar o fenótipo das células tumorais, deixando-as mais resistentes aos tratamentos quimioterápicos por aumentar a resistência celular à apoptose (MAHONEY et al., 2003; DE MILITO; 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 através da membrana plasmática da 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.

### 1.3 INDIFERENCIAÇÃO E PLURIPOTÊNCIA

Estudos *in vitro* em linhagens de células tumorais demonstraram que a exposição das mesmas a um ambiente ácido favorece um fenótipo mais agressivo (BRIZEL et al., 2001; FANG; GILLIES; GATEMBY, 2008; HJELMELAND et al., 2011). Hjelmeland et al. (2011) observaram que células tumorais de gliomas cultivadas em pH ácido tiveram seus fenótipos alterados, com um aumento significativo na proporção de células com características tronco-tumorais, quando comparadas às células cultivadas em pH neutro, concluindo que o microambiente ácido tumoral contribui para um pior prognóstico de gliomas.

Existem marcadores para o estudo da população de células tronco tumorais em carcinoma espinocelular de boca. Dentre eles encontramos o Bmi-1, Nanog e CD44. 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).

A proteína Nanog é um fator de transcrição expresso em células embrionárias. A sua expressão também tem sido encontrada nos cânceres de mama, colorretal, gástricos e carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. Em estudos com carcinomas espinocelulares, percebe-se que, quanto mais indiferenciado é o tumor, maior é a expressão desta proteína (CHIOU et al., 2008). Por este motivo, e por



também apresentar alta expressão em metástases quando comparado a carcinomas primários, a sua presença é relacionada a um pior prognóstico para o paciente (CHIOU et al., 2008; WATANABE et al., 2014).

Já 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 possível marcador de célula 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. A análise do comportamento das células de linhagens de carcinoma espinocelular bucal expostas a diferentes tratamentos com meio de cultura acidificado, no que diz respeito à migração celular, à resistência ao tratamento quimioterápico e a proporção de células com expressão gênica compatível com células tronco tumorais, se faz necessária no estabelecimento do grau de influência do microambiente tumoral ácido sobre o comportamento das células tumorais do carcinoma espinocelular bucal.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar, *in vitro* o comportamento de células de carcinoma espinocelular bucal da linhagem SCC-4 quando expostas a um microambiente ácido.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar a adaptação das células de carcinoma espinocelular bucal frente ao microambiente ácido através da análise da viabilidade celular e de alterações no ciclo celular;
- b) avaliar a capacidade de migração individual e coletiva das células de linhagens de carcinoma espinocelular de boca e de queratinócitos humanos expostas a um microambiente ácido;
- c) avaliar a indiferenciação e pluripotência das células de carcinoma espinocelular bucal após a exposição ao microambiente ácido;
- d) avaliar os efeitos da exposição a um microambiente ácido na resistência ao tratamento quimioterápico de células de carcinoma espinocelular bucal.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito será submetido ao periódico Cancer Letters (ISSN: 0304-3835)

#### **Acidic microenvironment increases aggressiveness of oral squamous carcinoma**

Júlia Silveira Nunes; Viviane Palmeira da Silva; Bianca de Bem Prunes e Fernanda Visioli.

#### **Highlights**

- Acid exposure decreases SCC-4 cell line proliferation;
- Previous acidic stress potentiates migratory SCC-4 cell line capacity when cells are reconditioned in neutral pH;
- Acid exposure induces indifferenciation and pluripotency of oral squamous cell carcinoma;
- Acid exposure increases the chemoresistance of SCC-4 cell line to Cisplatin.

#### **Abstract**

The tumor microenvironment is characterized by an acid pH tissue. It has already been demonstrated in solid malignant tumors that acidic pH tissue is associated with more aggressive tumors. Therefore, our objective was to evaluate in vitro effects of the exposition of oral squamous cell carcinoma cells (SCC-4) to an acid microenvironment. Tumor cells were exposed to acid culture medium (pH 6.8) at different experimental times and compared with cells maintained at neutral culture medium (pH 7.4). We observed decreased cell proliferation after 7 days of exposure, which was followed by an increased apoptosis rates in 21 days and decreased necrosis rates. Cells increased collective and individual migratory capacity on the group exposed to pH 6.8 during 7 days and reconditioned to pH 7.4 for more 7 days. Higher numbers of spheres formation and higher rates of CD44 and Nanog expression were observed as well an increased resistance to Cisplatin. Although, it was reversed when the cells returned to pH 7.4. We conclude that extracellular acidity decreases proliferation, induces indifferenciation, increases resistance to chemotherapy and, after reconditionation, potentiates the migratory capacity.

#### **Keywords**

Oral cancer. Tumor acidity. Cell migration. Resistance to chemotherapy. Pluripotency.

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de boca (CEC) é uma das neoplasias mais frequentes na região de cabeça e pescoço e se caracteriza pelas suas baixas taxas de sobrevida – em torno de 50% em 5 anos [1,2]. Além disso, grande parte dessas lesões é diagnosticada tardiamente, nas quais o tratamento de primeira escolha é a ressecção cirúrgica, seguido de radioterapia e quimioterapia como tratamentos coadjuvantes [3-5]. Apesar de a terapia quimioterápica ser eficaz em outros tipos de câncer do corpo humano, o seu uso para o CEC ainda não é efetivo [5]. Nesse contexto, entende-se a necessidade pela busca de terapias mais efetivas, fazendo-se necessário melhor compreender o comportamento biológico do CEC.

Atualmente, o câncer passou a ser compreendido não mais como um simples conjunto de células alteradas e com alta taxa proliferativa, mas, sim, a partir da ideia da existência de um microambiente tumoral no qual ocorrem diversas interações celulares e alterações metabólicas [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 tem de inverter o metabolismo glicolítico, deixando de produzir sua energia através da fosforilação oxidativa e passando a utilizar a via da fermentação láctica. A implicação desta inversão é que as células necessitam de mais reações de glicólise para produção da energia necessária para sua sobrevivência. Como consequência, as células liberam para o meio extracelular uma grande quantidade de íons de hidrogênio e lactato, diminuindo seu pH e o tornando ácido [7,8].

Em um primeiro momento, esta inversão se dá em resposta à hipóxia em algumas regiões da massa tumoral. No entanto, em tumores já bem estabelecidos e com aporte vascular foi descrito o fenômeno chamado de ‘glicólise aeróbica’. Ou seja, mesmo na presença de oxigênio, as células malignas optam pela via da fermentação láctica, sugerindo que a acidificação confere vantagens adaptativas a essas células [9,10].

Neste contexto, a exposição crônica da célula tumoral à acidez pode resultar numa seleção de células tumorais com fenótipos mais agressivos [11-14]. Já foi

descrito na literatura que células de melanoma, câncer de mama, próstata, pulmão, entre outros, quando expostas ao pH ácido, podem: aumentar a capacidade de invasão, migração e metástases; adquirir características semelhantes a células tronco-tumorais e diminuir a sensibilidade a quimioterápicos. Estudos *in vivo* demonstram 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 a acidez ainda não foi elucidado. 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 fénótipo de célula tronco tumoral e da resistência a quimioterápicos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Cultivo Celular**

Foram utilizadas as linhagens de células tumorais de carcinoma espinocelular de boca, SCC-4 (Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ), e de Queratinócitos Humanos, HaCat (Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ). As células foram divididas em três grandes grupos: o Grupo 1 teve exposição contínua ao pH neutro (pH 7.4) e foi considerado o controle; o Grupo 2 teve exposição contínua por 7 e 21 dias ao pH acidificado (pH 6.8) e foi chamado de 7D e 21D, respectivamente; e o Grupo 3 teve exposição ao pH acidificado (pH 6.8) por 7 e 21 dias e foi recondicionado ao pH neutro por 7 dias, sendo, respectivamente, chamado de 7+7D e 21+7D. O meio de cultura neutro teve como base meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 12100046, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific, 12657FBS), 5mM de HEPES (Thermo Scientific, 15630080), 3,7g de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich,

S5761, St. Louis, Missouri, EUA), 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Thermo Scientific, 15240062). O meio de cultura acidificado teve como base 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). O controle do pH foi mensurado com pHmetro (Analion, Ribeirão Preto, SP, Brazil, PM608). Todos os grupos foram mantidos em ambiente úmido a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub> e tiveram seu crescimento celular monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Biostar, American Optical). Após a conclusão dos diferentes tempos experimentais, foram desempenhados os ensaios, os quais foram realizados em triplicata e analisados por um único avaliador cego.

## **2.2. Análise do Ciclo**

2x10<sup>5</sup> células foram coradas com solução detergente (hipotônica) para marcação de DNA com iodeto de propídio (PI). Para tal foi adicionado 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma Aldrich, 100229409), TritonX a 0,1% (Sigma Aldrich) e solução de citrato de sódio 0,1% (Sigma Aldrich) e lido em citômetro de fluxo (Attune Nxt).

## **2.3. Ensaio de Apoptose/Necrose**

Células (1x10<sup>5</sup>) foram induzidas com peróxido de hidrogênio para apoptose (2mM) e para necrose (4mM) 4 horas antes para controle do experimento. Todo o conteúdo oriundo do meio de cultura presente, da lavagem com PBS e da tripsinização foi recolhido em um tubo Falcon e centrifugado. O sobrenadante foi resuspenso com *Binding Buffer* (BD) e 100 µL da solução foi transferida para um microtubo, onde se adicionou 5 µL anexina (BD) e 5µL de PI (50µg/mL). Após incubação, se adicionou 400 µL de Binding Buffer e realizou-se a leitura no citômetro de fluxo (Attune Nxt).

## **2.4. Ensaio Clonogênico**

Foram semeadas 1000 células por poço em uma placa de seis poços, utilizando meio de cultura neutro. Após sete 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). Consideravam-se colônias aglomerados celulares com mais de 50 células, as quais foram contabilizadas em microscópio invertido.

### **2.5. Ensaio de Oroesferas**

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, seguindo protocolo publicado anteriormente [21]. Sete dias após, o número de colônias foi quantificado no microscópio invertido e foram consideradas orosferas as colônias não aderentes que possuíam  $\geq 25$  células.

### **2.6. PCR em tempo real**

Foi comparada a expressão gênica de marcadores de células tronco-tumorais (Bmi-1, CD44 e Nanog) e de transição epitélio-mesênquima (E-Caderina e 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), Nanog (Hs04260366\_g1), E-caderina (Hs01023894\_m1); N-caderina (Hs00983056\_m1). Todas as reações foram realizadas em triplicatas e normalizadas para GAPDH (Hs02758991\_g1).

### **2.7. Ensaio de cicatrização de ferida**

Para avaliar a migração das células tumorais, foram realizados os ensaios de cicatrização de ferida nos quais as células foram semeadas na concentração de  $7 \times 10^5$  e, após atingirem confluência, dois riscos formando uma cruz no centro da placa foram produzidos com o auxílio de uma ponteira branca. As células receberam três lavagens com PBS e foi adicionado meio de cultura neutro (pH 7.4). 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.

### **2.8. Ensaio *time lapse***

O padrão de migração individual das células foi analisado utilizando-se o ensaio de *time lapse*. Para tanto, as células foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^5$  e, após terem aderido à superfície da placa, a mesma foi preenchida com meio de cultivo

neutro (pH 7.4) e teve sua tampa vedada com vaselina sólida. Em um microscópio invertido, uma área contendo entre dez e vinte células foi selecionada e o vídeo time lapse foi realizado a partir da obtenção de uma fotografia a cada dez minutos ao longo de um intervalo de vinte horas. O material obtido foi analisado e a movimentação de cada célula na placa foi mapeada no software ImageJ.

### **2.9. Ensaio da Sulforodamina B**

As células foram semeadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Vinte e quatro horas depois foi adicionada a Cisplatina (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 no leitor de microplacas a 560 nm. Os resultados foram normalizados contra a densidade de células semeadas no controle inicial e livre de drogas.

### **2.10. 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**

### **3.1. A exposição crônica à acidez altera o perfil morfológico das células e diminui a capacidade proliferativa.**

Observamos alterações morfológicas do aspecto celular após a exposição à acidez nas células da linhagem SCC-4. As células perderam o aspecto poligonal e demonstraram uma aparência achatada e fusiforme, e quanto maior o período de exposição à acidez, maiores são as proporções de vacúolos e deformidades arquitetônicas (Fig. 1A). Estas alterações são acompanhadas por alta taxa de morte celular. Os tempos 7D e 21D apresentaram menos de 50% de células viáveis. Porém, quando as células são recondicionadas ao meio de cultura neutro, recuperam a viabilidade (Fig. 1B).



Houve também uma diminuição das taxas de proliferação celular após 7 dias de exposição ao meio de cultura acidificado, já que houve uma maior formação de colônias no grupo Controle e no tempo 7D (Fig. 1C e 1D). Não observamos alterações estatisticamente significativas em relação à distribuição das diferentes fases do ciclo celular nos tempos experimentais estudados (Fig. 1E). Em relação à análise do percentual de células em apoptose e necrose, observa-se um aumento do percentual de células em apoptose no tempo 21D se comparado ao controle e um menor percentual de células em necrose nos grupos testes em relação ao controle, a não ser no grupo 21+7D (Fig. 1F). Tais resultados demonstram que a exposição ao pH ácido é um estressor celular que diminui as taxas de proliferação.

### **3.2. A acidez extracelular aumenta a migração de linhagens de CEC de boca.**

Os resultados relacionados à migração coletiva das células SCC-4 demonstram que no tempo de 10h, o tempo experimental 7+7D apresentou maior fechamento da ferida, mostrando 86,68% de fechamento enquanto o grupo controle apresentou 67,94%. (Fig. 2A e 2C). Já na análise de migração individual das células, por meio de vídeos time-lapse, observou-se que o grupo 21+7D teve uma maior distância média percorrida se comparado ao controle e grupo 7+7D apresentou uma maior velocidade média de percurso se comparado ao controle para a linhagem SCC-4 (Fig. 2D). Para verificar se tais achados se reproduziam em células normais, utilizamos a linhagem de queratinócitos HaCat. Observamos que o grupo controle teve maior percentual de fechamento médio da ferida no tempo 10h, sendo de 45% enquanto que o tempo experimental 7+7D obteve 38% (Fig. 2B e 2C). No entanto, no ensaio de time-lapse não houve diferenças significantes para a linhagem HaCat (Fig. 2D). Não foi possível testar o tempo de exposição mais longo (21+7D) para as células HaCat pois estas células não sobreviveram.

Associando o aumento da capacidade migratória e as alterações morfológicas, investigamos a seguir se a exposição ao meio ácido induziu um fenótipo de célula mesenquimal. Para investigar a transição epitélio-mesênquima, foi avaliada a expressão gênica de marcadores epiteliais e mesenquimais nas células SCC-4. Observou-se aumento da expressão de N-caderina e diminuição de E-caderina, porém

quando as células foram expostas por 21 dias e recondicionadas ao meio neutro a expressão de E-caderina foi retomada (Fig. 2E).

### **3.3. A exposição ao meio ácido seleciona o fenótipo de células-tronco tumorais.**

Nos ensaios para avaliação da indiferenciação celular, houve um maior número de oroesferas no tempo 21+7D, o que indica a aquisição de um fenótipo de pluripotência (Fig. 3A). Já a análise da expressão gênica de marcadores de células tronco-tumorais evidenciou que a expressão relativa de CD44 aumentou nos tempos 7D e 21D (Fig. 3B), assim como para o marcador Nanog, o qual também teve sua expressão relativa aumentada no tempo 21D (Fig. 3C). Ao recondicioná-los em meio neutro, a expressão de CD44 e Nanog diminuíram. No entanto para o marcador Bmi-1 parece haver uma expressão aumentada nos grupos testes se comparados ao controle, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (Fig. 3D).

### **3.4. A acidez extracelular causa aumento da resistência à Cisplatina em células de carcinoma de boca.**

A avaliação da viabilidade celular frente à ação do quimioterápico Cisplatina mostrou uma resistência aumentada nas células do Grupo 2, apresentando diferença significativa nas doses de 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M para o tempo 7D e 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M para o tempo 21D (Fig. 4A e 4B). Porém, após recondicionamento por 7 dias em meio neutro, a sensibilidade à droga foi totalmente restaurada, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes doses utilizadas para o Grupo 3 (Fig. 4D e E). A diluição da droga em meio ácido poderia estar influenciando na absorção da mesma e por isso realizamos a diluição em meio neutro no momento do tratamento e se observou uma restauração parcial da sensibilidade à droga, porém na dose de 1 $\mu$ M o grupo no de células expostas ao pH 6.8 (Fig. 4C).

## **4. DISCUSSÃO**

Já foi demonstrado que o pH extracelular ácido está associado a maior agressividade tumoral, mas até então esse efeito não havia sido demonstrado para o câncer de boca [10-13]. O padrão celular morfológico é essencial para compreensão das patologias. Neste estudo, assim como em outros já publicados, se observou que a

exposição à acidez pode trazer alterações no fenótipo celular, aumentando a quantidade de vacúolos no seu interior e modificando a característica do citoesqueleto para um aspecto mesenquimal [10,12]. Quanto maior o período de exposição ao pH acidificado, mais presentes parecem estar as alterações morfológicas e menores são as taxas proliferativas. Porém, estas características são amenizadas quando as células são recondicionadas ao meio de cultura neutro, demonstrando que a exposição ao pH ácido é um estressor celular. Considerando que o pH extracelular se apresenta na forma de gradiente e que ocorrem flutuações ao longo do tempo, é importante avaliarmos seus efeitos contínuos e intermitentes [12].

Além disso, a exposição a um microambiente ácido foi capaz de alterar o comportamento migratório das células de CEC da linhagem SCC-4, favorecendo os eventos migratórios tanto de caráter individual, quanto coletivo. Esse achado está de acordo com resultados prévios da literatura para outros tipos de linhagens tumorais, dentre eles pulmão, pâncreas, melanoma, mama e próstata [22-25]. No entanto, esse resultado parece ser específico para células tumorais, visto que a linhagem de queratinócitos normais (HaCat) quando expostas à acidose, apresentam redução no percentual de migração, o que pode ser explicado pelo estresse gerado com o qual as células não-tumorais não conseguem se adaptar, tanto que não foi possível testar um tempo de exposição mais longo (21+7D) pois as células não sobreviveram.

O aumento da capacidade migratória pode ser resultado de indução de transição epitélio-mesênquima após a exposição ao estresse ácido. Quando avaliamos a expressão gênica das células, observamos maior expressão de N-caderina e diminuição de E-caderina, a qual se mantém até 21 dias de exposição contínua. Existem evidências na literatura que o pH ácido está associado ao aumento da invasão tumoral e formação de metástases [10,12]. Assim, podemos sugerir que essa associação se deve à indução de EMT. No entanto, outros eventos importantes para esse desfecho devem ser investigados, como a degradação de matriz extracelular e a produção de metaloproteinases de matriz, catepsina B e outras enzimas que em estudos prévios da literatura se mostraram aumentadas em condições ácidas tumorais [10, 26].

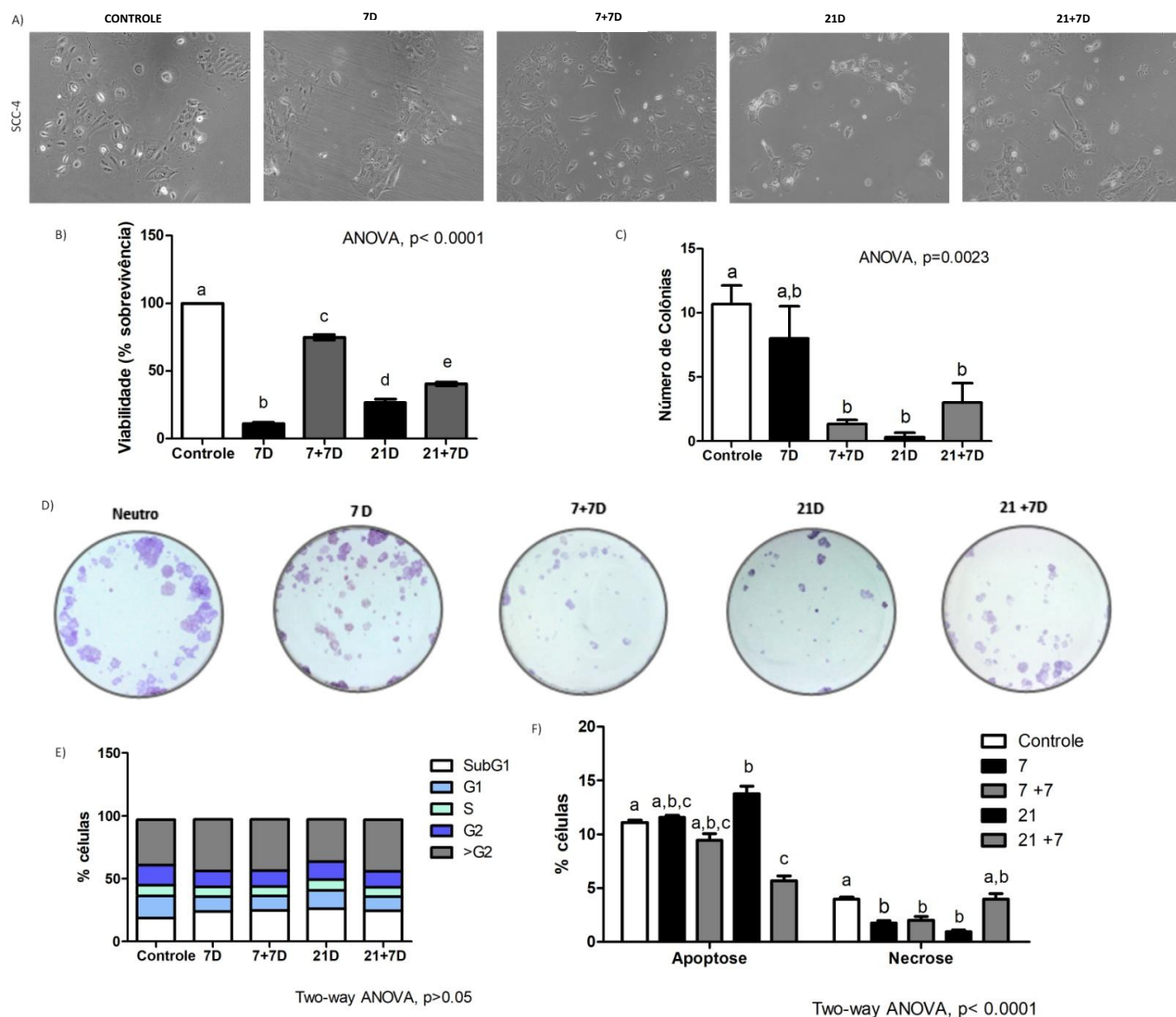
Para adquirir a capacidade de invadir os tecidos adjacentes, a célula epitelial necessita realizar o processo de desdiferenciação e expressar marcadores de células tronco-tumorais [27]. Nossos resultados demonstram que em situação de anoiquia, as células expostas de forma crônica ao pH ácido foram capazes de se dividir e formar mais ooesferas. Acredita-se que esta capacidade esteja associada ao fenótipo característico de célula tronco tumoral. Ao avaliar a expressão gênica de marcadores de células tronco-tumorais, observou-se expressão aumentada de CD44 e Nanog, principalmente, nos grupos que tiveram exposição contínua ao pH ácido. Estes resultados vão de encontro com os achados de um estudo com células tronco tumorais de glioma, no qual houve maior expressão de marcadores de células tronco tumorais (Olig2, Oct4 e Nanog) e menor expressão de marcadores de diferenciação glial nas células cultivadas em baixos pHs. Sugerindo, então, que o pH ácido mantém a indiferenciação celular [13].

A indução do fenótipo de célula tronco tumoral pode ser uma das explicações para a maior resistência ao tratamento quimioterápico. Alguns estudos já mostraram que essa subpopulação celular pode não ser eliminada pela quimioterapia e ser responsável pela recidiva tumoral [32]. A resistência à Cisplatina foi observada apenas após a exposição contínua principalmente após 21 dias, onde a expressão de CD44 foi maior e Nanog atingiu maior expressão. Entretanto, quando as células eram recondicionadas em meio neutro a resistência era revertida assim como a expressão de CD44 e Nanog diminui em relação aos grupos de exposição contínua.

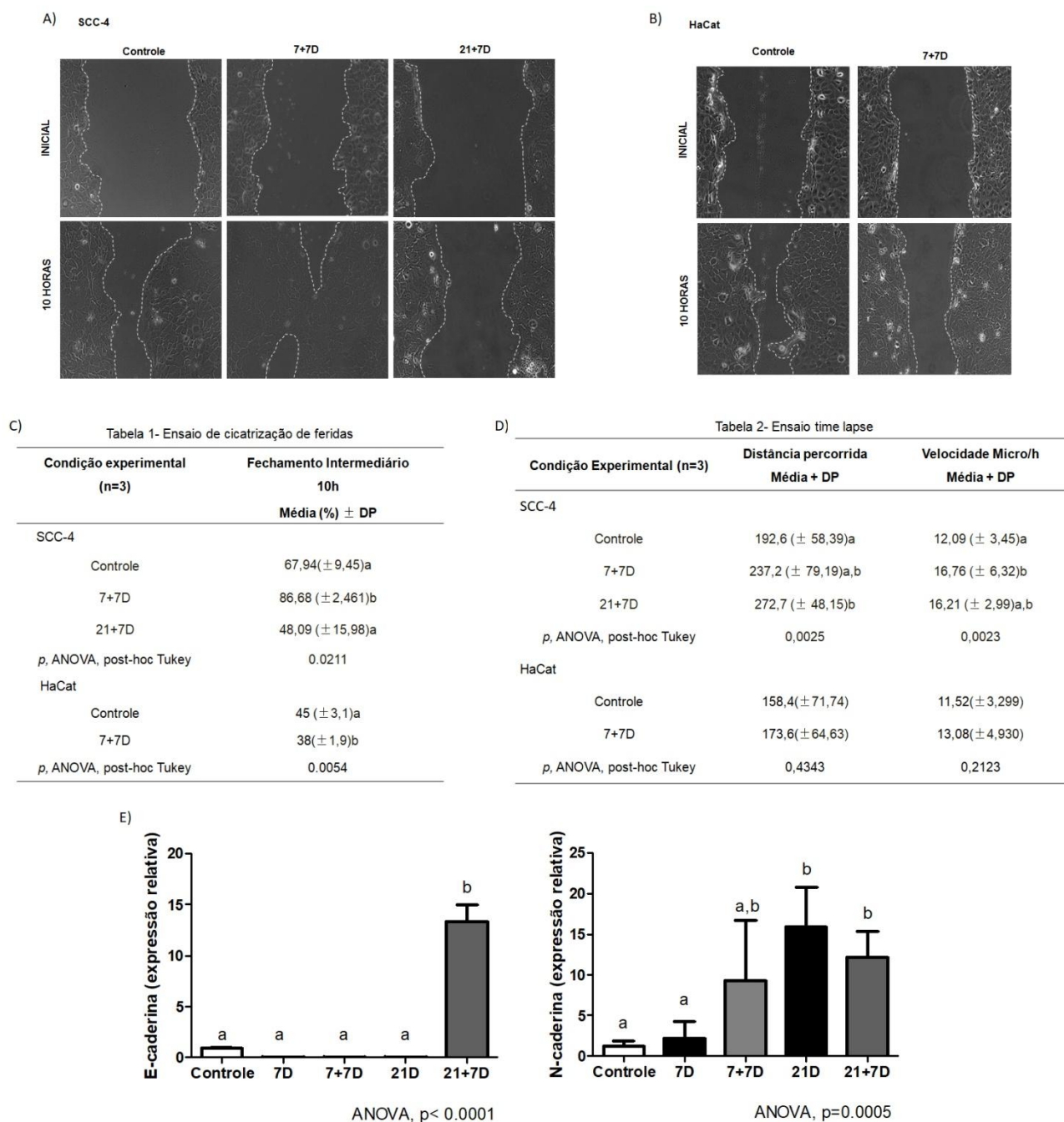
No entanto, é importante considerar que o pH tem efeito direto na distribuição e absorção de drogas quimioterápicas, por meio do mecanismo de aprisionamento de íons (*ion trapping* – efeito dos íons na distribuição de drogas) [28-30]. Drogas consideradas bases fracas, ao entrar em contato com o microambiente tumoral ácido, acabam se protonando fora da célula e não conseguem ser absorvidas pelas células e realizar sua função terapêutica. A cisplatina, por sua vez, é um quimioterápico ácido fraco, sua absorção deveria ser facilitada em microambiente tumoral ácido [31]. Entretanto, os resultados deste estudo demonstraram que, durante à exposição ao pH ácido, as células foram mais resistentes à cisplatina. Para avaliar o efeito do fenômeno *ion trapping* na resistência, repetimos o experimento do grupo 7D diluindo a cisplatina

em meio neutro e observamos que houve uma reversão da resistência apenas na dose de 10 $\mu$ M. Assim podemos sugerir que o microambiente tumoral ácido pode levar a uma seleção de fenótipos mais resistentes a quimioterápicos e ao mesmo tempo dificultar o funcionamento da Cisplatina. Achado semelhante foi observado em células endoteliais tratadas com a droga anti-angiogênica Sunitinib, que se mostrou menos eficaz em pH ácido [33].

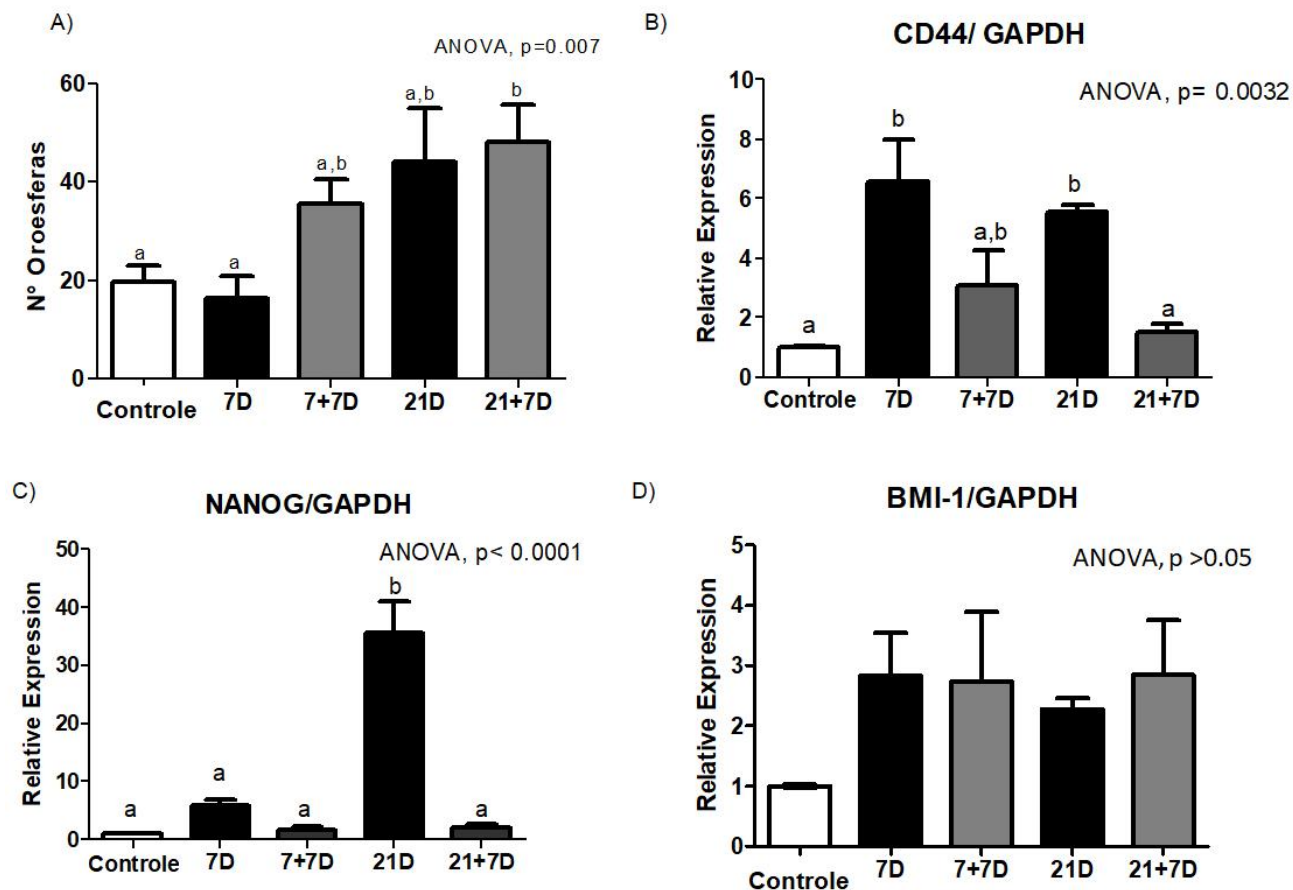
Considerando os resultados obtidos, podemos concluir, até o momento, que a exposição *in vitro* das células de carcinoma espinocelular de boca da linhagem SCC-4 a um microambiente ácido de forma crônica gera um estresse celular que diminui as taxas proliferativas e, ao mesmo tempo, induz a indiferenciação e pluripotência celular e aumenta a resistência ao tratamento quimioterápico. Em contrapartida, quando há a exposição ao pH ácido e recondicionamento ao pH neutro, as células potencializam a sua capacidade migratória. Logo, o estabelecimento de rotinas de medição de pH tumoral pode auxiliar no planejamento terapêutico do paciente e a utilização de terapias alcalinizantes podem potencializar o tratamento quimioterápico.



**Fig. 1.** Representação da morfologia e do padrão de proliferação celular da linhagem SCC-4. (A) Perfil morfológico da linhagem SCC-4 nos períodos de tratamentos utilizados nos grupos experimentais. (B) Ensaio da Suforadamina B para verificar a viabilidade celular ( $p$ , ANOVA, post-hoc Tukey). (C) Quantificação do número de colônias. (D) Imagens representativas do ensaio clonogênico dos diferentes grupos experimentais. (E) Análise da distribuição das fases do ciclo celular. (F) Percentual de células em apoptose/necrose.

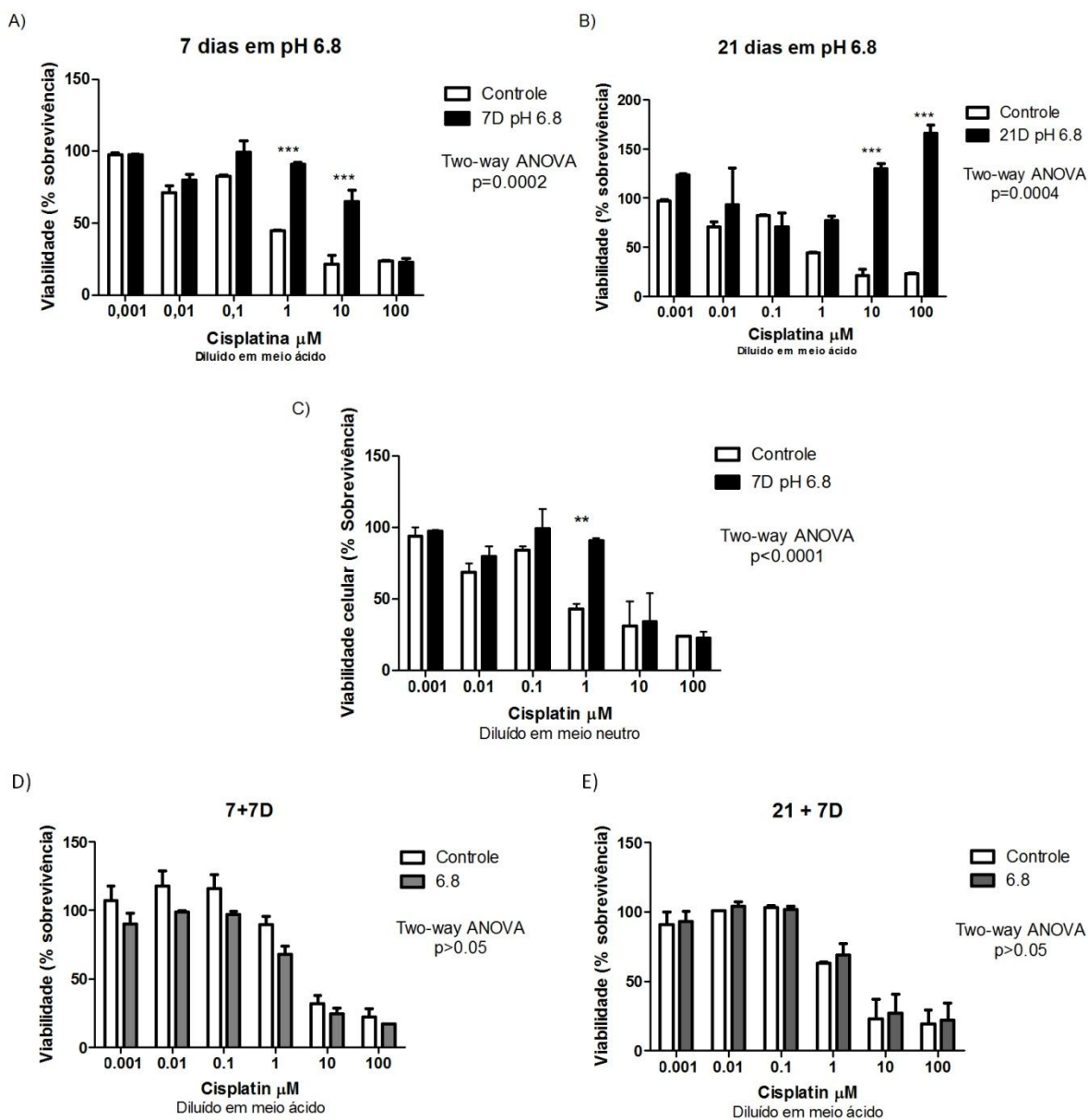


**Fig. 2.** Perfil migratório das linhagens SCC-4 e HaCat em microambiente ácido. (A) Quadro comparativo entre os grupos do ensaio de cicatrização de feridas das células SCC-4. (B) Quadro comparativo entre os grupos do ensaio de cicatrização de feridas das células HaCat. (C) tabela comparativa do fechamento médio de feridas no tempo 10h (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey). (D) comparação entre a distância e a velocidade média percorrida pelas células (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey). (E) Quantificação por PCR em tempo real de E-Caderina e N-Caderina da linhagem SCC-4, os níveis de expressão foram normalizados para GPDH (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey).



**Fig. 3.** Análise do perfil da população de células tronco tumorais. (A) Quantificação do número de orosferas formadas em placas de baixa aderência com agarose ( $p$ , ANOVA, post-hoc Tukey). (B) Análise da expressão gênica de CD-44 por PCR em tempo real. (C) Análise da expressão gênica de Nanog por PCR em tempo real. (D) Análise da expressão gênica de Bmi-1 por PCR em tempo real. Os níveis de expressão foram normalizados para GAPDH ( $p$ , ANOVA, post-hoc Tukey).





**Fig. 4.** Análise da resistência ao tratamento com quimioterápico Cisplatina (A) Perfil de resistência ao quimioterápico Cisplatina para o grupo 7D quando a droga diluída em meio ácido. (B) Perfil de resistência ao quimioterápico Cisplatina para o grupo 21D. (C) Perfil de resistência ao quimioterápico Cisplatina para o grupo 7D quando a droga diluída em meio neutro. (D) Perfil de resistência ao quimioterápico Cisplatina para o grupos 7+7D. (E) Perfil de resistência ao quimioterápico Cisplatina para o grupo 21+7D ( $p$ , ANOVA de duas vias, post-hoc Bonferroni), \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

## Referências

- [1] A. Argiris, M.V. Karamouzis, D. Raben, R.L. Ferris. **Head and neck cancer.** *Lancet*, 371(2008), pp. 1695–1709.
- [2] S. Warnakulasuriya. **Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer.** *Oral Oncol.*, 45 (2009), pp. 309–316.
- [3] E.M. Genden, A. Ferlito, C.E. Silver, R.P. Takes, C. Suarez, R.P. Owen, et al. **Contemporary management of cancer of the oral cavity.** *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 267 (2010), pp. 1001–1017.
- [4] R. Belcher, K. Hayes, S. Fedewa, A.Y. Chen. **Current treatment of head and neck squamous cell cancer.** *J. Surg. Oncol.*, 110 (2014), pp. 551–574.
- [5] S.M. Gore, A.K. Crombie, M.D. Batstone, J.R. Clark. **Concurrent chemoradiotherapy compared with surgery and adjuvant radiotherapy for oral cavity squamous cell carcinoma.** *Head Neck*, 37 (2015), pp. 518–23.
- [6] D. Hanahan, R.A. Weinberg. **The Hallmarks of Cancer.** *Cell*, 100 (2000), pp. 57–70.
- [7] D. Hanahan, R.A. Weinberg. **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell*, 144 (2011), pp. 646–674.
- [8] R.A. Gatenby, R.J. Gillies. **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** *Nat. Rev. Cancer*, 4 (2004), pp. 891–899.
- [9] C.F. Huang, X.R. Xu, T.F. Wu, Z.J. Sun, W.F. Zhang. **Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis.** *J. Oral Pathol. Med.*, 43 (2014), pp.1-7.
- [10] S. Peppicelli, F. Bianchini, A. Toti, A. Laurenzana, G. Fibbi, L. Calorini. **Extracellular acidity strengthens mesenchymal stem cells to promote melanoma progression.** *Cell Cycle*, 14 (2015), pp. 3088–3100.
- [11] K. Smallbone, D.J. Gavaghan, R.A. Gatenby, P.K. Maini. **The role of acidity in solid tumour growth and invasion.** *J. Theor. Biol.*, 235 (2005), pp. 476–484.
- [12] R.E. Moellering, K.C. Black, C. Krishnamurty, B.K. Baggett, P. Stafford, M. Rain, et al. **Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes.** *Clin. Exp. Metastasis*, 25 (2008), pp. 411–425.

- [13] A.B. Hjelmeland, Q. Wu, J.M. Heddleston, G.S. Choudhary, J. MacSwords, J.D. Lathia, et al. **Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype.** *Cell Death Differ.*, 18 (2011), pp.829–840.
- [14] V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H.H. Cornell, A. Ibrahim-Hashim, et al. **Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion.** *Cancer Res.*, 73 (2013), pp. 1524–1535..
- [15] A.S. Silva, J.A. Yunes, R.J. Gillies, R.A. Gatenby. **The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion extracellular pH and acid-mediated invasion.** *Cancer Res.*, 69 (2009), pp. 2677–2684.
- [16] I.F. Robey, B.K. Baggett, N.D. Kirkpatrick, D.J. Roe, J. Dosesco, B.F. Sloane, et al. **Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases.** *Cancer Res.*, 69 (2009), pp. 2260–2268.
- [17] C. Sheridan, H. Kishimoto, R.K. Fuchs, S. Mehrotra, P. Bhat-Nakshatri, C.H. Turner, et al. **CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis.** *Breast Cancer Res.*, 8 (2006), R59.
- [18] S.C. Gupta, R. Singh, R. Pochampally, K. Watabe, Y.Y. Mo. **Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-κB pathway.** *Oncotarget*, 5 (2014), pp. 12070–12082.
- [19] U.E. Martinez-Outschoorn, M. Peiris-Pagés, R.G. Pestell, F. Sotgia, M.P. Lisanti. **Cancer metabolism: a therapeutic perspective.** *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 14 (2017), pp.11–31.
- [20] R. Becelli, G. Renzi, R. Morello, F. Altieri. **Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer.** *J. Craniofac. Surg.* 18 (2007), pp. 1051–1054.
- [21] S. Krishnamurthy, J.E. Nor. **Orosphere assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells.** *Head Neck*, 35 (2013), pp. 1015–1021.
- [22] D.R. Sudhan, D.W. Siemann. **Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells.** *Clin. Exp.*

- Metastasis, 30 (2013), pp. 891-902.
- [23] A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba, K. Shimamura, Y. Kato. **Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model.** *Cancer Cell International* 2014; 14: 129-140.
- [24] S. Deng, X. Li, Y. Niu, S. Zhu, Y. Jin, S. Deng, et al. **MiR-652 inhibits acidic microenvironment-induced epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by targeting ZEB1.** *Oncotarget*, 6 (2015), pp. 39661-39675.
- [25] A. Riemann, B. Schneider, D. Gundel, C. Stock, O. Thews, M. Gekle. **Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells.** *Pflügers Arch.*, 466 (2014), pp. 2127-2138.
- [26] J.M. Rothberg, M. Sameni, K. Moina, B.F. Sloanea. **Live-Cell Imaging of Tumor Proteolysis: Impact of Cellular and Non-Cellular Microenvironment.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1824 (2012), pp. 123–132.
- [27] Z. Zhang, M.S. Filho, J.E. Nör. **The biology of head and neck cancer stem cells.** *Oral Oncol.* 48 (2012), pp. 1–9.
- [28] B.P. Mahoney, N. Raghunand, B. Baggett, R.J. Gillies. **Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro.** *Biochem. Pharmacol.*, 66 (2003), pp. 1207–1218.
- [29] N. Raghunand, B.P. Mahoney, R.J. Gillies. **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.*, 66 (2003), pp.1219–1229.
- [30] N. Raghunand, R.J. Gilles. **pH and drug resistance in tumors.** *Drug Resist. Updat.*, 3 (2000), pp. 39–47.
- [31] D.J. Stewart. **Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 63 (2007), pp. 12–31.
- [32] M. Dean, T. Fojo, S. Bates. **Tumour stem cells and drug resistance.** *Nat. Rev. Cancer*, 5 (2005), pp. 275-284.
- [33] F. Visioli, Y. Wang, G.N. Alam, Y. Ning, P.V. Rados, J.E. Nör, et al. **Glucose-regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial**

**cells under acidic stress.** PLoS One, 9 (2014), e101053.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer é uma doença capaz de criar diferentes mecanismos de adaptação, de desenvolver o potencial de se expandir e de sobreviver a variados ambientes. Por essa razão, a biologia do câncer necessita ser melhor compreendida para concretização de terapias mais efetivas no seu tratamento (SMALLBONE et al., 2005; HANNAH; WEINBERG, 2011). Uma das características importantes do microambiente tumoral é a acidificação do pH, o que pode gerar um fator estressor seletivo para as células tumorais, causando efeitos significativos na progressão do câncer (HJELMELAND et al., 2011; SMALLBONE et al., 2010; ZHANG et al., 2010). A literatura já mostrou que em tumores maligno sólidos a acidez extracelular aumenta os potenciais de migração e invasão, assim como o risco de formar metástases, e resulta em fenótipos mais agressivos que também são mais resistentes aos tratamentos quimioterápicos (HJELMELAND et al., 2011; VISIOLI et al., 2014; MOELLERING et al., 2008; SILVA et al., 2009; ROBEY et al., 2009; SHERIDAN et al., 2006; GUPTA et al., 2014). Porém, mesmo já sabendo que o carcinoma espinocelular de boca apresenta pH extracelular ácido, os seus efeitos na biologia celular ainda não haviam sido estudados.

Com este estudo, se constatou que a acidez extracelular gera influência direta nos mecanismos de proliferação, migração, ploripotência e resistência ao tratamento quimioterápico nas células de carcinoma espinocelular de boca. A análise dos efeitos da acidez extracelular nesse tumor torna-se fundamental para garantir o uso de medicamentos e práticas tecnológicas capazes de diminuir as altas taxas de mortalidade e as grandes mutilações causadas pelo tratamento desta doença.

Mesmo sabendo que o uso de modelos experimentais de cultura celular 2D é essencial para o estudo comportamental do câncer, deve-se levar em consideração as limitações que essa técnica apresenta. Entre elas, devemos ressaltar que não há uma condição experimental que mimetize a complexidade do microambiente tumoral. Na busca por uma aproximação com essa realidade, nós criamos tempos experimentais de exposição celular crônica e aguda ao meio de cultura acidificado e também as recondicionamos ao meio de cultura neutro, objetivando simular o gradiente e a dinamicidade do pH extracelular. Ainda assim, compreendemos que esse modelo não

confirma nossos resultados por completo e por esse motivo, pretendemos avançar as nossas pesquisas a partir de estudos prolongados em modelos animais.

A literatura já considerou que existem estratégias terapêuticas capazes de manipular os efeitos do pH da massa tumoral, podendo potencializar as terapias de combate ao câncer. Com este propósito, acredita-se em: terapias alcalizantes, buscando elevar o pH extracelular; bombas inibidoras de prótons, as quais podem diminuir o pH intracelular das células tumorais e, conseqüentemente, aumentar o pH extracelular; acidificação intracelular aguda, a qual diretamente promoveria a morte das células tumorais e a acidificação extracelular aguda que possibilitaria a ação seletiva de drogas citotóxicas em nanopartículas sensíveis ao pH (MCCARTY; WHITAKER, 2010). Silva et al. (2009) constataram que elevando as concentrações de bicarbonato de sódio no plasma sanguíneo gera o aumento do pH da massa tumoral, assim reduz o crescimento e a invasão do tumor sem modificar significativamente o pH do sangue e dos tecidos normais.

Sendo assim, compreendemos que o conhecimento sobre o metabolismo tumoral do carcinoma espinocelular bucal é essencial para potencializar as terapias de combate a essa doença. O estabelecimento de um protocolo de medição do pH da massa tumoral que possa auxiliar no planejamento terapêutico assim como estudos com terapias alcalizantes pode trazer perspectivas futuras promissoras no combate ao câncer de boca.

## REFERÊNCIAS

- ADJEI, I. M.; BLANKA, S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. **J. Funct. Biomater.**, Basel, v. 6, no. 1, p. 81-103, 2015.
- BARAR, J.; OMID, Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy. **Bioimpacts**, Tabriz, Iran, v. 3, no. 4, p.149-162, 2013.
- BCELLI, R. et al. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. **J. Craniofac. Surg.**, Burlington, v. 18, no. 5, p.1051-1054, 2007.
- BENNETT, D. C. et al. Experimental metastasis and differentiation of murine melanoma cells: actions and interactions of factors affecting different intracellular signaling pathways. **Clin. Exp. Metastasis**, London, v. 12, no. 6, p. 385–397, 1994.
- BRIZEL, D. M. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Elmsford, v. 51, no. 2, p. 349-353, 2001.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- CHEN, J. et al. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, London, v. 14, p.15, 2014.
- CHIOU, S.H. et al. Positive correlations of oct-4 and nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 14, p. 4085-4095. 2008.
- D'ARCANGELO, D. et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 86, p.312-318, 2000.
- DE MILITO, A.; FAIS, S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. **Future Oncol.**, London, v. 1, no. 6, p. 779-786, 2005.
- EREZ, N. et al. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 17, no. 2, p.135-147, 2010.



- ESTRELLA, V. et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. **Cancer Res.**, Chicago, v. 73, no. 5, p.1524-1535, 2013.
- FANG, J. S.; GILLIES, R. D.; GATENBY, R. A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. **Semin. Cancer Biol.**, Philadelphia, v. 18, no. 5, p. 330-337, 2008.
- FLACKE, J. et al. Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression. **Apoptosis**, Dordrecht, v. 14, p. 90–96, 2009.
- FURNESS, S. et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, v. 4, CD006386, 2011.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 4, no. 11, p. 891-899, 2004.
- GILLIES, R. J. et al. MRI of the tumor microenvironment. **J. Magn. Reson. Imaging**, Chicago, v. 16, no. 4, p. 430-450, 2002.
- GILLIES, R. J. GATENBY, R. A. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis?. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 39, no. 3, p. 251-257, 2007.
- GUPTA, S.C. et al. Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF- $\kappa$ B pathway. **Oncotarget**, United States, v. 5, no. 23, p. 12070–12082, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, no. 5, p. 646-674, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, no. 1, p. 57-70, 2000.
- HAYRY, V. et al. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. **Br. J. Cancer**, London, v. 102, p. 892-897, 2010.
- HJELMELAND, A. B. et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. **Cell Death Differ.**, London, v. 18, no. 5, p. 829-840, 2011.
- HUANG, C.F. et al. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 1, p.1-7, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

**Estimativa 2014:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2013/apresentacao-estimativa-2014.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

**Estimativa 2016:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

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

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

KRISHNAMURTHY, S.; NÖR, J. E. Head and neck cancer stem cells. **J. Dent. Res.**, Ann Arbor, v. 91, no. 4, p.334-340, 2012.

MAHONEY, B. P. et al. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. **Biochem. Pharmacol.**, Tucson, v. 66, p. 1207-1218, 2003.

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

MCCARTY, M. F.; WHITAKER, J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. **Altern. Med. Rev.**, Sandpoint, Idaho, v. 15, no. 3, p. 264-272, 2010.

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

MOLOFSKY, A.V. et al. 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.**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 1432- 1437, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev. Med. (São Paulo)**, São Paulo, v. 89, no. 1, p. 21-31, 2010.

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

RAGHUNAND, N.; GILLIES, R.J. pH and drug resistance in tumours. **Drug Resist. Updat.**, Tucson, v. 3, no. 1, p. 39-47, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOUNNI, N. E.; NOEL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, Paris, v. 87, no. 3-4, p. 329-342, 2005.

VISIOLI, F. et al. Glucose-Regulated Protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, no. 6, 2014, p. e101053, 1-9.

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

WATANABE, M. et al. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. **Oncol. Lett.**, Greece, v. 7, p. 35-40, 2014.

YU, C.C. et al. Bmi-1 Regulates snail expression and promotes metastasis ability in head and neck squamous cancer-derived ALDH1 positive cells. **J. Oncol.**, Cairo, v. 2011, p. 1-16, 2011

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

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