

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DOUGLAS RODRIGUES GONÇALVES

**O pH EXTRACELULAR ÁCIDO ESTIMULA O AUMENTO DE
METÁSTASES EXPERIMENTAIS DE CÉLULAS DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR ORAL HUMANO EM CAMUNDONGOS NUDE ATÍMICOS**

Porto Alegre
2020

DOUGLAS RODRIGUES GONÇALVES

**O pH EXTRACELULAR ÁCIDO ESTIMULA O AUMENTO DE
METÁSTASES EXPERIMENTAIS DE CÉLULAS DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR ORAL HUMANO EM CAMUNDONGOS NUDE ATÍMICOS**

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 a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2020

DOUGLAS RODRIGUES GONÇALVES

**O pH EXTRACELULAR ÁCIDO ESTIMULA O AUMENTO DE
METÁSTASES EXPERIMENTAIS DE CÉLULAS DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR ORAL HUMANO EM CAMUNDONGOS NUDE ATÍMICOS**

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 a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre, 11 de novembro de 2020

Fernanda Visioli

Doutora em Odontologia (Patologia Bucal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Manoela Domingues Martins

Doutora em Odontologia (Patologia Bucal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Victor de Mello Palma

Doutorando em Odontologia (Estomatologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosalda e Luiz, e meu irmão, Daniel, que embarcaram nessa missão comigo e não mediram esforços para que eu pudesse viver esse sonho da melhor forma possível.

Aos meus avós, Carlos (*in memoriam*) e Laide, pelo incentivo, apoio e cuidado. Essa conquista é para vocês.

À minha orientadora, professora Dra. Fernanda Visioli, que não só me guiou nesta etapa, mas foi também responsável por acender a chama do amor à pesquisa em mim. Para além de transmitir conhecimento técnico, é um exemplo inspirador como profissional e pessoa, em quem me espelho.

Ao grupo de pesquisa, em especial Bianca, Ian e Júlia. Gratidão pelas horas no cultivo celular, pelo suporte nos laboratórios e pelos demais momentos compartilhados.

Às médicas veterinárias da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, Tuane e Daniela, pelo brilhante trabalho e paciência durante os meses de experimento.

Aos amigos que fiz na FO-UFRGS, com quem compartilhei tantos momentos e horas de estudo, em destaque Gabriele, Lorenzo, Francine e Nadini. Nossos rituais sagrados pré prova na minha casa tornaram a trajetória mais agradável.

Aos amigos de Porto Alegre, em especial Alexsander e Michele, pela acolhida, incentivo e lealdade.

Aos meus amigos de Torres, que me forneceram suporte e mantiveram a nossa conexão mesmo a duzentos quilômetros de distância. Vocês foram essenciais.

RESUMO

A biologia dos tumores já não pode ser entendida simplesmente listando as características das células cancerígenas, mas deve abranger as contribuições do microambiente tumoral à tumorigênese. O microambiente do tumor é caracterizado por baixos níveis de oxigênio, diminuição dos nutrientes disponíveis (glicose e aminoácidos) e pH tecidual ácido. Em alguns tipos de câncer, o pH ácido tumoral já foi relacionado à maior invasão tumoral e maior incidência de metástases. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de um microambiente ácido em células de carcinoma espinocelular oral na capacidade *in vivo* de desenvolver metástases. Inicialmente foi desenvolvido um estudo piloto para avaliar a concentração de células a ser inoculada nos animais e o período de acompanhamento. A análise dos dados obtidos com o estudo piloto demonstrou que a concentração de 2×10^6 em 150 μ l de PBS era mais adequada, assim como o período de 10 semanas de acompanhamento. Células tumorais de carcinoma espinocelular bucal (SCC-4) mantidas em meio de cultura acidificado com pH 6.8 por 7 dias e após recondicionadas em meio de cultura de pH 7.4 e células mantidas pelo mesmo período em pH 7.4 foram injetadas numa concentração de 2×10^6 células na veia caudal de animais Balbc/nude. Os animais foram acompanhados por 10 semanas, eutanasiados, e tiveram seus pulmões e fígados coletados, pesados, fotografados e fixados em formalina 10% para processamento histológico. Dos blocos de parafina, foram confeccionadas lâminas histológicas coradas em HE, que foram analisadas por um observador cego que quantificou o número de metástases por lâmina. Após análise de distribuição dos dados, os grupos foram comparados por teste t ou ANOVA. O grupo com células expostas previamente ao microambiente ácido (pH 6.8), apresentou maior número de metástases pulmonares ($p = 0.0322$) em comparação ao grupo não exposto (pH 7.4). A média de metástases no grupo pH 6.8 foi de 6,33 ($\pm 2,12$), enquanto que no grupo pH 7.4 foi de 3,87 ($\pm 2,16$). Os dados analisados em conjunto permitem afirmar que o microambiente ácido promove maior capacidade metastática às células de carcinoma espinocelular oral, e por consequência, maior progressão tumoral.

Palavras-chave: Metástases. Crescimento tumoral. Acidez tumoral. Modelo animal.

ABSTRACT

The biology of tumors can no longer be understood only by cancer cells characteristics, it must include the tumor microenvironment contributions to tumorigenesis. The tumor microenvironment is characterized by low oxygen levels, a decrease in available nutrients (glucose and amino acids) and an acidic tissue pH. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of an acidic microenvironment on oral squamous cell carcinoma cells regarding the ability to develop metastases *in vivo*. After different periods of exposure to the acidic culture medium, the concentration of 2×10^6 oral squamous cell carcinoma cells (SCC-4) in 150 μ l of PBS of were injected into the tail vein of Balbc/nude animals. The animals were monitored for 10 weeks, euthanized, and their lungs and livers were collected, measured, weighed, photographed and fixed in 10% formalin for histological processing. From the paraffin blocks, histological slides stained with HE were obtained and analyzed by a blind observer who quantified the number of metastases per slide. After analysis of data distribution, the groups were compared by t test or ANOVA. The group with cells previously exposed to the acid microenvironment (pH 6.8) presented a higher number of lung metastases ($p = 0.0322$) compared to the unexposed group (pH 7.4). The average of metastases in the pH 6.8 group was 6.33 (± 2.12), while in the pH 7.4 group it was 3.87 (± 2.16). The joint data together allow us to affirm that the acid microenvironment confers metastatic capacity to oral squamous cell carcinoma cells, and consequently, greater tumor progression.

Keywords: Metastases. Tumor growth. Tumor acidity. Animal model.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	7
1.1	INVASÃO TUMORAL E METÁSTASE	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	17
3.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	17
3.3	DELINEAMENTO DO ESTUDO	17
3.4	CULTIVO CELULAR	17
3.5	MODELO ANIMAL	18
3.6	CÁLCULO AMOSTRAL	19
3.7	RANDOMIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	19
3.8	ESTUDO PILOTO	20
3.9	INDUÇÃO DE METÁSTASE PULMONAR	21
3.10	CUIDADOS E CONTROLE	21
3.11	EUTANÁSIA, COLETA E ARMAZENAMENTO DAS PEÇAS	22
3.12	ANÁLISE MORFOLÓGICA	23
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4	RESULTADOS	24
4.1	PILOTO	24
4.2	METÁSTASES PULMONARES	25
4.3	DISTRIBUIÇÃO DO PESO CORPÓREO	26
4.4	PESO DOS PULMÕES	26
4.5	PESO DOS FÍGADOS	27
4.6	INTERCORRÊNCIAS	28
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	31
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A – Aprovação pela comissão de ética no uso de animais	37

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O carcinoma espinocelular é responsável por mais de 90% das neoplasias malignas que afetam a cavidade bucal, orofaringe, hipofaringe e laringe e representa o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo (PARKIN *et al.*, 2002). Os pacientes que sofrem de carcinoma espinocelular bucal enfrentam uma taxa de sobrevida que se mantém inalterada há décadas, sendo mantidas taxas de sobrevida em torno de 50% em 5 anos (ANTUNES *et al.*, 2001; BIAZEVIC *et al.*, 2006), indicando que a nossa capacidade de os tratar atingiu um platô. A *International Agency for Research on Cancer* (2020) estima que a incidência de novos casos de câncer de lábio e boca até 2040 no mundo seja de 545.369. No Brasil, em 2020, a incidência estimada é de 11.200 novos casos para homens, os mais acometidos (INCA, 2020). Em função disso, o câncer de boca pode ser considerado um problema de saúde pública.

Apesar de a pesquisa em câncer bucal ter avançado consideravelmente, o tratamento ainda se baseia principalmente na atividade proliferativa das células tumorais. O tratamento cirúrgico agressivo permanece como a abordagem predominante de tratamento dos pacientes, mesmo com a doença em fase inicial, enquanto 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).

Portanto, ampliar nosso conhecimento sobre a biologia do carcinoma espinocelular bucal é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Atualmente, considera-se que a biologia dos tumores já não pode ser entendida simplesmente enumerando as características das células cancerosas, mas deve abranger as contribuições do microambiente tumoral à tumorigênese (HANAHHAN; WEINBERG, 2011).

O microambiente tumoral é caracterizado por baixos níveis de oxigênio, diminuição dos nutrientes disponíveis (glicose e aminoácidos) e um pH tecidual ácido. Já foi demonstrado que o pH extracelular de tumores malignos da cavidade bucal é

ácido, variando entre 6.56 e 6.97 (BECELLI *et al.*, 2007), no entanto, os efeitos do estresse ácido nas células do câncer de boca ainda são desconhecidos. Em outros tipos de câncer, o pH ácido tumoral já foi relacionado à maior invasão tumoral e maior incidência de metástases (D'ARCANGELO *et al.*, 2000; FANG; GILLIES; GATENBY, 2008). Dessa forma, investigar os efeitos da acidez no crescimento tumoral e na capacidade metastática é de fundamental importância na busca de novas estratégias terapêuticas para o carcinoma espinocelular bucal.

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 comum dos tumores invasivos sólidos é um metabolismo alterado de glicose. Otto Warburg foi o primeiro a descrever o anômalo, porém, característico metabolismo energético da célula cancerosa: mesmo em presença de oxigênio as células cancerosas reprogramam seu metabolismo glicolítico, e assim sua produção energética, limitando seu metabolismo de energia em grande parte à glicólise, levando a um estado conhecido como “glicólise aeróbica” ou “Efeito Warburg”, sendo esta uma característica singular observada em cânceres (WARBURG, 1956).

A constante observação de glicólise anaeróbica em tumores invasivos humanos, a despeito de uma menor eficiência na produção de energia, possui correlação com maior agressividade, sugerindo que o fenótipo glicolítico confere uma significativa vantagem proliferativa durante a evolução somática do câncer e, portanto, deve ser um componente crucial do fenótipo maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Uma importante consequência do aumento de glicólise é a acidificação do meio extracelular. Os produtos metabólicos da glicólise, íons de hidrogênio (H⁺) e ácido láctico, causam a acidificação do meio extracelular (GATENBY; GILLIES, 2004). Estudos mostram que o pH extracelular de tumores é consistentemente ácido e pode chegar a valores significativamente baixos (GILLIES *et al.*, 2002). Becelli *et al.* (2007), verificou que o pH extracelular de uma amostra de tumores malignos da cavidade bucal variava entre 6.56 e 6.97, enquanto o pH tecidual normal é de 7.4 e 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 microrganismos. 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, e 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 utilizada em ambientes anaeróbicos, secreta o ácido láctico e produz apenas duas moléculas de ATP na sua fase final (CHAMPE *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2014). 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, 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 (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.*, 2011).

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) (MOELLERING *et al.*, 2008; BARAR; OMID, 2013). O resultado deste processo é uma seleção das células mais resistentes, com potenciais mais agressivos e invasivos.

Em outros tipos de câncer, o pH ácido do meio extracelular de tumores foi diretamente relacionado à agressividade tumoral, impulsionando a atividade de enzimas proteolíticas extracelulares, regulando a expressão de fatores angiogênicos, aumentando a incidência de metástases e protegendo as células tumorais da resposta imune (MCCARTY; WHITAKER, 2010). Sendo que em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (ainda não publicado), já evidenciamos que o estresse ácido pode aumentar a migração celular da linhagem tumoral de câncer de boca SCC-4. A migração individual foi testada com o ensaio de time-lapse e a migração coletiva através do ensaio de cicatrização de feridas. Em ambos ensaios, observamos maior migração para as células expostas por 7 dias ou 21 dias e recondicionadas em meio neutro por mais 7 dias (7+7D e 21+7D). Além disso, verificamos que esse efeito é específico para células tumorais, visto que a linhagem de células epiteliais HaCat apresentou menor migração nas mesmas condições (Figura 2).

Devido à importância da acidificação do microambiente, diferentes modalidades terapêuticas estão sendo consideradas para manipular o pH tumoral: terapia alcalinizante para aumentar o pH do ambiente extracelular; a inibição de bombas de prótons diminuindo o pH intracelular das células tumorais, e assim aumentando o pH extracelular; entre outras (Figura 1) (ROBEY *et al.*, 2009; MCCARTY; WHITAKER, 2010). Modelos de estudos experimentais *in vivo*, nos quais são testadas terapias para aumentar o pH do ambiente tumoral, têm demonstrado

resultados significativos (ROBEY *et al.*, 2009; SHERIDAN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009). Robey *et al.* (2009) verificaram que, em camundongos, o tratamento de tumores de mama com intuito de aumentar o pH tecidual com bicarbonato de sódio esteve associado com a redução da invasão, ratificando a possibilidade terapêutica da manipulação do pH.

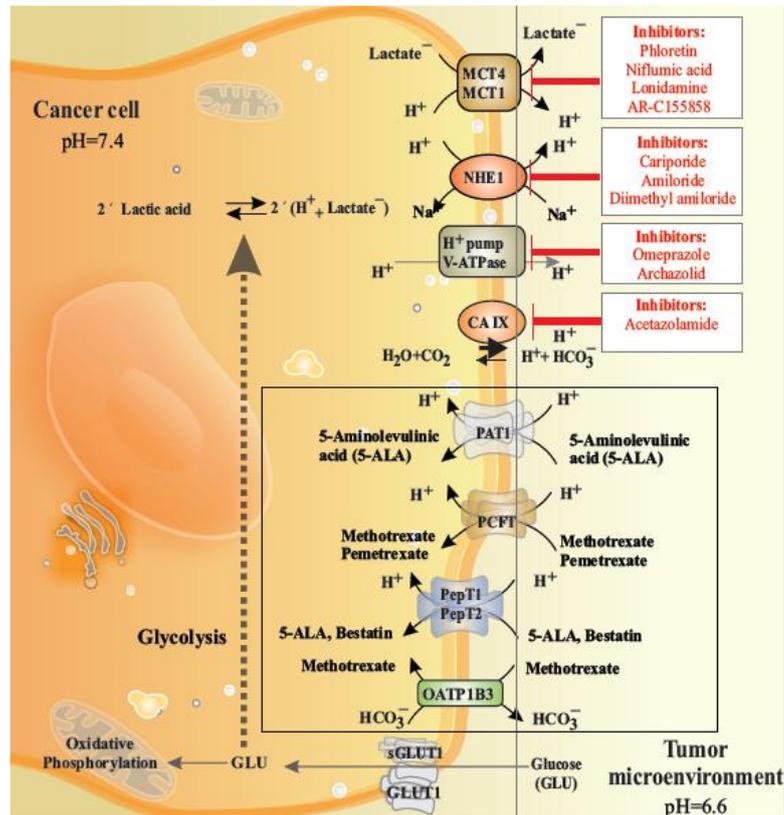


Figura 1 – Representação dos reguladores-chave do pH e os principais mecanismos de transporte envolvidos na condução de quimioterápicos em tumores sólidos. O transporte da glicose é feito, principalmente, por um transportador de glicose (GLUT1) e metabolizado através do mecanismo de glicólise na produção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

microenvironment checkmates cancer therapy. *BiolImpacts*, v. 3, n. 4, p. 149-162, 2013.

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.

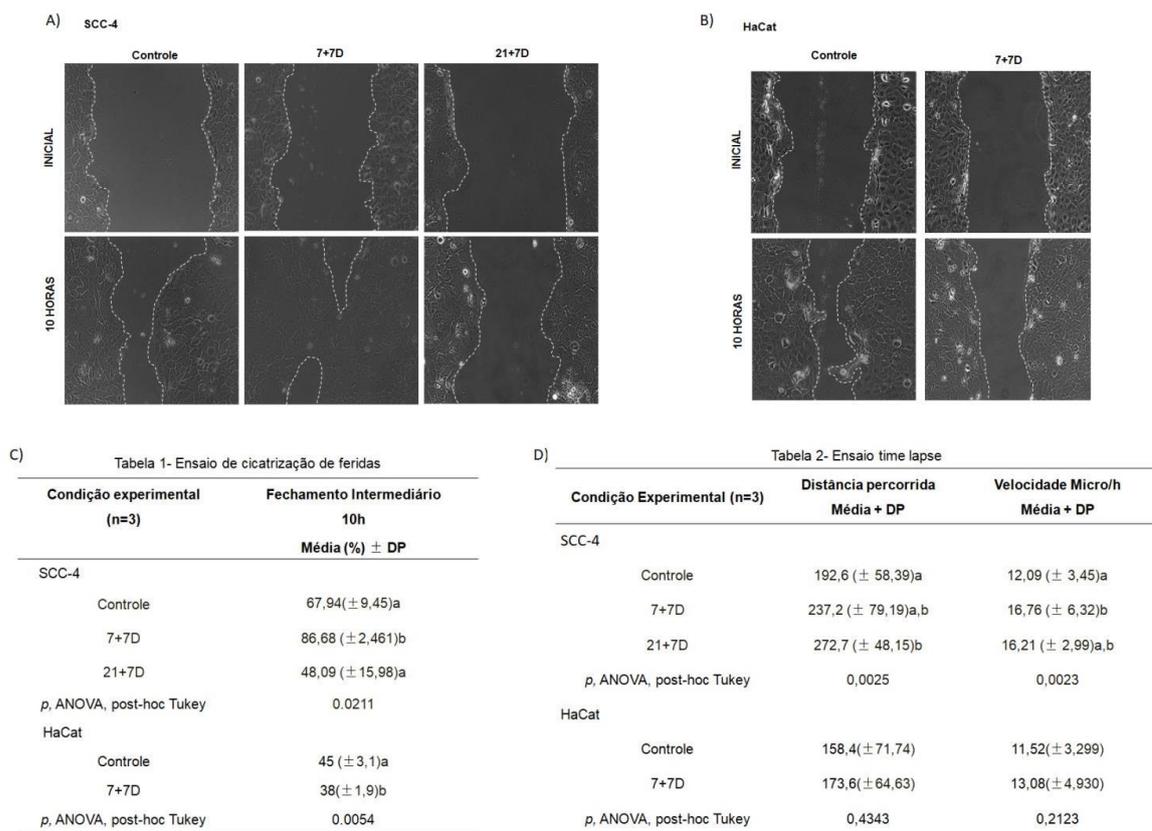


Figura 2 – Análise *in vitro* do perfil migratório das linhagens SCC-4 e HaCat em microambiente ácido. (A) Quadro comparativo entre os grupos do ensaio de cicatrização de feridas das células tumorais de boca SCC-4. (B) Quadro comparativo entre os grupos do ensaio de cicatrização de feridas das células queratinócitos normais 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 após os diferentes tempos experimentais (*p*, ANOVA, post-hoc Tukey). Controle= pH 7.4; 7+7D = 7 dias em pH 6.8 e acondicionamento em pH 7.4 por mais 7 dias; 21+7D = 21 dias em pH 6.8 e acondicionamento em pH 7.4 por mais 7 dias.

1.1 INVASÃO TUMORAL E METÁSTASE

As metástases representam subconjuntos distintos e únicos de células que, independentemente da rota utilizada, desenvolvem-se em outro sítio, sem conexão direta com seu local de origem. Destacam-se por apresentar características comportamentais, genéticas e bioquímicas distintas das células do tumor primário. (ECCLES; DANNY, 2007; WELCH; HURST, 2019). No processo de desenvolvimento metastático, fatores como motilidade e invasão, capacidade de modulação do microambiente, plasticidade e capacidade de colonizar tecidos secundários são considerados cruciais para que a cascata metastática ocorra com sucesso. Se uma célula neoplásica não puder completar qualquer uma das etapas da cascata metastática, a metástase não ocorrerá (WELCH; HURST, 2019).

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). O lactato não é apenas um fator secundário metabólico celular das células tumorais, mas também uma molécula chave envolvida na carcinogênese e na evasão imunológica do tumor (LA CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2019).

Mollering *et al.* (2008) verificaram que a exposição de linhagens celulares 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.

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 metaloproteínases (MMPs), que 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 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).

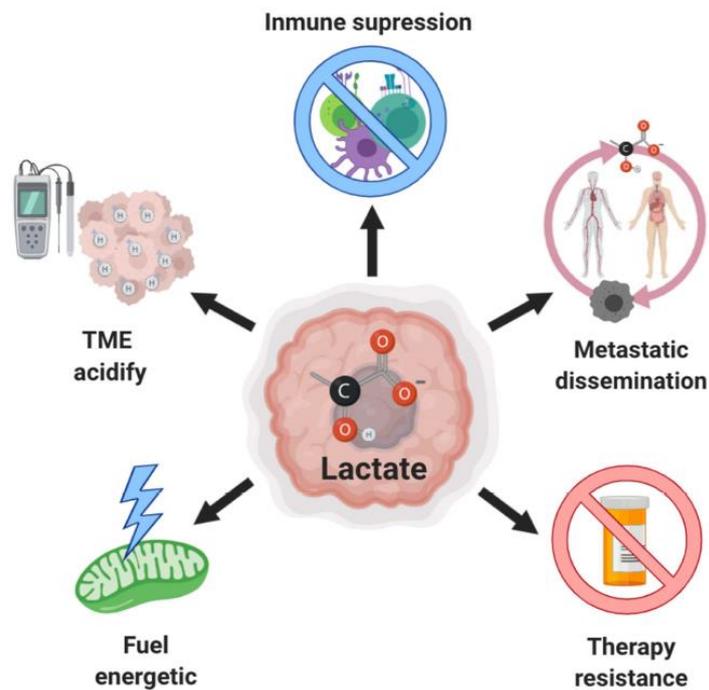


Figura 3 – O papel do lactato no câncer. A produção excessiva de lactato pelas células tumorais e estromais está associada ao aumento da agressividade, devido à acidificação extracelular, que também induz invasão e metástase, inibição da resposta imune antitumoral e resistência à terapia. Além disso, esse lactato pode ser usado como fonte alternativa de combustível pelas células tumorais. Adaptado de La Cruz-López, De *et al.*, Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in oncology*, v. 9, p. 1143, 2019.

O microambiente tumoral ácido dos tumores sólidos, além de tudo, possui influência significativa no sistema imunológico, e conseqüentemente, na resistência terapêutica (Figura 3). Com base nisso, estratégias de tratamento têm sido sugeridas através da manipulação do pH tumoral (DAMGACI, S. *et al.*, 2018; IBRAHIM-HASHIM, A. *et al.*, 2012).

Hashim *et al.* (2011) demonstraram a redução na incidência e crescimento de metástases em um modelo experimental animal de câncer de próstata, utilizando como alternativa terapêutica a manipulação da acidose extracelular. O uso de tampões não voláteis tem apresentado eficácia em estudos *in vivo*, reduzindo o número de metástases e aumentando a sobrevida, merecendo investigações mais aprofundadas (ROBEY *et al.*, 2009).

Apesar da extensa pesquisa nos últimos anos sobre acidose e seus efeitos sobre o câncer, os mecanismos responsáveis pela adaptação à acidez, sua indução de invasão e metástase, bem como os mecanismos que levam a evasão da vigilância imune são pouco compreendidos (LA CRUZ-LÓPEZ, 2019). Estes efeitos não foram analisados e confirmados para o câncer de boca. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou *in vitro* o potencial efeito do microambiente ácido na migração de células tumorais de boca, porém, esses dados ainda não foram confirmados em modelo animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vivo* os efeitos da exposição a um microambiente ácido no desenvolvimento de metástases pulmonares de células de carcinoma espinocelular oral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar o modelo xenográfico de desenvolvimento de metástases pulmonares de células de carcinoma espinocelular oral (SCC-4) a partir da determinação da concentração celular ideal a ser injetada e do tempo de acompanhamento.
2. Avaliar *in vivo* o desenvolvimento de metástases pulmonares de células expostas previamente ao microambiente ácido *in vitro* em um modelo xenográfico em camundongos Balb/c nude.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos propostos na pesquisa científica em animais que foram realizados neste projeto estão de acordo com as normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), por meio da Lei Federal 11.794/2008, Resolução Normativa nº 30/2016 e Diretriz Brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA). O estudo respeitou as Resoluções Normativas 30/2016 (Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos), 33/2016 (Procedimentos – Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica), 37/2018 (Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA) e 39/2018 (Dispõe sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com grau de invasividade 3 e 4). Este protocolo também seguiu o Grau de Invasividade (CONCEA), enquadrando-se na categoria intermediária-GI2. A carta de aprovação da comissão de ética no uso de animais encontra-se no anexo A.

3.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os animais foram mantidos e os experimentos foram realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. A instituição executora do projeto foi a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O conjunto dos experimentos de cultura de células deste projeto foi realizado no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Desenho experimental do tipo randomizado prospectivo cego controlado em modelo animal.

3.4 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas células tumorais de carcinoma espinocelular de boca de língua, da linhagem SCC-4 (adquiridas previamente do Banco de células da

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ). As células foram cultivadas em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina, sendo as células mantidas em ambiente úmido a 37°C, e a 5% de CO₂, adicionando ácido clorídrico 1M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O pH foi mensurado com medidor de pH, nas mesmas condições de cultura. Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Biostar, American Optical) e o meio de cultura trocado a cada 2-3 dias ou quando necessário, após a observação de mudanças no metabolismo celular. A seguir, as células foram coletadas para realização dos experimentos *in vivo*.

Todos os ensaios foram realizados utilizando dois grupos, os quais foram: grupo pH 7.4 (cultivado durante todo o período em meio de cultura neutro pH 7.4), grupo pH 6.8 (cultivado no meio de cultura acidificado pH 6.8 por 7 dias e recondicionado em meio neutro por mais 7 dias). A viabilidade celular foi conferida previamente em microscópio invertido.

3.5 MODELO ANIMAL

Foram utilizados 36 camundongos Balb/c nude, machos e fêmeas, com 5-7 semanas de idade, pesando entre 20-25g, provenientes da colônia mantida na Unidade de Experimentação Animal do HCPA. 12 destes animais foram utilizados para estudo piloto da capacidade metastática, e 24 para o experimento de capacidade metastática. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia, temperatura entre 20 e 24°C, umidade entre 40-60% e com sistema de exaustão. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada, e água *ad libitum* previamente autoclavados. Foram fornecidas sementes de girassol, rolo de papel, estopa e papel toalha como método de enriquecimento ambiental. Os animais foram mantidos em microisoladores de policarbonato ventilados individualmente, com assoalho forrado com maravalha de pinus flocada e densidade de no mínimo 2 e no máximo 5 animais. Todo o manejo das caixas e dos animais foi do tipo convencional controlado, empregando materiais e vestimentas submetidos a processo prévio de esterilização.

3.6 CÁLCULO AMOSTRAL

Não foram encontrados estudos que utilizaram a mesma linhagem celular (SCC-4). Dessa forma, o cálculo amostral foi baseado no estudo de Rofstad *et al.* (2006), que comparou o número de metástases pulmonares entre células de linhagens de melanoma não expostas e expostas ao pH 6.8 por 48 horas. Utilizou-se o software WinPepi (Brixton Health), considerando o desfecho número de metástases, o nível de significância de 5% para um estudo com poder de 80% e uma diferença esperada proporcional de 0.75 entre grupo teste e controle. Assim, a amostra foi composta por 10 animais em cada grupo. No grupo teste foi adicionado 10% devido a maior probabilidade de perdas.

3.7 RANDOMIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Previamente ao início do estudo, os animais foram pesados, randomizados e distribuídos considerando o peso ponderal, a partir de extratos representados pelos quartis de peso nos grupos experimentais. As caixas foram identificadas de acordo com o grupo experimental e os animais foram marcados com furo auricular. Os experimentos de capacidade metastática foram realizados de forma independente. Os animais foram distribuídos em 3 grupos:

Ensaio de Capacidade Metastática (inoculação na veia caudal):

- Grupo pH 7.4 (n animais = 10): Animais Balbc/nude que receberam células mantidas em pH 7.4.
- Grupo pH 6.8 (n animais = 11): Animais Balbc/nude que receberam células mantidas em pH 6.8 por 7 dias e depois recondicionadas em meio neutro (7.4) por mais 7 dias.
- Grupo controle (n animais = 3): Animais Balbc/nude que não receberam nenhuma intervenção para obter-se um padrão de peso normal dos órgãos dos animais.

3.8 ESTUDO PILOTO

O experimento para análise da capacidade metastática foi realizado de acordo com Elkin & Vlodaysky (2001) e Cai *et al.* (2018). Como este tipo de experimento nunca foi realizado com a linhagem SCC-4, inicialmente foi realizado um estudo piloto com 12 animais para determinar a concentração final de células que seriam injetadas (1×10^6 ou 2×10^6) e o período de acompanhamento 6 ou 10 semanas (Tabela 1). Estas variáveis estão relacionadas com a capacidade intrínseca de cada linhagem celular em desenvolver metástases. Após os diferentes períodos, os animais foram eutanasiados e os pulmões e fígados removidos para análise de metástases, como descrito posteriormente.

Tabela 1 – Distribuição dos animais para realização do estudo piloto.

	Concentração células 1×10^6	Concentração células 2×10^6
Tempo de acompanhamento 6 semanas	3	3
Tempo de acompanhamento 10 semanas	3	3
Total Animais	12	

Fonte: o autor

Dos 12 camundongos Balbc/nude utilizados, foram 3 machos e 9 fêmeas, com peso médio de 26,35g. Um dos animais apresentou *endpoints* (descritos posteriormente) e foi eutanasiado 4 dias após o experimento de injeção de células na veia caudal. Os demais animais continuaram sendo observados clinicamente e pesados periodicamente, sem manifestar alterações significativas e sinais de sofrimento. Após os períodos de tempo propostos, realizou-se a eutanásia, os pulmões foram coletados, fotografados, fixados em formalina neutra e processados histologicamente. A seguir, as lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina e avaliadas por um patologista, que quantificou o número de metástases em cada amostra. Os resultados estão apresentados posteriormente na sessão Resultados.

3.9 INDUÇÃO DE METÁSTASE PULMONAR

Quando as células atingiram 70% de confluência, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS, tripsinizadas por 3 minutos, quantificadas e ressuspensas em PBS. Após determinar a concentração celular, as células foram ressuspensas em solução tampão PBS, em um volume de 0,150mL, para posterior injeção na veia caudal dos animais.

Todo procedimento foi realizado mantendo-se os critérios de assepsia e no interior de uma capela de fluxo. O operador e os auxiliares estavam paramentados com aventais cirúrgicos, luvas cirúrgicas estéreis, propés, máscaras, gorros e óculos de proteção. Todo instrumental cirúrgico foi esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Previamente ao procedimento de injeção das células, a anestesia dos animais foi induzida com isoflurano (4-5%) diluído em oxigênio a 100% (fluxo de O₂ de 0,5 L/min) e mantidos (2-3%), fornecido por via inalatória. As veias foram dilatadas previamente, mantendo os animais em incubadora aquecida a 30°C durante 30 minutos a fim de promover a vasodilatação da veia caudal. A solução de células em PBS foi injetada por via intravenosa com seringa de 50UI e agulha 30G.

Os animais foram monitorados diariamente, para verificação de alterações respiratórias decorrentes do desenvolvimento de metástases pulmonares. Os procedimentos em casos de sofrimento e os *endpoints* da pesquisa estão descritos em Cuidados e controle.

Após o período de 10 semanas, todos os animais foram eutanasiados por sobredose de isoflurano. Os pulmões coletados, imediatamente pesados, medidos, fotografados e fixados em formalina 10% para processamento histológico.

3.10 CUIDADOS E CONTROLE

Foram fornecidas água e alimentação de forma normal. Caso houvesse o aparecimento de algum sinal clínico, os animais receberiam suporte antibiótico e analgésico até a completa remissão das alterações. Os animais foram diariamente monitorados e os seguintes parâmetros foram supervisionados: sinais de infecção local, dor e aparecimento de ulcerações. Em casos de infecção, seria utilizado o antibiótico enrofloxacino (10mg/Kg/dia) IP até remissão dos sinais.

O crescimento tumoral pode causar alterações importantes na saúde e bem-estar de alguns animais e, caso isso ocorresse, a experimentação seria concluída. Os animais foram observados pelo menos uma vez por semana para avaliação de qualquer um dos seguintes sinais: perda de peso/caquexia, inquietação, automutilação, mobilidade reduzida, incapacidade de permanecer em pé, alteração de funções fisiológicas (respiração, mastigação, deglutição, micção, defecação ou locomoção), postura anormal, cianose, desidratação clínica e/ou prolongada diminuição da ingestão de comida, atrofia muscular, sinais de letargia, diarreia crônica ou prisão de ventre por mais de 48 horas, sangramento ou descarga mucopurulenta de qualquer orifício, distensão abdominal significativa, deformidade craniana, exoftalmia, patologia dermatológica. A análise final e a decisão de eutanásia dos animais foram responsabilidade regulamentar, cabendo aos médicos veterinários responsáveis.

Como *endpoints*, foi levado em consideração o estado geral do animal (controle de peso 1 vez por semana). O animal que perdesse mais do que 10% do peso corporal inicial de forma aguda ou 15% do peso corporal mais lentamente; apresentasse tamanho tumoral maior do que 1000 mm³ e/ou ulcerações, seria destinado à finalização humanitária. Além disso, foram considerados *endpoints* sinais referentes à formação de metástases abdominais e torácicas como: sinais de dor como posição curvada, caquexia/anorexia, desidratação não responsiva à fluidoterapia (48h), ascite, dispneia e sinais de sofrimento respiratório, por exemplo. Foi também realizada a antecipação de morte nos casos de sinais adversos e de sofrimento dos animais que não puderam ser controlados com manejo ou analgésicos, segundo as principais normativas e recomendações. O método de indução de morte foi o mesmo adotado para os procedimentos finais do projeto.

3.11 EUTANÁSIA, COLETA E ARMAZENAMENTO DAS PEÇAS

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados por meio de sobredose inalatória de isoflurano e, posteriormente, os pulmões e fígados foram removidos. A eutanásia se deu por sobredose anestésica. O isoflurano foi vaporizado em oxigênio a 100% (fluxo de O₂ de 0,5L/min) em concentração igual ou superior a 5%, e fornecido por via inalatória (câmara, cone nasal ou máscara facial). Os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de

batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneano) foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada respiratória. A seguir, os pulmões foram pesados, fotografados, fixados em solução de formalina a 10% tamponada, e enviados ao Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS para realização do processamento histopatológico de rotina.

3.12 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A partir dos blocos de parafina, foram feitos cortes histológicos de 3 μ m para a coloração de hematoxilina/eosina (HE). Os tecidos coletados foram analisados histopatologicamente de forma descritiva. Os cortes corados em HE foram analisados por um patologista cego para as condições experimentais, que confirmaram a presença de metástases nos tecidos analisados.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos dados, a avaliação foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 e os grupos comparados por teste t ou ANOVA, levando em consideração que a distribuição dos dados foi paramétrica. O nível de significância considerado foi de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 PILOTO

Os animais que tiveram o tempo de inoculação de 6 semanas e receberam a concentração celular de 1×10^6 apresentaram uma média de 0,5 metástases ($\pm 0,7$), enquanto os animais que foram acompanhados pelo mesmo período, porém com uma concentração celular de 2×10^6 , apresentaram uma média de 10 metástases ($\pm 12,22$). Já os animais acompanhados por 10 semanas e com uma concentração celular de 1×10^6 , apresentaram uma média de 23,33 metástases ($\pm 17,6$), enquanto os que receberam uma concentração celular de 2×10^6 por este mesmo período, tiveram 27 metástases em média ($\pm 14,54$).

A concentração celular de 2×10^6 e o tempo de inoculação de 10 semanas possibilitaram a identificação de um número de metástases adequado, permitindo a diferenciação dos grupos de pesquisa. Além da análise descritiva histopatológica, pela coloração HE para identificação do número de metástases (figura 4), foi realizada uma análise qualitativa, por meio da técnica de imuno-histoquímica, para o anticorpo de citoqueratina humana, com o objetivo de confirmar a proliferação das células de carcinoma espinocelular oral nas amostras (figura 5).

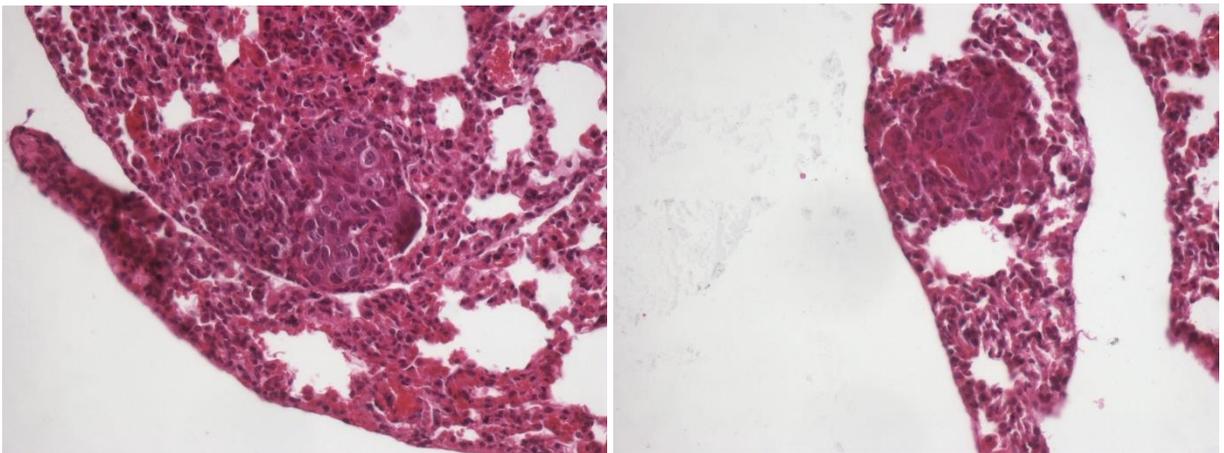


Figura 4 – Amostras de tecido pulmonar coradas em HE dos animais submetidos ao experimento com a concentração celular de 2×10^6 e o tempo de inoculação de 10 semanas. Descrição: observamos a presença ilhas de epitélio com células pleomórficas em meio ao parênquima pulmonar. Coloração: Hematoxilina e eosina, aumento original 200x.

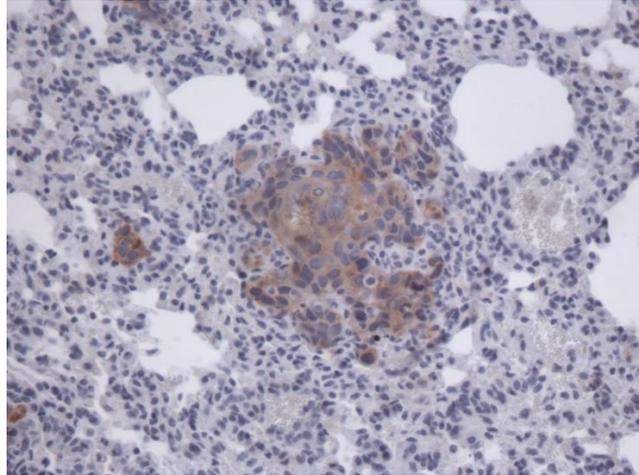


Figura 5 – Grupo de células epiteliais humanas coradas positivamente para o marcador de citoqueratina humana. Coloração: Dab e Hematoxilina, aumento original 400x.

4.2 METÁSTASES PULMONARES

Para investigar se o grupo com células expostas previamente ao microambiente ácido (pH 6.8) desenvolveria diferente número de metástases pulmonares em comparação ao grupo não exposto ao ambiente ácido (pH 7.4), os tecidos coletados foram analisados histopatologicamente de forma descritiva por um patologista cego. Como evidenciado na figura 6, os resultados dessa análise mostraram que a média de metástases do grupo pH 6.8 foi de 6,33 ($\pm 2,12$), maior ($p < 0,05$) do que o número médio de metástases do grupo pH 7.4, que foi de 3,87 ($\pm 2,16$).

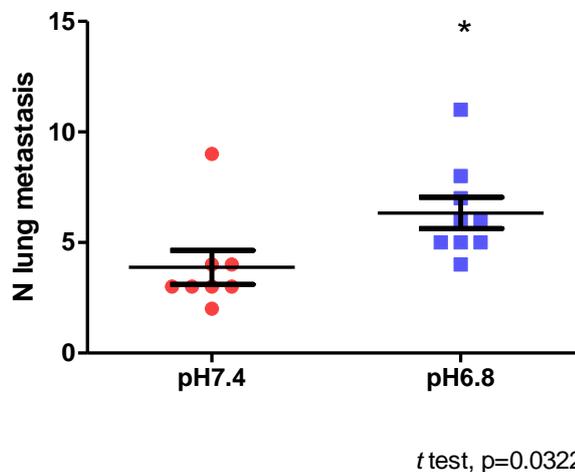
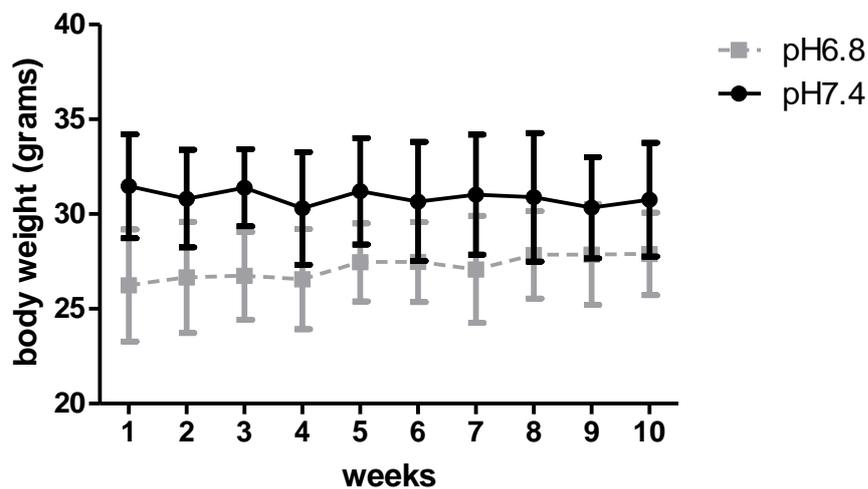


Figura 6 – Número de metástases pulmonares em cada grupo.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DO PESO CORPÓREO

Com o objetivo de avaliar se os grupos expostos a microambientes com diferentes pHs iriam apresentar alterações de peso ao longo do período de 10 semanas, foram realizadas pesagens semanais. O controle de peso serviu também para garantir as normas descritas anteriormente em Cuidados e Controle.

Como demonstrado na figura 7, o peso dos animais de ambos os grupos se manteve estável durante o período das 10 semanas de experimento. Não houve diferença estatística entre o grupo pH 6.8 e o grupo pH 7.4.



two-way ANOVA, $p=0.198$

Figura 7 – Peso corpóreo dos animais durante 10 semanas de experimentação.

4.4 PESO DOS PULMÕES

Para comparar se ao final do experimento os animais dos diferentes grupos iriam apresentar alterações no peso dos seus pulmões, os órgãos foram coletados após a eutanásia e pesados. Além dos grupos pH 7.4 e pH 6.8, incluímos também o grupo controle. A figura 8 apresenta um gráfico com o peso dos pulmões dos animais dos diferentes grupos ao longo das 10 semanas. Não houve diferença estatística entre os grupos.

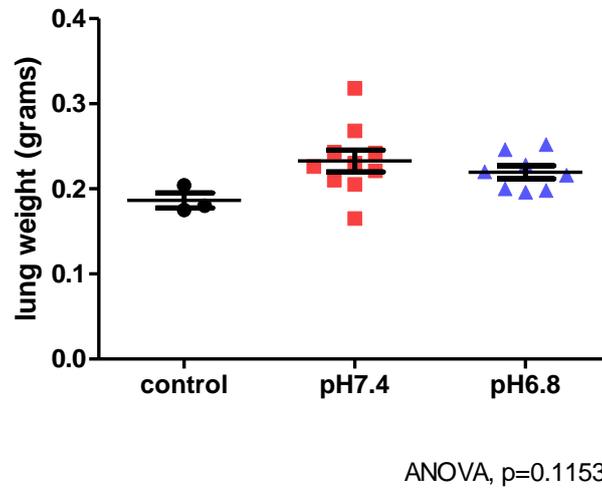


Figura 8 – Distribuição do peso dos pulmões dos animais na décima semana.

4.5 PESO DOS FÍGADOS

Não foram encontradas metástases hepáticas. Para confirmar esse dado, os fígados dos animais dos diferentes grupos foram pesados também. Como demonstrado na figura 9, a comparação entre os grupos controle, pH 7.4 e pH 6.8 não detectou diferença estatística entre os grupos.

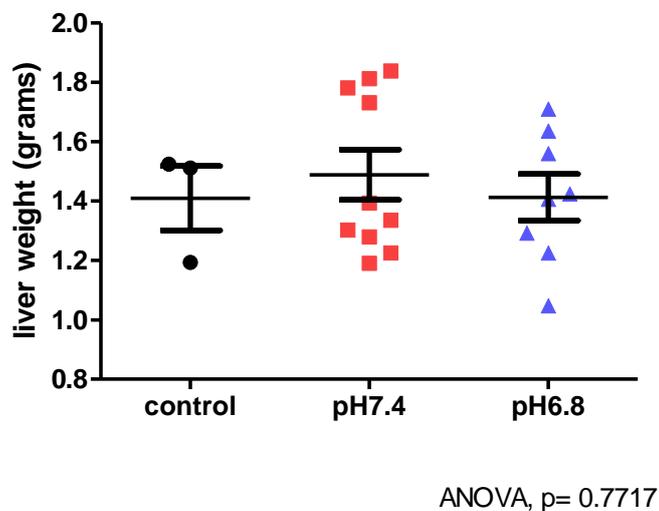


Figura 9 – Distribuição do peso dos fígados dos animais na décima semana.

4.6 INTERCORRÊNCIAS

Durante o período de 10 semanas, os animais foram acompanhados e receberam todo o suporte necessário, de acordo com as normas estabelecidas. O peso dos camundongos foi monitorado semanalmente ao longo do estudo, sem apresentar alterações significativas. Quatro animais precisaram ser eutanasiados antes do tempo previsto, pois apresentaram sinais de possível sofrimento. Um camundongo teve parte de sua pele e pata queimadas durante o experimento piloto, ferimentos estes causados pela utilização de bolsas quentes que tinham o objetivo de dilatar as veias e fornecer um melhor acesso para a injeção. Três desses animais foram a óbito por complicações no momento da injeção das células na veia caudal, possivelmente por causa de embolia pulmonar pós injeção. Além disso, uma observação importante durante o estudo foi que, um dos animais do grupo pH 7.4 apresentou linfonodos aumentados (regiões lombar, femoral, radial e cervical) na nona semana de experimento, e foi acompanhado até o dia da eutanásia final, sem apresentar sinais de sofrimento.

5 DISCUSSÃO

A mudança de crescimento local para metastático durante o desenvolvimento e estabelecimento do câncer é o fator mais prejudicial quando se pensa em prognóstico (CHAFFER, WEINBERG, 2011; AMAR *et al.*, 2013; ALEČKOVIĆ, MCALLISTER, POLYAK, 2019). A acidez do microambiente tumoral é um fator considerado crítico para a ocorrência de metástases, pois proporciona as células tumorais maiores capacidades de migração e de resistência, e conseqüentemente, maior agressividade tumoral. (GILLIES, GATENBY, 2007; FANG, GILLIES, GATENBY, 2008; SMALLBONE *et al.* 2007; HJELMELAND *et al.*, 2011; HUBER *et al.* 2017). Neste sentido, avaliar os efeitos da exposição a um microambiente ácido no desenvolvimento de metástases pulmonares de células de carcinoma espinocelular oral contribui para o entendimento do comportamento tumoral e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Os principais achados deste estudo evidenciam que, os efeitos da exposição de células de carcinoma espinocelular oral (SCC-4) a um microambiente ácido (grupo pH 6.8), resultaram em maior desenvolvimento de metástases pulmonares *in vivo*, quando em comparação àquelas não expostas ao microambiente ácido (grupo pH 7.4) (figura 6). Este achado corrobora com estudos prévios, que evidenciam maior incidência de metástases em tumores de pâncreas e pulmão expostos ao microambiente ácido (DENG *et al.* 2015; SUZUKI *et al.*, 2014).

A metodologia desenvolvida neste estudo, nunca realizada antes com camundongos Balbc/nude em associação com a linhagem celular de carcinoma espinocelular oral (SCC-4), mostrou-se viável, permitindo a análise da capacidade celular no desenvolvimento metastático, não afetando o peso corporal e sugerindo quase ou nenhum sofrimento aos animais. A técnica de injeção intravenosa das células neoplásicas resultou em metástases diretamente nos pulmões, no entanto, apenas metástases microscópicas foram observadas, e não macroscópicas, como observadas em experimentos com outras linhagens tumorais (ELKIN, VLODAVSKY, 2001). Além disso, um período maior de acompanhamento foi necessário, de 10 semanas, sendo que em outras linhagens o tempo médio varia entre 2 e 8 semanas (ELKIN, VLODAVSKY, 2001; CAI *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2020). Essa variação no tempo de acompanhamento pode ser devido à uma menor capacidade metastática intrínseca da linhagem estudada, quando em comparação às estudadas previamente.

Os pulmões foram coletados por serem o sítio de maior acometimento de metástases, levando em consideração a injeção intravenosa de células neoplásicas e o próprio sistema circulatório (ELKIN, VLODAVSKY, 2001). Além da avaliação do parênquima pulmonar na análise da capacidade celular no desenvolvimento e estabelecimento de metástases à distância, optou-se por coletar e avaliar também os fígados (SONG *et al.*, 2015), que não apresentaram alterações. A distribuição do peso corporal, o peso dos pulmões e o peso dos fígados não apresentaram diferença estatística.

O pH extracelular ácido tumoral reduz o pH intracelular das células imunes, afetando as vias de sinalização, e assim, inibindo a ativação e proliferação de células CD4, CD8, NK, NKT e células dendríticas. A acidificação causa também apoptose em linfócitos CD8 e células NK, o que contribui para a evasão imunológica. (ROMERO-GARCIA *et al.*, 2016; LA CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2019). Ainda, a acidose tumoral é capaz de modular a sensibilidade à terapia antineoplásica através da criação de uma barreira química para medicamentos (KOLOSENKO *et al.*, 2017; VIKLUND; AVNET; DE MILITO, 2017).

Pensando nisso, a manipulação da acidose extracelular vem sendo estudada como alternativa terapêutica, mostrando redução na incidência e no crescimento de metástases em casos de câncer de próstata (HASHIM *et al.*, 2011; ROBEY *et al.*, 2009; IBRAHIM-HASHIM; ESTRELLA, 2019). Além disso, ferramentas de diagnóstico desenvolvidas *in vivo* para detectar baixo pH tecidual têm se mostrado promissoras (FENDOS; ENGELMAN, 2012; TAPMEIER *et al.*, 2015). O uso de tampões não voláteis tem apresentado eficácia em estudos *in vivo*, reduzindo o número de metástases e aumentando a sobrevida (ROBEY *et al.*, 2009). Levando tudo em consideração, a manipulação da acidose tumoral e a acidose tumoral como um biomarcador se apresentam como um alvo promissor para novos e mais eficazes tratamentos.

6 CONCLUSÃO

Com os estudos prévios e os resultados do presente estudo, podemos concluir que o modelo experimental utilizado é válido para esse tipo de análise e que as células de carcinoma espinocelular oral (SCC-4) expostas ao microambiente ácido (pH 6.8) apresentam maior capacidade metastática pulmonar *in vivo*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão mais completa dos mecanismos de carcinogênese vem sendo buscada nas investigações científicas. Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de entender o processo de desenvolvimento tumoral e suas complexidades em relação a acidez tumoral. Pesquisas mostraram que o pH ácido do meio extracelular de tumores está diretamente relacionado à agressividade tumoral, aumentando a incidência de metástases e protegendo as células tumorais da resposta imune. No presente trabalho, foi possível desenvolver uma metodologia de pesquisa viável, evidenciando as contribuições do microambiente tumoral em relação à tumorigênese.

Como resultado, o grupo com as células de carcinoma espinocelular (SCC-4) expostas previamente ao microambiente com pH ácido, desenvolveu maior número de metástases pulmonares do que o grupo em que as células permaneceram em pH neutro. A presença do microambiente ácido possui correlação com maior agressividade tumoral, conferindo significativa vantagem proliferativa celular.

Dentre as limitações do estudo, deve-se ressaltar que é um estudo *in vivo* e realizado com apenas um tipo de linhagem celular. Os dados obtidos a partir desse experimento podem não reproduzir fielmente a complexidade do mecanismo tumoral.

Como perspectivas futuras, destaca-se a realização deste estudo utilizando outras linhagens celulares de carcinoma espinocelular, expostas previamente a pHs ácidos e neutros, em associação ou não, e por diferentes períodos.

REFERÊNCIAS

- ALEČKOVIĆ, M.; MCALLISTER, S. S.; POLYAK, K. Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1872, n. 1, p. 89-102, 2019.
- AMAR, A. *et al.* Prognostic value of regional metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 79, n. 6, p. 734-737, 2013.
- ANTUNES, J. L. F. *et al.* Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980–1998. **Oral oncology**, v. 37, n. 4, p. 345-350, 2001.
- BARAR, J.; OMIDI, Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy. **BiolImpacts: BI**, v. 3, n. 4, p. 149, 2013.
- BECELLI, R. *et al.* Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 5, p. 1051-1054, 2007.
- BENNETT, D. C. *et al.* Experimental metastasis and differentiation of murine melanoma cells: actions and interactions of factors affecting different intracellular signalling pathways. **Clinical & experimental metastasis**, v. 12, n. 6, p. 385-397, 1994.
- BIAZEVIC, M. G. *et al.* Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cadernos de saude publica**, v. 22, n. 10, p. 2105-2114, 2006.
- CAI, W. *et al.* Differences between epithelial and mesenchymal human tongue cancer cell lines in experimental metastasis. **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 9959-9964, 2018.
- CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Editora Artmed, 2006.
- DAMGACI, S. *et al.* Hypoxia and acidosis: immune suppressors and therapeutic targets. **Immunology**, v. 154, n. 3, p. 354-362, 2018.
- DENG, S. *et al.* MiR-652 inhibits acidic microenvironment-induced epithelialmesenchymal transition of pancreatic cancer cells by targeting ZEB1. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p.3966-39675, 2015.
- ECCLES, Suzanne A.; WELCH, Danny R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **The Lancet**, v. 369, n. 9574, p. 1742-1757, 2007.
- ELKIN, M.; VLODAVSKY, I. Tail vein assay of cancer metastasis. **Current protocols in cell biology**, v. 12, n. 1, p. 19.2. 1-19.2. 7, 2001.
- FENDOS, J.; ENGELMAN, D. pHLIP and acidity as a universal biomarker for cancer. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 85, n. 1, p. 29, 2012.

FERLAY, J. *et al.* (ed.). **Cancer tomorrow**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018. (IARC CancerBase). Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>. Acesso em 17 de novembro de 2020.

FURNESS, S. *et al.* Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2010.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. **Nature reviews cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-899, 2004.

GILLIES, R. J. *et al.* MRI of the tumor microenvironment. **Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine**, v. 16, n. 4, p. 430-450, 2002.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HASHIM, A. I. *et al.* Reduction of metastasis using a non-volatile buffer. **Clinical & experimental metastasis**, v. 28, n. 8, p. 841-849, 2011.

HJELMELAND, A. B. *et al.* Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 5, p. 829-840, 2011.

HUBER, V. *et al.* Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2017. p. 74-89.

IBRAHIM-HASHIM, A. *et al.* Systemic buffers inhibit carcinogenesis in TRAMP mice. **The Journal of urology**, v. 188, n. 2, p. 624-631, 2012.

IBRAHIM-HASHIM, A.; ESTRELLA, V. Acidosis and cancer: from mechanism to neutralization. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 38, n. 1-2, p. 149-155, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estatísticas de câncer. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 17 de novembro de 2020.

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

KOLOSENKO, I. *et al.* Therapeutic implications of tumor interstitial acidification. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2017. p. 119-133.

LA CRUZ-LÓPEZ, D. *et al.* Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1143, 2019.

MARTÍNEZ-ZAGUILÁN, R. *et al.* Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. **Clinical & experimental metastasis**, v. 14, n. 2, p. 176-186, 1996.

MCCARTY, M. F.; WHITAKER, J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. **Altern Med Rev**, v. 15, n. 3, p. 264-72, 2010.

MOELLERING, R. E. *et al.* Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 4, p. 411-425, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 Ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2014.

PARKIN, D. *et al.* Global cancer statistics, 2002. **Ca Cancer J Clin**, v. 55, p. 74-108, 2002.

ROBEY, I. F. *et al.* Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. **Cancer research**, v. 69, n. 6, p. 2260-2268, 2009.

ROCHEFORT, H. *et al.* Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. **Clinica chimica acta**, v. 291, n. 2, p. 157-170, 2000.

ROFSTAD, E. K. *et al.* Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. **Cancer research**, v. 66, n. 13, p. 6699-6707, 2006.

ROFSTAD, E. K.; DANIELSEN, T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. **British journal of cancer**, v. 80, n. 11, p. 1697-1707, 2002.

ROMERO-GARCIA, S. *et al.* Lactate contribution to the tumor microenvironment: mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 52, 2016.

ROZHIN, J. *et al.* Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. **Cancer research**, v. 54, n. 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. **British journal of cancer**, v. 64, n. 4, p. 663, 1991.

SCIUBBA, J. J. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. **American journal of clinical dermatology**, v. 2, n. 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 Research**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2006.

SILVA, A. S. *et al.* The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. **Cancer research**, v. 69, n. 6, p. 2677-2684, 2009.

SMALLBONE, K. *et al.* Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness. **Journal of theoretical biology**, v. 244, n. 4, p. 703-713, 2007.

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

SMALLBONE, K.; MAINI, P. K.; GATENBY, R. A. Episodic, transient systemic acidosis delays evolution of the malignant phenotype: Possible mechanism for cancer prevention by increased physical activity. **Biology Direct**, v. 20, n. 5, p. 22, 2010.

- SONG, J. *et al.* Hepatic stellate cells activated by acidic tumor microenvironment promote the metastasis of hepatocellular carcinoma via osteopontin. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 713-720, 2015.
- SOUNNI, N. E.; NOËL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, v. 87, n. 329-342, p. 329-342, 2005.
- SUZUKI, A. *et al.* Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. **Cancer cell international**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2014.
- TAPMEIER, T. T. *et al.* The pH low insertion peptide pHLIP Variant 3 as a novel marker of acidic malignant lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 31, p. 9710-9715, 2015).
- VIKLUND, J.; AVNET, S.; DE MILITO, A. Pathobiology and therapeutic implications of tumor acidosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 26, p. 2827-2845, 2017.
- WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, v. 124, p. 269-270, 1956.
- WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the hallmarks of metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011-3027, 2019.
- ZHANG, X.; LIN, Y.; GILLIES, R. J. Tumor pH and its measurement. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 8, p. 1167-1170, 2010.
- ZHONG, L. *et al.* Intra-arterial injection to create bone metastasis of prostate cancer in mice. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, v. 8, n. 4, p. 93, 2020.

ANEXO A – Aprovação pela comissão de ética no uso de animais



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2018/0521

Título: ANÁLISE DOS EFEITOS DO MICROAMBIENTE ÁCIDO NA CAPACIDADE METASTÁTICA DO CÂNCER DE BOCA

Pesquisador Responsável: FERNANDA VISIOLI

Equipe de Pesquisa:

BIANCA DE BEM PRUNES

EDUARDO LIBERATO DA SILVA

TAIANE BERGUEMAIER DE LIMA

DOUGLAS RODRIGUES
GONÇALVES

JÚLIA SILVEIRA NUNES

Data de Aprovação:

Data de Término: 01/07/2021

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade
CAMUNDONGO MUTANTE	M/60 Dias	62

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Aprovado digitalmente por:
PATRICIA AMYTON PERILLA
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação
05712018-12-09 09:58