



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
LEOPOLDO DE MEIS

Marco Antonio Lacerda Abreu

**Efeito do fosfato inorgânico (Pi) extracelular no
microambiente do câncer de mama: Produção, transporte,
transdução do sinal e uma possível correlação com metástase**

Marco Antonio Lacerda Abreu

**Efeito do fosfato inorgânico (Pi) extracelular no
microambiente do câncer de mama: Produção, transporte,
transdução do sinal e uma possível correlação com metástase**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientador: Prof. José Roberto Meyer Fernandes

RIO DE JANEIRO - RJ

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCO ANTONIO LACERDA ABREU

Efeito do fosfato inorgânico (Pi) extracelular no microambiente do câncer de mama: produção, transporte, transdução do sinal e uma possível correlação com metástase. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2021.

Prof. José Roberto Meyer Fernandes

(Prof. Titular do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis - UFRJ, orientador)

Prof^ª. Marcia Cristina Paes

(Prof.^a Associada da Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Pesq. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

(Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz)

Prof. Wagner Seixas da Silva

(Professor Associado da Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof. Mychael Vinicius da Costa Lourenço

(Professor Assistente da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Revisor).

Prof.^a Marcia Giambiagi de Marval

(Professora Titular na Universidade Federal do Rio de Janeiro, suplente externa).

Prof. Andre Marco de Oliveira Gomes

(Professor Associado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, suplente interno).

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Celular do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, sob a orientação do Prof. José Roberto Meyer Fernandes, com o auxílio financeiro das seguintes agências de fomento:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)

 ...Take your passion

And make it happen... 

Irene Cara

(Letra de Flashdance... What a

Feeling © Sony/ATV Music)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a presença de Deus em primeiro lugar e a todos os seres espirituais de Luz que sempre me protegem, ensinam e iluminam os meus caminhos. Agradeço além disso às graciosas, santíssimas e inspiradoras palavras de Jesus Cristo e seu exemplo maravilhoso de Amor e Compaixão.

Agradeço ao apoio imenso dos meus pais Ivan Abreu e Ângela Lacerda que me deram, durante toda a minha vida, a paciência, o carinho, a companhia; ainda mais durante a trajetória do doutorado. Destaco que sem o apoio deles essa tese nunca sairia da minha cabeça, pois eles literalmente se sentaram do meu lado durante essa pandemia e me deram força e calma para escrever e chegar a esse resultado. Pai e Mãe, obrigado por tudo, não consigo agradecer por palavras o que vocês tiveram que fazer e abrir mão para que eu tivesse a oportunidade de fazer um doutorado. O mínimo que posso fazer é dedicar essa tese a vocês. Agradeço à minha avó Ana que de longe e mais recentemente de perto, mantinha meu nome em orações pedindo meu cuidado a Deus e aos meus avós que partiram, mas estão presentes em meu coração: Bezinha, Branco Alves e Mário Abreu.

Agradeço a todos os meus amigos que de perto e de longe me apoiaram: Anna Karolyne, Nayara, Naiana, Amanda, Marcella, Werner e Ayra. Agradeço ao Pablo por compartilhar tantas coisas boas, inclusive suas palavras e conselhos, que me fazem refletir e me ajudam a ser uma pessoa melhor. Muito obrigado pelo seu esforço em me fazer sentir bem. Édula e Kika, tenho muita gratidão por tudo que vocês fizeram por mim, por todo apoio, todo carinho, por sempre estarem prontas para me acolher e me dar suporte. Agradeço à Carolline, minha rainha do Rio Nilo, pela companhia e apoio que me deu nos momentos bons e principalmente nos maus, pois nunca abdicamos da ligação que nos une. Muito obrigado pelos abraços revigorantes durante essa minha jornada. Calangah, você foi uma bênção que surgiu no meu caminho! Quando mais precisei, nem tive que lhe pedir ajuda ou chamá-la, você já estava a postos com uma solução pronta e enfeitada. Jamais esquecerei suas palavras confortadoras, carinho e acolhimento! Saiba que sempre poderá contar comigo.

Agradeço à JBFM e a JBFM *classic*, pois foi ouvindo essa Rádio que fiz meus experimentos e escrevi essa tese de forma descontraída. Agradeço aos colegas do laboratório que dividiram o espaço e o tempo comigo com bastante alegria e cooperação: Andréia, Ana Angélica, Anita Leocádio, Anita, Ayra, Cláudia, Clara, Daniela, Daniel,

Dona Joana, Edmilson, Fabiano, Guilherme, Lisvane, Luiz, Lídia, Michelle, Nathália, Thaís Russo, Thaís Vieira e Rosângela. Agradeço inclusive à minha aluna de iniciação científica Thaís Vieira que, durante essa correria do doutorado, entendeu pacientemente a minha ausência em alguns momentos; espero que tenha contribuído para sua formação científica. Agradeço aqui também a minha antiga coorientadora Thaís Russo, mas ainda colaboradora, que me ensinou valiosos conhecimentos que irei aplicar sempre na minha carreira científica.

Não podia de deixar de agradecer ao meu orientador José Roberto que acreditou em mim e me incentivou sempre a não somente comemorar as vitórias, mas no amanhã buscar a próxima. Foi pensando dessa forma que obtive bons resultados no doutorado. Agradeço a ele, seja como orientador seja como mentor, teve a paciência de me orientar à distância nos últimos meses do meu doutorado. Obrigado por me ensinar a pesquisar, por me ensinar a ensinar e por me ensinar a pesquisar ensinando. Espero um dia te deixar orgulhoso quando for você quando “crescer” profissionalmente.

Agradeço aos meus colaboradores científicos, que além de amigos, me ajudaram a construir os experimentos desta tese: Cláudia Dick, Daniela Cosentino, Luiz Fernando, Michelle Nascimento, Natália Rocco, Thaís Russo e Thaís Vieira. A tarefa não foi fácil, mas espero que vocês tenham se interessado pelo universo do câncer. Agradeço aos professores colaboradores Robson Queiroz, Sandra König e Wagner Dias pelas excelentes sugestões. Faço uma dedicação póstuma ao Prof. Franklin D. Rumjanek e agradeço a ele por suas instruções, ressaltando que algumas ideias dele estarão vivas no *corpus* desta tese. Agradeço também ao revisor Prof. Mychael Vinícius da Costa Lourenço, que teve muita disposição para fazer uma minuciosa revisão em um limitado tempo, suas correções e sugestões colaboraram e muito para a escrita desta tese. Em relação ao tempo limitado, agradeço também aos professores e doutores que compõem a banca examinadora desta tese pela disposição de conhecer e ler sobre esse tema.

RESUMO

LACERDA-ABREU, Marco Antonio. **Efeito do fosfato inorgânico (Pi) extracelular no microambiente do câncer de mama: produção, transporte, transdução do sinal e uma possível correlação com metástase.** Tese de doutorado - Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2021.

Devido à alta taxa de crescimento e um elevado requerimento energético pelas células de câncer, a demanda por fosfato inorgânico (Pi) é também elevada pelas células tumorais. Em pacientes com câncer, a concentração sanguínea de Pi é maior quando comparada a níveis basais de pacientes saudáveis. Especificamente em relação ao câncer de mama, observou-se um acúmulo duas vezes maior de Pi no microambiente tumoral de camundongos. No entanto, fosfatases com sítio catalítico voltado para o ambiente extracelular poderiam estar envolvidas com a liberação de Pi para esse ambiente. Alta atividade dessas enzimas foi identificada em células de câncer de mama quando comparadas às células não tumorais. Possivelmente, a elevada atividade ecto-fosfatásica fornece Pi extracelular para ser internalizado por transportadores de Pi. Recentemente, em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), caracterizou-se um transporte de Pi sódio-dependente com alta afinidade por Pi. Mostra-se, neste trabalho, a presença de um outro transportador de Pi que independe de sódio ou ânions, mas é dependente de H⁺. Esse transportador de Pi H⁺-dependente é de baixa afinidade para o Pi, o que permite inferir uma maior atuação desse transportador no microambiente tumoral em condições saturáveis (> 1 mM Pi) para o transportador de Pi dependente de Na⁺. As elevadas concentrações de Pi extracelular também foram capazes de reduzir a expressão do transporte de Pi dependente de Na⁺ mas, por mecanismo compensatório, estimulam os níveis do transporte de Pi dependente de H⁺. Além do Pi, foi demonstrado nesse trabalho que um composto natural polifenol que inibe a migração de câncer de mama é capaz de inibir apenas o transporte de Pi Na⁺-dependente ao passo que nenhum efeito foi observado no transporte de Pi H⁺-dependente. Ao elevar a concentração de Pi extracelular, nenhum efeito do resveratrol foi observado na migração e no transporte de Pi, atribuído ao efeito do elevado Pi extracelular reduzir drasticamente a expressão do transportador de Pi Na⁺-dependente e aumentar um transporte de Pi H⁺-dependente que é insensível ao resveratrol. É conhecido que a elevada concentração de Pi extracelular é capaz de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em alguns modelos celulares de células de mamífero. Neste trabalho, demonstrou-se que a alta concentração extracelular de Pi estimula a produção de ERO em células MDA-MB-231, mas não em células relativamente pouco metastáticas (MCF-7) e em células não tumorais de mama (MCF10-A). O mecanismo de produção de ERO induzido pelo Pi na célula MDA-MB-231 é atribuído a hiperpolarização da membrana mitocondrial por 1 h de exposição ao Pi, prejudicando o consumo de oxigênio (O₂). No entanto, após 24 h de exposição ao Pi, a fonte principal de ERO parece mudar da mitocôndria para a enzima NADPH oxidase (NOX). Os transportadores de Pi são modulados pelo H₂O₂ exógeno, assim como pela adição de Pi extracelular, no qual é revertido pela adição do antioxidante N-acetilcisteína (NAC). O NAC também foi capaz de abolir a migração induzida por Pi e a adesão de MDA-MB-231. Estes resultados indicam que os transportadores de Pi suportam parte da energia necessária para os processos metastáticos estimulados por Pi e desencadeiam a produção de H₂O₂ induzida por Pi como uma resposta de sinalização para promover a migração e adesão celular.

Palavras-chave: fosfato inorgânico, microambiente tumoral, câncer de mama, ectoenzimas, transporte de Pi H⁺-dependente, transporte de Pi Na⁺-dependente, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Tumor cells develop high demands for inorganic phosphate (Pi) due to high growth rates and energy requirements. Serum Pi concentration has been described as two to four-fold higher in cancer patients compared to baseline levels in healthy individuals. A two-fold Pi accumulation was observed in the tumor microenvironment breast cancer cells in mice. In the tumoral microenvironment, ecto-phosphatases - phosphatases presenting catalytic sites facing the extracellular environment - could be involved with the extracellular release of Pi. Breast cancer cells present a high ecto-phosphatase activity, compared to non-tumor cells, possibly because it provides extracellular Pi to be internalized by Pi transporters. Recently, in triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231), a sodium-dependent Pi transport with a high affinity for Pi in tumor cells was characterized. This work shows the presence of another Pi transporter, a H⁺-dependent Pi transporter. This transporter has a low affinity for Pi, which allows us to infer a more significant role of this transporter in the tumor microenvironment under saturable conditions (> 1 mM Pi) for the Na⁺-dependent Pi transporter. High extracellular Pi concentrations reduced the expression of Na⁺-dependent Pi transport, while stimulating H⁺-dependent Pi transport levels by compensatory mechanisms. In addition, it was demonstrated that resveratrol, a natural polyphenol compound, inhibits the Na⁺-dependent Pi transport as well cell migration, with no effect on the H⁺-dependent Pi transport. However, the effect of resveratrol in cell migration and Pi transport is lost by elevating the extracellular Pi concentration; this effect could be attributed to the fact that high Pi extracellular drastically reduces the Na⁺-dependent Pi transporter expression while increases the H⁺-dependent Pi transport, that is insensitive to resveratrol. Moreover, it is known that high extracellular Pi concentration can stimulate the reactive oxygen species (ROS) production in some models of mammalian cells. Thereby, high extracellular Pi concentration stimulates ROS production in MDA-MB-231 cells, but not in relatively low metastatic cells (MCF-7) and non-tumor breast cells (MCF10-A). The mechanism of Pi-induced ROS production in the MDA-MB-231 cell is attributed to hyperpolarization of the mitochondrial membrane for 1 h of exposure to Pi, impairing oxygen consumption (O₂). However, after 24 h of exposure to Pi, the primary source of ROS seems to shift from mitochondria to the enzyme NADPH oxidase (NOX). Pi transporters are modulated by exogenous H₂O₂ and by H₂O₂ Pi-induced, which is reversed by the addition of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC). NAC was also able to abolish Pi-induced migration and adhesion of MDA-MB-231. These results indicate that Pi transporters support part of the energy required for Pi-stimulated metastatic processes and trigger Pi-induced H₂O₂ production as a signaling response to promote cell migration and adhesion.

Keywords: inorganic phosphate, tumor microenvironment, breast cancer, ectoenzymes, H⁺-dependent Pi transport, Na⁺-dependent Pi transport, reactive oxygen species.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{32}\text{P}_i$ – isótopo radioativo do fosfato inorgânico

ALP – fosfatase alcalina

BBM - microvilosidades da membrana em forma de escova, do inglês *brush-border membrane*

BLM - membrana basolaterais das células do túbulo proximal, do inglês *basolateral membrane*

BSA - albumina de soro bovino, do inglês *bovine serum albumin*

CKs – citoqueratinas, do inglês *cytokeratines*

CMLV - células do músculo liso vascular

CMTN – câncer de mama triplo-negativo

CTE – cadeia transportadora de elétrons

DCIS - carcinoma ductal *in situ*, do inglês *ductal carcinoma in situ*

DIDS - ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfônico, DIDS

DMBA - hidrocarboneto aromático polinuclear dimetilbenz(a) antraceno

DMSO - dimetilsulfóxido

DRC – doença renal crônica

e5NT – ecto 5' nucleotidase

EGF - fator de crescimento epidérmico, do inglês *epidermal growth factor*

EGFR - receptor tirosina-quinase do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor*)

E-NPPs - ecto-nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterases

E-NTPDase - ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

ERO – espécies reativas de oxigênio

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FDG-PET - tomografia por emissão de pósitrons ^{18}F -desoxiglucose

FGF-23 - do inglês *fibroblast growth factor 23*, fator de crescimento fibroblástico 23

GCALP - alcalina fosfatase células germinativas

GPx - glutatona peroxidase

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

HEPES - ácido 2- [4- (2-hidroxi-etil) piperazin-1-il] etanossulfônico

HER2 - receptor de membrana do fator de crescimento epidérmico humano-2

HIF1 α - fator indutor de hipóxia - 1 α

HTC - hipótese da taxa de crescimento

IALP – fosfatase alcalina intestinal

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LCIS - carcinoma lobular *in situ*, do inglês *lobular carcinoma in situ*

LRA – lesão renal aguda

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MEC – matriz extracelular

MMPs - metaloproteinases da matriz extracelular

MTS - 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio

NAC - N-acetilcisteína

NOX – NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) oxidase

OMS – Organização Mundial de Saúde

NOSe - óxido nítrico sintetase endotelial

PAA - ácido fosfonoacético, do inglês *phosphonoacetic acid*

PACP - fosfatase ácida citosólica prostática

PALP – fosfatase alcalina placentária

PAPsec – fosfatase ácida prostática secretada

PBS - solução salina de tampão fosfato

PFA - ácido fosfonofórmico, do inglês *phosphonoformic acid*

PFK - 6-fosfofruto-1-quinase

pHi – pH intracelular

Pi – fosfato inorgânico

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

PMA - forbol 12-miristato 13-acetato

p-NP - *p*-nitrofenol

p-NPP - *p*-nitrofenilfosfato

PTEN – fosfatase homóloga à tensina

PTH - paratormônio

PTP1B - proteína tirosina fosfatase 1B

RE – receptor de estrogênio

RP – receptor de progesterona

rTKs - receptores tirosina-cinases, do inglês *receptor tyrosin kinase's*

SDS - dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*

SFB – soro fetal bovino

siRNA – pequeno ácido ribonucléico de interferência

SITS - 4-acetamido-4-isotiocianostilbeno-2,2-disulfonato

SOD – superóxido dismutase

TEM – transição epitélio-mesenquimal

TGFβ - fator de crescimento transformador β (TGFβ, do inglês *transforming growth factor β*)

TM-PAP – fosfatase ácida prostática transmembrana

TNALP – fosfatase alcalina não específica de tecido

TNF – fator de necrose tumoral, do *inglês tumor necrosis factor*

UDP – uridina difosfato

UTP – uridina trifosfato

VCs - calcificações vasculares, do *inglês vascular calcifications*

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, do *inglês vascular endothelial growth factor*

VM - vesículas da matriz

Δp - força próton-motiva

ΔpH - diferença no potencial elétrico através da membrana

$\Delta \Psi$ - potencial da membrana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 BIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	18
1.1.1 <i>Biologia da mama.</i>	18
1.1.2 <i>Classificação histológica do câncer de mama</i>	21
1.1.3 <i>Incidência e mortalidade do câncer de mama</i>	23
1.1.4 <i>Características do câncer de mama.</i>	24
1.1.5 <i>Estresse oxidativo: uma relação sobre as características do câncer de mama</i>	34
1.1.6 <i>Linhagens celulares de câncer mama</i>	41
1.1.7 <i>Diagnóstico, estadiamento e tratamento</i>	44
1.1.8 <i>O papel adjuvante do resveratrol no tratamento do câncer de mama</i>	46
1.2 HOMEOSTASE DE FOSFATO INORGÂNICO E CÂNCER	48
1.2.1 <i>Importância biológica do Pi</i>	49
1.2.2 <i>Transportadores de Pi sódio-dependente</i>	50
1.2.3 <i>Homeostase de Pi e sua regulação pelos transportadores de Pi sódio-dependente</i>	51
1.2.4 <i>Regulação da homeostase de Pi pelos transportadores de Pi Na⁺-independente</i>	53
1.2.5 <i>Distúrbios da homeostase do Pi</i>	58
1.2.6 <i>Alterações da sinalização celular pela hiperfosfatemia</i>	59
1.2.7 <i>Hiperfosfatemia e câncer</i>	60
1.3 PRODUÇÃO DE PI EXTRACELULAR: PARTICIPAÇÃO DAS ECTO-ENZIMAS	63
1.3.1 <i>Ecto-Nucleotidases</i>	64
1.3.2 <i>Fosfatases ácidas</i>	66
1.3.3 <i>Co-Relação das Ecto-Nucleotidases, Ecto-Fosfatases e Transporte de Pi</i>	66
1.4 TRANSPORTADORES DE P _i E CÂNCER.....	67
1.4.1 <i>Transportadores de Pi sódio-dependente</i>	68
1.4.2 <i>Transportadores de Pi sódio-independente em células de câncer</i>	72
2. OBJETIVOS.....	74
2.1 OBJETIVO GERAL	74
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74

3	MATERIAIS E MÉTODOS	76
3.1	MATERIAIS	76
3.2	CULTURA DE CÉLULAS	76
3.2.1	<i>Cultura das células não tumorigênicas.....</i>	76
3.2.2	<i>Cultura das células de câncer de mama</i>	77
3.2.3	<i>Adição de Pi no crescimento das linhagens celulares de mama.....</i>	78
3.2.4	<i>Adição de compostos químicos potencialmente farmacológicos no crescimento das células MDA-MB-231.....</i>	78
3.2.5	<i>Lavagem de células antes dos testes experimentais.....</i>	78
3.2.6	<i>Congelamento e descongelamento de células.....</i>	79
3.3	ATIVIDADE FOSFATÁSICA	79
3.4	PCR EM TEMPO REAL.....	80
3.5	TRANSPORTE DE P ₁	80
3.5.1	<i>Transporte de Pi sódio-dependente.....</i>	81
3.5.2	<i>Transporte de Pi próton-dependente.....</i>	81
3.6	ATIVIDADE NA ⁺ -K ⁺ -ATPASE E NA ⁺ -ATPASE	81
3.7	QUANTIFICAÇÃO ÓPTICA DO pH INTRACELULAR.....	82
3.8	IMAGEM DE IMUNOFLOUORESCÊNCIA	82
3.9	PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂	83
3.10	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	83
3.11	TAXAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	83
3.12	CONTEÚDO DE ATP INTRACELULAR	84
3.13	PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR.....	84
3.14	ADESÃO CELULAR.....	84
3.15	MIGRAÇÃO CELULAR	85
3.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
4	RESULTADOS	87
4.1	PARTE 1: PRODUÇÃO DE PI EXTRACELULAR NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA: PARTICIPAÇÃO DAS ECTO-FOSFATASES.....	87
4.1.1	<i>Fosfatases extracelulares em linhagens celulares de mama</i>	87
4.1.2	<i>Características cinéticas, inibidores e possíveis substratos</i>	88
4.1.3	<i>Relação da ecto-fosfatase com processos tumorais.....</i>	91

4.2 PARTE 2: TRANSPORTADOR DE $P_i H^+$ -DEPENDENTE: IDENTIFICAÇÃO E UMA CORRELAÇÃO COM A METÁSTASE.	92
4.2.1 Transporte de $P_i H^+$ -dependente em diferentes linhagens celulares de mama.....	93
4.2.2 Características cinéticas do transporte de $P_i H^+$ -dependente.....	94
4.2.3 Efeito do PAA no transporte de P_i , proliferação celular, adesão e migração.....	98
4.2.4 Influência do elevado P_i extracelular para o transporte de $P_i H^+$ -dependente e Na^+ -dependente	102
4.3 PARTE 3: TRANSPORTADOR DE $P_i Na^+$ -DEPENDENTE: INIBIÇÃO PELO RESVERATROL.	103
4.3.1 Influência do resveratrol no transporte de P_i em células MDA-MB-231	103
4.3.2 Resveratrol é um inibidor direto do transporte de P_i	104
4.3.3 Resveratrol é um inibidor irreversível do transporte de P_i , adesão e migração celular.....	107
4.3.4 A migração e adesão em células MDA-MB-231 inibida pelo resveratrol é revertida pelo elevado P_i extracelular.	109
4.4 PARTE 4: TRANSDUÇÃO DO SINAL: GERAÇÃO DE H_2O_2 COMO UMA RESPOSTA SUBJACENTE AO ALTO NÍVEL DE P_i EXTRACELULAR	111
4.4.1 Efeito do elevado P_i extracelular na produção de H_2O_2	112
4.4.2 Possível regulação dos transportadores de P_i pelo H_2O_2	117
4.4.3 Influência do elevado P_i extracelular para o fenótipo migratório	119
5 DISCUSSÃO.....	123
5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	123
5.2 PRODUÇÃO DE P_i EXTRACELULAR NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA: PARTICIPAÇÃO DAS ECTO-FOSFATASES.	124
5.3 TRANSPORTADOR DE $P_i H^+$ -DEPENDENTE: IDENTIFICAÇÃO E UMA CORRELAÇÃO COM A METÁSTASE	129
5.4 TRANSPORTADOR DE $P_i Na^+$ -DEPENDENTE: INIBIÇÃO PELO RESVERATROL.....	133
6 CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS	145

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura anatômica da mama.....	19
Figura 2: O desenvolvimento da glândula mamária.....	21
Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer.....	23
Figura 4: Taxa de mortalidade por câncer de mama.....	24
Figura 5: Características do câncer de mama.....	25
Figura 6: Processo sequencial de metástase do câncer.....	29
Figura 7: Vias de sinalização e fatores de transcrição envolvida na TEM.....	31
Figura 8: Homeostase redox - mecanismos de geração e eliminação das EROs.....	35
Figura 9: Estrutura proposta da região central das NOXs.....	36
Figura 10: Principais pontos de geração das EROs na cadeia transportadora de elétrons.....	38
Figura 11: Os subtipos moleculares de câncer de mama apresentam uma produção diferencial das ERO.....	40
Figura 12: Relação morfológica e potenciais invasivos de diferentes linhagens de mama.....	43
Figura 13 - Estrutura química de dois isômeros geométricos do resveratrol.....	47
Figura 14 - Ilustração gráfica da importância biológica do Pi.....	49
Figura 15: Modelos de transporte de Pi Na ⁺ -Dependente.....	50
Figura 16 – “ <i>Downregulation</i> ” de NaPi-IIa por PTH no túbulo proximal renal.....	52
Figura 17: Representação da importância do transporte Pi sódio-independente para a homeostase do Pi.....	56
Figura 18: Mecanismo esquemático do transporte de Pi sódio-independente para a patologia.....	57
Figura 19: Influência da elevada dieta de Pi para indução tumoral.....	61
Figura 20: Efeito do elevado Pi na proliferação e migração em células de câncer de mama.....	63
Figura 21 - Catálises das ecto-nucleotidases e ecto-fosfatases.....	64
Figura 22: Ilustração dos possíveis papéis dos transportadores Pi nos processos tumorais.....	70
Figura 23: Caracterização do transporte de Pi sódio-dependente em células de câncer de mama.....	71
Figura 24: NaPi-IIb confere resistência a quimioterápicos em células de câncer de mama.....	72
Figura 25: Sistema de transporte de Pi em células de tumores ascíticos de Ehrlich.....	73
Figura 26 - Fosfatases extracelulares em linhagens de células mamárias.....	87
Figura 27 - Influência do tartarato nas atividades da fosfatase secretada e ectofosfatase.....	88
Figura 28 - Características cinéticas e teste de inibidores na atividade ecto-fosfatásica.....	89
Figura 29 - Especificidade de substrato para atividade ecto-fosfatásica.....	91
Figura 30 - Efeito do ortovanadato de sódio na proliferação, adesão e migração celular.....	92
Figura 31: Taxas comparativas de influxo de ³² Pi H ⁺ -dependente em linhagens celulares de mama.....	95
Figura 33: Efeito de ânions no influxo de ³² Pi H ⁺ -dependente.....	96
Figura 34: Efeito do influxo de íons na captação de ³² Pi H ⁺ -dependente.....	96
Figura 35: Influência da adição de Pi na mudança do pH intracelular em função do tempo.....	97
Figura 36: Efeito do PAA no influxo de ³² Pi H ⁺ -dependente, proliferação, adesão e migração celular.....	99
Figura 37: Efeito do PAA na expressão de E-caderina e vimentina.....	101
Figura 38: Efeito da alta concentração de fosfato e PFA na expressão e atividade de transporte de Pi.....	102
Figura 39: Efeito do resveratrol no transporte de Pi Na ⁺ -dependente e H ⁺ -dependente.....	104
Figura 40: Inibição não-competitiva do transporte de Pi Na ⁺ -dependente pelo resveratrol.....	105

Figura 41: Influência do resveratrol na Na^+ , K^+ -ATPase, Na^+ -ATPase ou na produção de EROs.	107
Figura 42: A inibição irreversível do transporte de Pi Na^+ -dependente e seus efeitos tumorais.	108
Figura 43: Efeito do resveratrol e Pi na migração, adesão, transporte de Pi e viabilidade.	110
Figura 44: Efeito do alto Pi no transporte de Pi em diferentes linhagens celulares da mama.	111
Figura 45: Efeito do elevado Pi na produção de H_2O_2 em diferentes linhagens de mama.	112
Figura 46: O efeito do elevado Pi na produção de H_2O_2 é dependente do transporte de Pi ?	113
Figura 47: Efeito do alto Pi na produção de H_2O_2 por 1 h ou 24 h.	114
Figura 48: A produção de H_2O_2 é dependente do potencial de membrana mitocondrial?	115
Figura 49: Consumo de O_2 e conteúdo de ATP em elevada concentração de Pi por 1h ou 24 h.	116
Figura 50: A fonte secundária da produção de H_2O_2 induzida por Pi nas células MDA-MB-231.	117
Figura 51: Efeito do alto Pi no transporte Pi Na^+ -dependente ou H^+ -dependente por 1 h ou 24 h.	118
Figura 52: Efeito das concentrações de H_2O_2 no transporte de Pi Na^+ -dependente ou H^+ -dependente.	118
Figura 53: Efeito do NAC no transporte de Pi Na^+ -dependente ou H^+ -dependente.	119
Figura 54: Efeito do elevado Pi na migração e adesão em diferentes linhagens de mama.	120
Figura 55: O efeito do elevado Pi na migração e adesão celular é dependente do transporte de Pi	121
Figura 56: Realocação dos valores de migração e adesão celular em relação a produção de H_2O_2	122
Figura 57: Efeito do NAC na migração e adesão celular induzido por Pi em células MDA-MB-231.	122
Figura 58 - O papel das ectoenzimas na geração de Pi no microambiente tumoral de câncer de mama. .	128
Figura 59 - Mecanismo proposto para o transportador de Pi H^+ .dependente em MDA-MB-231	131
Figura 60: Representação da produção de peróxido de hidrogênio induzido por Pi em MDA-MB-231. .	137
Figura 61: Representação da modulação dos transportadores Pi pelo H_2O_2 em células MDA-MB-231. .	140

Índice de equação

Equação 1	38
-----------------	----

Índice de quadros informativos

Quadro 1: Fatores que aumentam o risco de câncer de mama em mulheres.....	23
---	----

Índice de tabelas

Tabela 1: Classificação molecular das linhagens celulares de câncer de mama.....	42
Tabela 2: Tipos de tratamento do câncer de mama.	45
Tabela 3 - Transportadores de Pi Na ⁺ -Dependente.....	51
Tabela 4: Parâmetros cinéticos dos transportadores de Pi Na ⁺ -independente em diversos tecidos.	54
Tabela 5: Diferentes resultados observados dos transportadores de Pi em câncer.	69
Tabela 6: Hidrólise de p-NPP, ATP, ADP e AMP na presença ou ausência de ortovanadato de sódio.	90
Tabela 7: Parâmetros cinéticos do transportador de Pi Na ⁺ -dependente com resveratrol.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é um tumor maligno que começa nas células normais da mama e podem crescer em tecidos circundantes ou se espalhar (metastizar) para áreas distantes do corpo (BLAND e COPELAND, 1994). A etiologia do câncer de mama se dá através de mutações genéticas influenciadas por fatores hereditários ou ambientais (VIEIRA, 2012), podendo levar à inativação ou ativação de genes que controlam o crescimento celular normal e a replicação celular (AMENDOLA e VIEIRA, 2005); (ELLIS e MAHADEVAN, 2013). Devido à complexibilidade molecular envolvida na oncogênese e desenvolvimento do câncer de mama, alguns aspectos da biologia normal da mama precisam ser compreendidos antes de estudar a respeito da biologia molecular e tecidual do câncer de mama.

1.1.1 Biologia da mama

A mama é composta por estruturas glandulares que garantem a produção de leite sob controle hormonal. Essas estruturas anatômicas são cercadas por tecidos fibrovascular e adiposo que fornecem uma função fisiológica importante como nutrição e proteção não só para o lactente (o filho) mas também para a lactante (a mãe) (BLAND e COPELAND, 1994).

1.1.1.1 Anatomia da mama.

As mamas são estruturas glandulares pares independentes, localizadas nas partes anterior e lateral do tórax. São compostas de dois conjuntos de partes, a externa e a interna. No geral, a parte externa compreende a papila e a aréola, como apontado na Figura 1 (BLAND e COPELAND, 1994).

A parte interna da mama é composta por um conjunto de glândulas, a partir dos quais os tubos lactíferos chegam à papila. As glândulas e os ductos são unidos entre si por meio de uma membrana fibrosa que penetra na superfície da glândula, conectando seus pequenos corpos glandulosos constituintes, chamados de ligamentos de Cooper (Figura 1) (COOPER, 2005).

Para uma melhor compreensão anatômica da parte interna da mama, será demonstrado de acordo com o tipo de tecido: tecido glandular epitelial, tecido adiposo e tecido fibroso (estroma) que atravessa e rodeia o tecido glandular (PANDYA e MOORE, 2011); (ELLIS e MAHADEVAN, 2013).

O tecido glandular é do tipo túbulo-alveolar, constituído por 12-20 lobos, formado por lóbulos e estes por alvéolos glandulares. Os alvéolos glandulares compreendem células lactóforas e células mioepiteliais. As células lactóforas são células epiteliais glandulares de superfície importantes para a produção de leite em direção ao lúmen do alvéolo; molecularmente são denominadas como células luminais, pois expressam citoqueratinas (CKs, do inglês, *cytokeratines*) 8, 18 e 19 (PATTON e JENSEN, 1975); (HERGUETA-REDONDO, PALACIOS, *et al.*, 2008). E as células mioepiteliais, de origem muscular, envolvem a superfície do alvéolo e realizam a contração do mesmo para a eliminação do leite sob estímulo do hormônio ocitocina; molecularmente são classificadas como células basais, pois expressam CKs 5/6, 14, 17 e também expressam vimentina, actina do músculo liso, proteína TP63 e CD10 (LINZELL, 1952); (HERGUETA-REDONDO, PALACIOS, *et al.*, 2008). O leite produzido dos alvéolos sai dos lóbulos de cada lobo mamário. Cada lobo é drenado por um canal excretor próprio, o canal lactífero. Os canais lactíferos são sinuosos, independentes e dirigem-se todos para a base da papila (OWENS, HILL e HOPKINS, 2013); (PATTON e JENSEN, 1975); (BLAND e COPELAND, 1994); (PANDYA e MOORE, 2011).

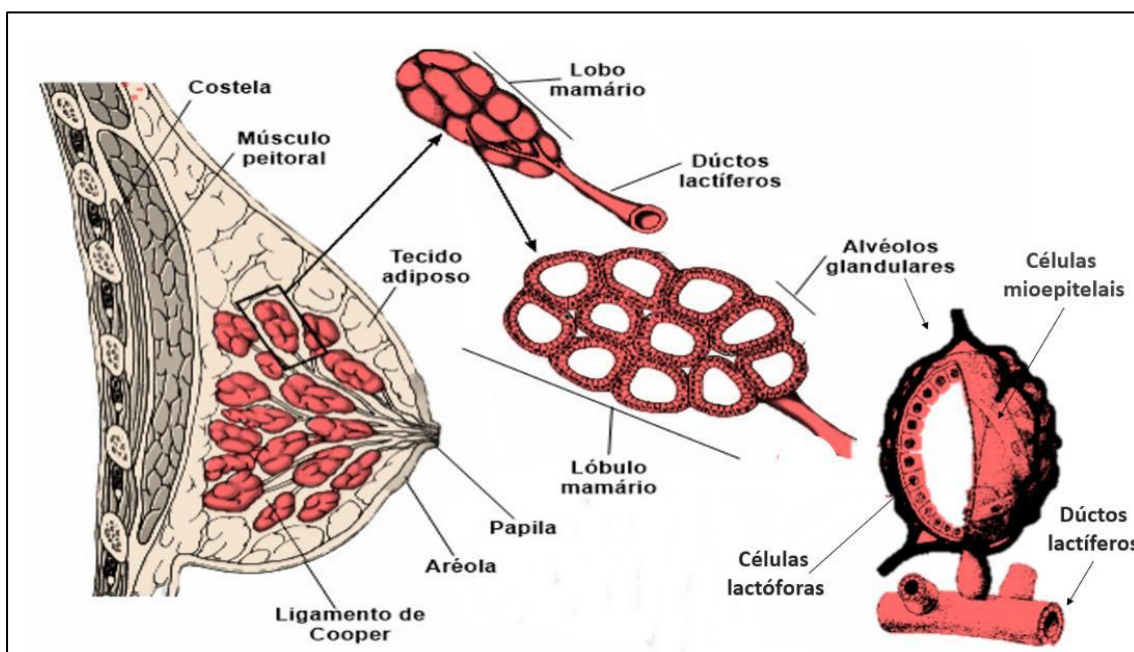


Figura 1: Estrutura anatômica da mama. A mama localizada a frente do músculo peitoral, constituída principalmente pelo tecido glandular. Composto pelos lobos, lóbulos e alvéolos mamários, conectados pelos ductos lactíferos até a região final excretória da mama, papila, que se projeta externamente na aréola mamária. Quanto aos alvéolos glandulares, são basicamente constituídos por células epiteliais lactóforas e células mioepiteliais. Figuras adaptadas de: (ACS, 2019); (COOPER, 2005) e (PATTON e JENSEN, 1975).

O tecido adiposo subcutâneo reveste a glândula completamente, podendo descrever-se em duas partes: a parte anterior, situada entre a glândula e a pele; e a parte posterior, que é denominada bolsa serosa entre a base da glândula e grande peitoral (PANDYA e MOORE, 2011).

O tecido conjuntivo fibroso estende-se desde a bolsa serosa até à derme, por entre os lobos e canais lactíferos. É bem desenvolvido na parte superior da mama, ajudando a sustentar seus lobos (PANDYA e MOORE, 2011); (ELLIS e MAHADEVAN, 2013).

1.1.1.2 Fisiologia e desenvolvimento da mama.

Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre o crescimento e diferenciação da mama em ambos os sexos e as glândulas pareadas desenvolvem-se entre os brotos dos membros pré-mamários (Figura 2 A) (BLAND e COPELAND, 1994).

Com o início da puberdade, a mama feminina se diferencia da mama masculina sob a ação de diversos hormônios liberados no ciclo menstrual. O crescimento inicial é afetado principalmente pelo estrogênio, que induz a proliferação, a ramificação do sistema de ductos mamários, bem como a maturação e proeminência dos mamilos. No entanto, o desenvolvimento e a proliferação de alvéolos nas extremidades dos ductos mamários são o resultado de ações combinadas e sinérgicas do estrogênio e progesterona (Figura 2 B) (ELLIS e MAHADEVAN, 2013); (BLAND e COPELAND, 1994).

No estágio adulto, os níveis de hormônios femininos e o tamanho dos alvéolos e ductos se estabilizam (Figura 2 C). Durante o início da gravidez, o desenvolvimento da mama se completa, os hormônios que influenciam esse crescimento incluem estrogênio, progesterona, hormônio do crescimento, prolactina e hormônio placentário. Durante o primeiro trimestre, os elementos do estroma da mama são gradualmente substituídos pelo epitélio glandular. Já no terceiro trimestre, a diferenciação do epitélio resulta no desenvolvimento de células secretoras que são capazes de sintetizar e secretar proteínas do leite (Figura 2 D) (PANDYA e MOORE, 2011); (BLAND e COPELAND, 1994); (ELLIS e MAHADEVAN, 2013).

Após o parto, os níveis de estrogênio e progesterona diminuem, resultando em lactação. Durante a sucção do lactente, ocorre a liberação de prolactina e ocitocina, no qual induz a produção e secreção de leite. Na ausência de sucção, a secreção de leite cessa conseqüentemente as glândulas regridem e retornam a um estado inativo (Figura 2 E) (PATTON e JENSEN, 1975); (ELLIS e MAHADEVAN, 2013)

Após a menopausa, a glândula se atrofia. À medida que a liberação de hormônios ovarianos é diminuída, as células secretórias dos alvéolos degeneram e desaparecem, mas alguns ductos permanecem. O tecido conjuntivo também demonstra alterações degenerativas, marcadas por uma redução no número de células estromais e fibras colágenas (Figura 2 F) (BLAND e COPELAND, 1994); (ELLIS e MAHADEVAN, 2013).

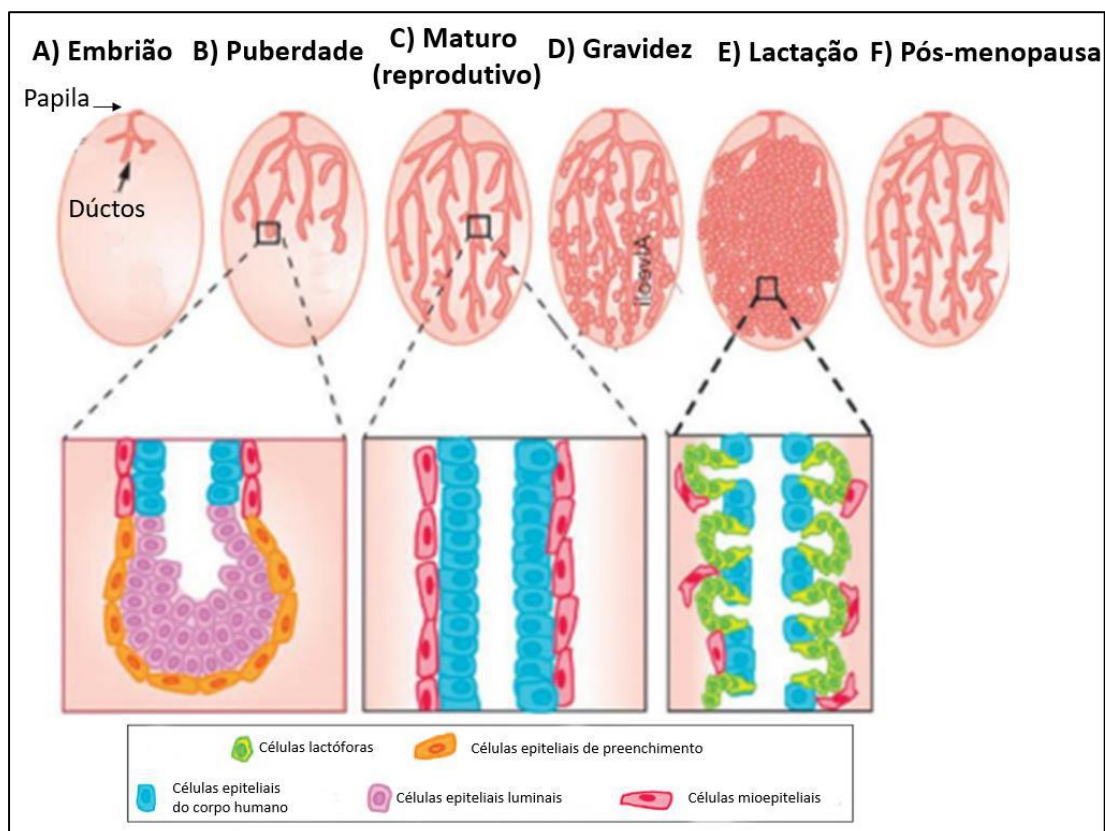


Figura 2: O desenvolvimento da glândula mamária. Os brotos dos membros pré-mamários na fase do nascimento permanecem inativos até a puberdade (A). Devido aos hormônios da puberdade, as células ductais epiteliais se expandem (B). A glândula mamária de adultos é preenchida com estruturas ramificadas epiteliais. Os ductos dessa estrutura contêm uma camada externa de células mioepiteliais e uma camada interna de células epiteliais luminais (C). A gravidez é acompanhada por diferentes alterações hormonais que sinalizam uma grande expansão de células lactóforas (D). Durante a lactação, os alvéolos se expandem (E). Após a menopausa, a glândula se atrofia ou involui, as células secretórias dos alvéolos degeneram e desaparecem, mas alguns ductos permanecem (F). Adaptado de: (HIMASNSHU e MICHAEL, 2018).

1.1.2 Classificação histológica do câncer de mama

O câncer de mama pode se originar de células lactóforas (lobular) ou de células dos ductos lactíferos (ductal). A proliferação descontrolada dessas células culmina na formação de tumores que podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos são geralmente de crescimento lento, encerrados em uma cápsula fibrosa e não invasivos,

denominados *in situ* (FOSTER, PITRODA e WEICHSELBAUM, 2020); (TALMADGE e FIDLER, 2010).

As células de câncer de mama podem ter localizações anatômicas diferentes e potenciais tumorais diferentes combinados entre si. Portanto, existem diversas classificações dos tipos de câncer, as anatômicas e histológicas ou moleculares (oncogenes) (GIRISH et al, 2014). Tais classificações são fundamentais para facilitar o diagnóstico e o tratamento da patologia (BLAND e COPELAND, 1994).

É demonstrado que o carcinoma ductal *in situ* (DCIS, do inglês *ductal carcinoma in situ*) é um precursor do câncer invasivo (embora nem sempre isso aconteça). Ele raramente é diagnosticado, representa apenas cerca de 1-2% dos carcinomas da mama recém-diagnosticados (ERBAS et al., 2006). Já o carcinoma lobular *in situ* (LCIS) é considerado uma condição benigna associada ao aumento do risco de câncer de mama, mas sem o potencial de progredir para o câncer invasivo (ACS, 2019); (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014).

Em contraste, os tumores malignos raramente encapsulam; crescem rapidamente e metastizam, ou seja, as células anormais rompem as paredes das glândulas ou ductos onde se originam e crescem no tecido mamário circundante (BLAND e COPELAND, 1994); (TALMADGE e FIDLER, 2010). A maioria (81%) dos cânceres de mama é invasiva, dentre eles, o carcinoma ductal invasivo é o mais comum. Já em relação ao carcinoma lobular invasivo, um entre dez cânceres de mama invasivo é encontrado do subtipo lobular, considerado mais difícil de detectar por uma mamografia do que o carcinoma ductal invasivo (ACS, 2019). Existem diversos fatores de riscos, seja unicamente ou em conjunto (dependente do grau de risco), que podem contribuir para a transformação de uma célula normal em cancerosa, como por exemplo o alcoolismo, tabagismo, pré-disposição genética, obesidade, uso prolongado de terapia hormonal, entre outros; eles se enquadram de acordo com a potencialidade de desenvolver o câncer de mama (Quadro 1) (ACS, 2019).

Além disso, os fatores de risco (e suas respectivas gravidades) podem influenciar na progressão de um tumor benigno para maligno invasivo (Quadro 1) (ACS, 2019). Por exemplo, pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal *in situ* possuem risco alto, enquanto o diagnóstico de carcinoma lobular *in situ* aponta para um risco moderadamente elevado de desenvolvimento de um tumor mamário maligno (ACS, 2019).

Quadro 1: Fatores que aumentam o risco de câncer de mama em mulheres.

Risco gravemente elevado	Risco moderadamente alto
<ul style="list-style-type: none"> • Idade (<65 anos) • Hiperplasia atípica • Carcinoma lobular <i>in situ</i> • Variações genéticas patogênicas (por exemplo, BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53) 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma ductal <i>in situ</i> • Níveis elevados de hormônios endógenos (pós-menopausa) • Radiação em altas doses no peito (por exemplo, tratamento com linfoma de Hodgkin) • Seios mamograficamente densos • Dois ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama
Risco moderado	
<ul style="list-style-type: none"> • Nunca amamentou uma criança • Um parente de primeiro grau com câncer de mama • Obesidade (pós-menopausa) • História pessoal de câncer de ovário ou endometrial • Inatividade física • Ganho de peso na idade adulta • Uso recente e a longo prazo da terapia hormonal na menopausa contendo estrogênio e progestina • Uso recente de contraceptivo hormonal 	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo de álcool • Menarca precoce (<11 anos) • Excesso de peso corporal • Altos níveis endógenos de estrogênio ou testosterona (pré-menopausa) • Idade avançada na primeira gravidez a termo (> 30 anos) • Menopausa tardia (≥55 anos)

Adaptada de (ACS, 2019).

1.1.3 Incidência e mortalidade por câncer de mama

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer de mama é a quinta causa mais frequente de morte por câncer em geral (626.679 óbitos) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres (24,2% do total de casos em 2018) (WHO, 2020).

No Brasil, o câncer de mama também é o segundo câncer mais incidente em mulheres, ficando atrás dos tumores de pele não melanoma (INCA, 2021). Para o ano de 2020, foram estimados 66.280 casos novos (Figura 3), o que representa uma taxa de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2021).

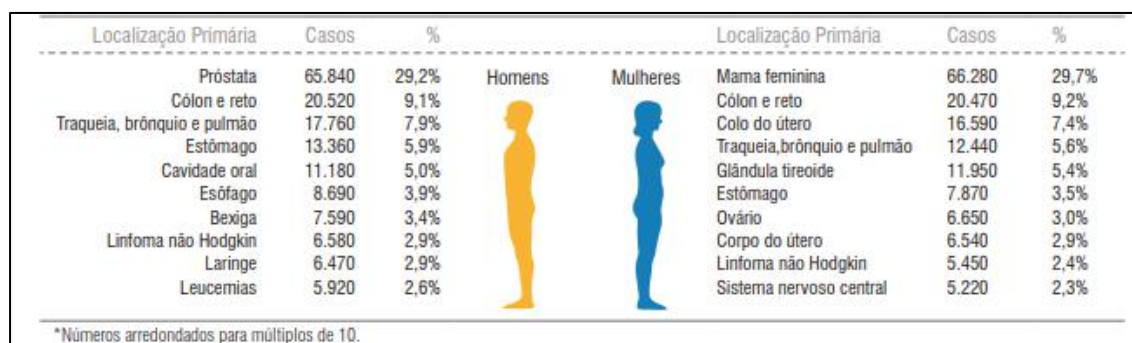


Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer. Cânceres mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto o de pele não melanoma. Figura retirada do documento “Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil” (INCA, 2021).

Em relação a todas regiões brasileiras, o câncer de mama feminina ocupa a primeira posição, com um risco estimado de 81,06 por 100 mil na região Sudeste; de 71,16 por 100 mil na região Sul; de 45,24 por 100 mil na região Centro-Oeste; de 44,29 por 100 mil na região Nordeste; e de 21,34 por 100 mil na região Norte (INCA, 2021).

Não existe somente um fator de risco para o câncer de mama como mostrado no Quadro . No entanto, a idade acima dos 50 anos é considerada a mais agravante para desenvolver a doença, com um risco dez vezes maior. A mortalidade do câncer de mama tende a crescer progressivamente a partir dos 40 anos; no entanto, em mulheres abaixo de 40 anos, ocorrem menos de 10 óbitos a cada 100 mil mulheres (Figura 4) (INCA, 2021).

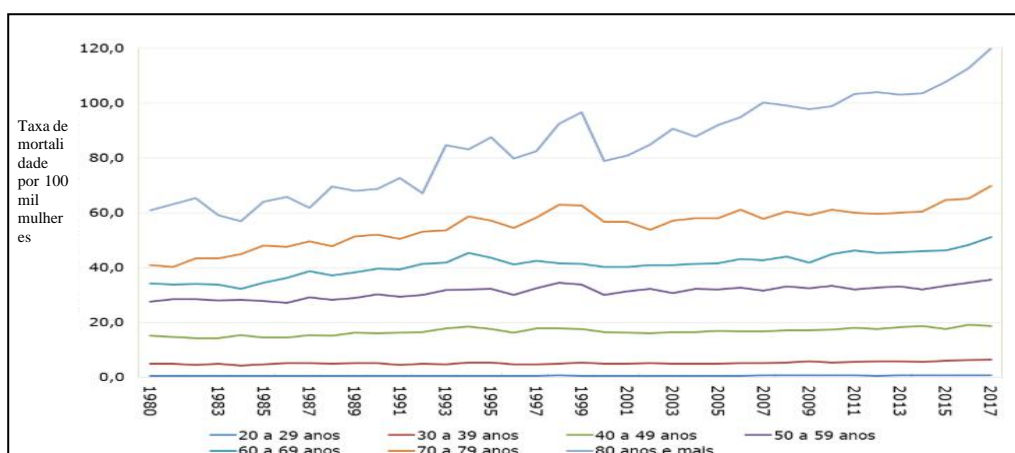


Figura 4: Taxa de mortalidade por câncer de mama. Mortalidade por câncer de mama específica por faixa etária, em 100.000 mulheres. Brasil, 1990 a 2018. Gráfico realizado pelo atlas de mortalidade do INCA (INCA, 2021).

1.1.4 Características do câncer de mama

As células cancerígenas diferem das células normais por uma série de características importantes denominadas por HANAHAN&WEINBERG (2000) como “*Hallmarks of cancer*” (“características do câncer”), tais como: autossuficiência nos sinais de crescimento, inibição de supressores tumorais, inibição da apoptose, replicação ilimitada (imortalização), angiogênese sustentada e invasão e metástase (Figura 5 (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Dez anos depois, Hannan e Weinberg (2011) acrescentam mais quatro características em um novo artigo intitulado “*Hallmarks of cancer: next generation*” (“Características do câncer: próxima geração”), a saber: metabolismo desregulado, escape do sistema imunológico, iniciação da inflamação e instabilidade do genoma (anormalidades cromossômicas e pequenas mutações genéticas) (Figura 5) (HANAHAN

e WEINBERG, 2011). Será demonstrado a seguir um pouco mais detalhadamente algumas dessas características com foco na classificação molecular, nos processos de metástases e no metabolismo do câncer de mama.

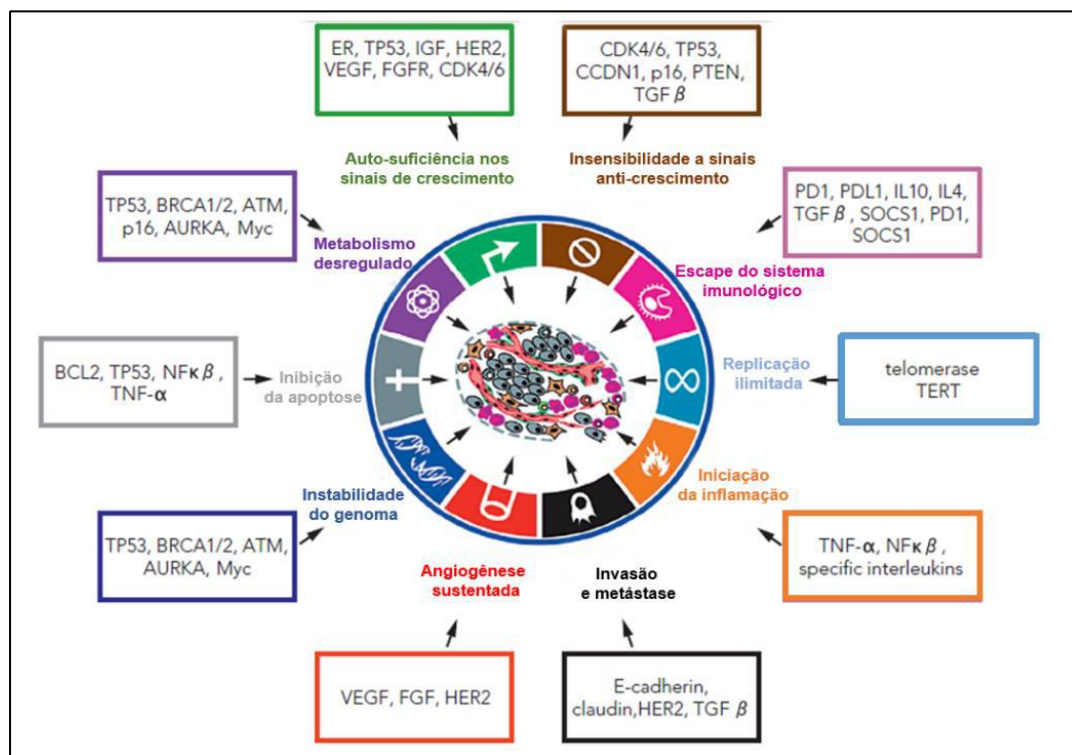


Figura 5: Características do câncer de mama. As características associadas ao câncer são causadas pela atividade alterada de múltiplos genes. A figura ilustra os principais marcadores associados às respectivas características marcantes no contexto do câncer de mama. Modificado de (HIMASNSHU e MICHAEL, 2018) e (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

1.1.4.1 Sustentação da sinalização proliferativa e classificação molecular do câncer de mama

Uma sinalização desregulada em células de câncer basicamente é mediada por oncogenes. Os oncogenes tipicamente são genes que codificam fatores de crescimento ou receptores de fatores de crescimento; logo, uma característica essencial do câncer é a aquisição de sinalização de crescimento sustentável. Sob condições normais, os fatores de crescimento se ligam a receptores específicos para induzir a transcrição de proteínas específicas à divisão e o crescimento celular (HIMASNSHU e MICHAEL, 2018). Ao desligar os mecanismos reguladores normais, as células de câncer adquirem a autossuficiência de crescimento pelos seguintes mecanismos comuns: 1) utilização dos próprios ligantes de fator de crescimento por sinalização autócrina; 2) indução das células estromais normais a secretarem fatores de crescimento, para realizar sinalização parácrina; 3) superexpressão de receptores indutores de crescimento; 4) alteração da

estrutura ou tipo do receptor, causando ativação independente da ligante da sinalização proliferativa (HIMASNSHU e MICHAEL, 2018); (BLAND e COPELAND, 1994).

A sinalização do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP) e a sinalização do receptor da membrana do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2) são as vias comumente conhecidas para indução da proliferação no câncer de mama.

O RE é um membro da superfamília dos receptores hormonais esteroides dependentes de ligantes – o estradiol é uma forma predominante de estrogênio biologicamente ativo. Os efeitos do estrogênio são mediados por duas proteínas receptoras, ER α e ER β , que em conjunto regulam vários processos essenciais ao desenvolvimento fisiológico, reprodutivo, metabolismo ósseo e sistemas nervoso central e cardiovascular (MILLER e DUCKLES, 2008). Aproximadamente 70% dos cânceres de mama expressam RE, sendo um grande interesse no diagnóstico e terapia. O estrogênio pode induzir a proliferação mediado pelo RE α (ativando promotores de elementos em resposta ao estrogênio) e independente de RE α , no qual o RE ativa a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), formando um complexo com ele no núcleo para mediar a transcrição de genes-alvo específicos (YUE, YAGER, *et al.*, 2013).

O RP é um receptor nuclear intimamente associado ao RE, sendo um alvo direto do RE α . Possui duas isoformas altamente estudadas, RPA e RPB. A positividade para RP é um pouco menos comum que a positividade para RE em cânceres invasivos, embora a positividade para RP (RP⁺) indique sinalização ativa de RE (BRISKEN e SCABIA, 2020); (RICHER, JACOBSEN, *et al.*, 2002). Os tumores RE positivo (RE⁺) sem expressão de RP (RP⁻) demonstraram ter aumentado a ocorrência em comparação com os tumores ER⁺/PR⁺, além de aumentar significativamente a sinalização do fator de crescimento via PI3K/Akt /mTOR (CREIGHTON, KENT OSBORN, *et al.*, 2009); (BRISKEN e SCABIA, 2020).

O membro da família de receptores do fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) HER2 é outra via de sinalização proliferativa comum no câncer de mama (HIMASNSHU e MICHAEL, 2018). O HER2 é superexpresso em aproximadamente 15% dos pacientes com câncer de mama, considerado um marcador incipiente de diagnóstico, mas um importante receptor para a progressão do câncer de mama (FIGUEROA-MAGALHÃES, JELOVAC, *et al.*, 2014). A ativação é iniciada através de ligantes específicos, de forma autônoma, seguido por dimerização do receptor e auto-fosforilação, o que leva a várias cascatas de transdução que atuam através de uma

variedade de vias no qual se materializam na proliferação, angiogênese, aumento da motilidade celular, metástase e resistência à apoptose (OVED e YARDEN, 2002).

Devido à importância dos receptores hormonais RE, RP e HER2 para a progressão do câncer de mama, é usualmente utilizada na clínica diagnóstica a marcação desses receptores em amostras de biopsia para classificação molecular do câncer de mama, o que é importante para prever o perfil de evolução do quadro clínico e melhores medidas de tratamento (HERGUETA-REDONDO, PALACIOS, *et al.*, 2008).

Por convenção, devido à classificação molecular, o câncer de mama originado por células lactíferas é denominado como luminal e o câncer de mama originado por células mioepiteliais é denominado como basal (HERGUETA-REDONDO, PALACIOS, *et al.*, 2008). Portanto, o câncer de mama é classificado molecularmente com base na expressão de receptores hormonais e na origem celular (CHEANG, MARTIN, *et al.*, 2015).

Luminal A (RE⁺, RP⁺/HER2⁻): é o subtipo mais comum de câncer de mama (66,6%¹), tende a crescer mais lentamente e é menos agressivo do que outros subtipos; portanto, estão associados ao prognóstico mais favorável, em parte porque geralmente respondem à terapia hormonal (HOWLADER, CRONIN, *et al.*, 2018); (EISENBERG e KOIFMAN, 2001)

Luminal B (RE⁺, RP⁺/HER2⁺): esse subtipo de câncer de mama, além de ser positivo para RE e RP, é positivo também para HER2, mais recentemente foi definido por ser altamente positivo para a proteína Ki67 (um indicador de um grande número de células em divisão) ou HER2 (HOWLADER, CRONIN, *et al.*, 2018). É o segundo mais incidente da classe luminal (9.7%¹), mas está associado a piores resultados no tratamento (HOWLADER, CRONIN, *et al.*, 2018).

Enriquecido com HER2 (RE⁻, RP⁻/HER2⁺): esse subtipo de câncer de mama possui uma incidência de 8.7%¹ e antigamente era o pior prognóstico; no entanto, com o uso generalizado de terapias direcionadas para câncer de HER2⁺, melhoraram substancialmente os resultados para os pacientes em tratamento (HOWLADER, CRONIN, *et al.*, 2018); (EISENBERG e KOIFMAN, 2001).

Basal-like (RE⁻, RP⁻/HER2⁻): esses cânceres também são chamados de cânceres de mama triplo negativo (CMTN) porque são RE⁻, RP⁻ e HER2⁻ (CHEANG, MARTIN, *et al.*, 2015). Embora possuam uma incidência de 10.8%¹, têm um prognóstico pior do

¹ Estudo realizado por (HOWLADER, CRONIN, *et al.*, 2018) com a população feminina dos Estados Unidos diagnosticada com câncer de mama entre os anos 2010-2013.

que outros subtipos; um dos motivos é a evolução do tratamento baseado na presença de receptores hormonais, que possuem poucas opções diagnósticas e terapêuticas comparados com outros subtipos moleculares (HOWLADER, CRONIN, *et al.*, 2018); (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014); (EISENBERG e KOIFMAN, 2001).

1.1.4.2 Migração, invasão e metástase

A proliferação descontrolada e formação de tumores podem tomar dois caminhos: permanecer (tumores benignos) ou avançar (tumores malignos). Esse avanço de tumores para outros órgãos é denominado como metástase (TALMADGE e FIDLER, 2010); (FOSTER, PITRODA e WEICHSELBAUM, 2020).

O termo “metástase” foi originalmente denominado em 1829 por Jean Claude Recamier. Além de ser considerado uma marca registrada de um tumor maligno, é também o principal desafio clínico, pois é imprevisível no início e aumenta exponencialmente o impacto clínico do paciente (FOSTER, PITRODA e WEICHSELBAUM, 2020).

As teorias históricas das metástases foram informadas pela hipótese das “sementes” e do “solo”, o *paradigma Halsteadiano*, propondo uma disseminação ordenada dos locais de origem para os locais distantes e a presunção de que o câncer é um processo inerentemente sistêmico, mesmo nos primeiros casos (FOSTER, PITRODA e WEICHSELBAUM, 2020). Aqui, serão apresentadas abrangentemente etapas que se aplica ao processo de metástase de carcinomas (células de câncer originárias de tecido epitelial ou glandular), diferentemente para outros tipos de câncer como por exemplo o mieloma (plasmócitos que se multiplicam na medula óssea) (BLAND e COPELAND, 1994).

De acordo com Talmadge e Fidler (2010), a metástase geralmente ocorre nas seguintes etapas (Figura 6): 1) Transformação tumoral e crescimento progressivamente lento; 2) Angiogênese (vascularização tumoral, síntese e secreção de fatores de angiogênicos); 3) Migração e invasão tumoral para capilares e vasos linfáticos; 4) Destacamento e embolização de agregados de células tumorais que podem aumentar de tamanho por meio de interação com células hematopoiéticas na circulação; 5) Circulação desses êmbolos; tanto hematológico quanto linfático; 6) Sobrevivência de células tumorais trafegadas pela circulação; 7) Extravasamento do êmbolo tumoral por mecanismos de adesão, migração e invasão no tecido; 8) Proliferação das células tumorais metastáticas; 9) Estabelecimento da vascularização e defesas contra as respostas imunes

do hospedeiro; 10) Reiniciação desses processos para o desenvolvimento de novas metástases.

As etapas de migração e invasão metastática podem ser reguladas por um conjunto de várias etapas, denominado transição epitelial-mesenquimal (TEM) no qual permite que células epiteliais transformadas adquiram características mesenquimais, incluindo motilidade, invasividade e resistência à apoptose (YANG e WEINBERG, 2008).

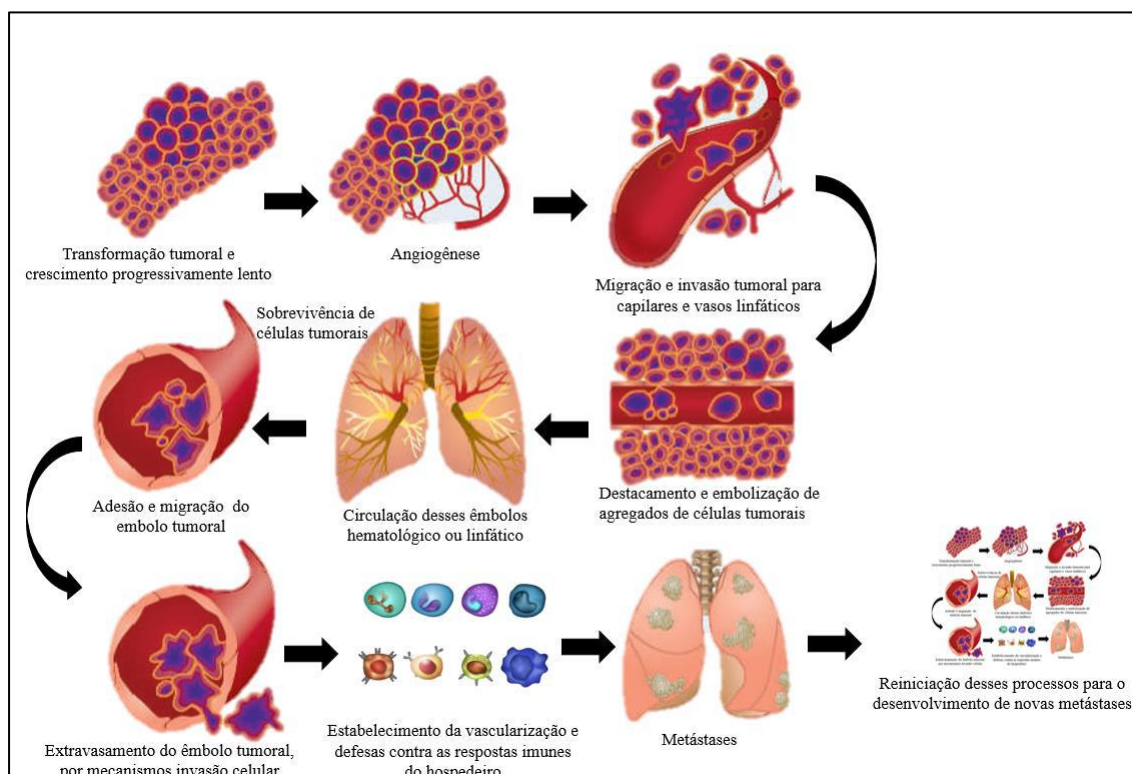


Figura 6: Processo sequencial de metástase do câncer. O resultado de cada etapa é influenciado pela interação de subpopulações celulares metastáticas com fatores homeostáticos. Cada etapa da cascata metastática é potencialmente limitante da taxa, de modo que a falha de uma célula tumoral em concluir qualquer etapa impede efetivamente essa parte do processo. Adaptada de: (TALMADGE e FIDLER, 2010).

A TEM é geralmente induzida nas células epiteliais por sinais heterotípicos, especificamente aqueles liberados pelas células mesenquimais que constituem o estroma dos tecidos normais e neoplásicos. Membros da família de citocinas do fator de crescimento transformador β (TGF β , do inglês *transforming growth factor* β) são os principais e os melhores indutores da TEM caracterizados que ocorrem durante o curso do desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, doenças fibróticas e patogênese do câncer. O TGF β pode induzir a TEM por meio de múltiplos mecanismos de sinalização distintos, incluindo a fosforilação direta por receptores ativados por ligantes dos fatores

de transcrição SMAD e por certas proteínas citoplasmáticas que regulam a polaridade celular (POLYAK e WEINBERG, 2009).

Numerosos receptores tirosina-cinases (rTKs, do inglês: *receptor Tyrosin Kinase's*) têm papéis cruciais em processos embrionários que envolvem TEM. Vários desses rTKs são mutados e constitutivamente ativos em diversos tipos de câncer, desencadeamento TEM, em que a expressão da E-caderina é perdida (PEINADO, OLMEDA e CANO, 2007). Geralmente na calda citoplasmática da E-caderina realiza-se a sequestração de β -catenina. Logo, a ausência de E-caderina resulta na liberação de β -catenina, que pode então migrar para o núcleo e induzir a expressão de fatores de transcrição indutores da TEM. Esse mecanismo de ativação constitutiva das rTKs e perda de E-caderina podem levar muitas células cancerígenas à estabilização do estado mesenquimal, tornando sua expressão independente da sinalização heterotípica e um estado mesenquimal contínuo (PEINADO, OLMEDA e CANO, 2007).

Os estudos moleculares e biológicos celulares subsequentes da TEM definiram três grandes alterações no fenótipo celular da TEM (POLYAK e WEINBERG, 2009):

1) *Alterações morfológicas*: modificação morfológica de células epiteliais do tipo paralelepípedo com uma polaridade apical-basal para células mesenquimais dispersas em forma de fuso com protrusões migratórias (POLYAK e WEINBERG, 2009).

2) *Mudanças de marcadores de diferenciação*: durante a TEM, as células epiteliais perdem marcadores epiteliais (E-caderina, ocludina, citoqueratinas, entre outros) e começam a expressar marcadores mesenquimais (vimentina, fibronectina, entre outros). Alguns estudos utilizam a expressão fatores de transcrição indutores da TEM - *Snail*, *Slug*, *Twist1*, *FOXC2* - como indicadores da TEM (Figura 7) (POLYAK e WEINBERG, 2009); (YANG e WEINBERG, 2008).

3) *Alterações funcionais*: conversão de células estacionárias (epiteliais) em células móveis (mesenquimais) que podem invadir através da matriz extracelular (MEC) (POLYAK e WEINBERG, 2009).

Vale ressaltar que nem todas as três alterações são invariavelmente observadas durante uma TEM; no entanto, a aquisição da capacidade de migrar e invadir a MEC como células únicas, é considerada uma marca funcional do programa de TEM (POLYAK e WEINBERG, 2009).

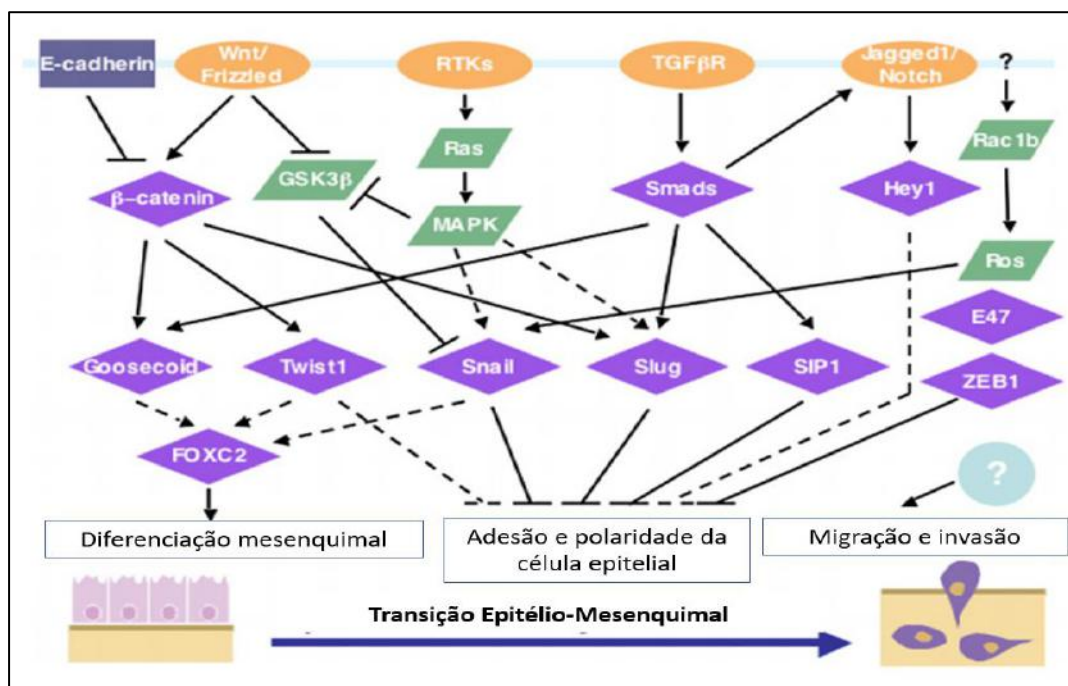


Figura 7: Vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidos na TEM. A rede de intercomunicação molecular das vias de sinalização conhecidas e fatores de transcrição que regulam o processo de transição epitelial-mesenquimal em carcinoma. Linhas sólidas indicam regulação direta de transcrição, linhas tracejadas indicam regulação indireta, seta indica ativação e traços horizontais indicam inibição. Figura extraída e traduzida de (YANG e WEINBERG, 2008).

Como demonstrado anteriormente, a TEM é um fator importante para o processo de migração celular. Subsequentemente, a mobilidade celular à MEC é requerida para o processo de invasão ao tecido adjacente intermediado pela ação de metaloproteínas da matriz extracelular (MMPs) para a função de degradação da MEC (STAMENKOVIC, 2000).

As MMPs constituem uma família de isoformas (MMPs 1-13) com atividade proteolítica relacionada geneticamente e cuja atividade é dependente de zinco. Diferem entre si estruturalmente por meio das habilidades delas em degradar um grupo particular de proteínas da MEC; sendo que, juntas, podem degradar todos os seus componentes proteicos (RIBEIRO, JUNIOR, *et al.*, 2008). Além de elas serem um ótimo marcador metastático para amostras de câncer de mama, tem sido demonstrada a participação das MMPs na regulação da expressão de diversos genes, possivelmente envolvidos na progressão do câncer de mama (HSIAO, LIU, *et al.*, 2018).

1.1.4.3 Metabolismo desregulado

As células cancerosas precisam utilizar energia para aderir e migrar efetivamente através da arquitetura complexa da matriz extracelular, geralmente por meio da hidrólise do ATP em ADP, para a polimerização de filamentos de actina, por exemplo (VAN-HORSSSEN, JANSSEN, *et al.*, 2009).

Os níveis de ATP são críticos para a saúde das células e funções celulares essenciais, pois a relação ATP:ADP serve como o principal regulador do metabolismo celular que impulsiona muitas reações celulares. A concentração de ATP não é mantida em abundância ou armazenada em células como outras biomoléculas, mas sua produção é aumentada para se adequar à demanda da atividade celular (ZANOTELLI, GOLDBLATT, *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado que matrizes de colágeno alinhadas, conhecidas por estimular a migração celular, promovem uma diminuição dos níveis de ATP intracelular ao mesmo tempo em que aumentam a absorção de glicose para metabolizar e abastecer suas necessidades energéticas (ZANOTELLI, GOLDBLATT, *et al.*, 2018); (VAN-HORSSSEN, JANSSEN, *et al.*, 2009).

Durante a proliferação, uma célula deve aumentar sua biomassa e replicar seu genoma antes de se dividir em duas células filhas. Não muito surpreendente, a fim de atender às crescentes exigências da proliferação ou dos processos metastáticos, as células tumorais geralmente precisam do metabolismo energético e da captação de nutrientes (AMOEDO, EL-BACHA, *et al.*, 2011); (AMOEDO, EL-BACHA, *et al.*, 2014); (JONES e THOMPSON, 2009). Um dos primeiros estudos a respeito do metabolismo energético tumoral foi proposto por Otto Warburg, na década de 1920, no qual observou que as células tumorais usam preferencialmente a glicólise em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial, mais lenta e possivelmente danificada (WARBURG, WIND e NEGELEIN, 1927), mesmo na presença de oxigênio suficiente para alimentar a respiração mitocondrial. Esse fenômeno ficou conhecido como "efeito Warburg" (WARBURG, 1956).

Atualmente, esse princípio é explorado em contextos clínicos pelo uso da tomografia por emissão de pósitrons ^{18}F -desoxiglicose (FDG-PET) para tumores de imagem com aumento da captação de glicose. A captação aprimorada de glicose visualizada pelo FDG-PET correlaciona-se com o mau prognóstico e o maior potencial metabólico em muitos tipos de tumores (KROEMER e POUYSSEGUR, 2008).

A revolução na Biologia Molecular nos últimos 40 anos levou ao paradigma de que lesões genéticas por superativação de oncogenes ou perda de função de supressores de tumores impulsionam a progressão do câncer (MORENO-SÁNCHEZ, RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, *et al.*, 2007). A expressão de genes que codificam proteínas envolvidas nesta via (ou outras relacionadas indiretamente), como os transportadores de glicose que aumentam a absorção de glicose ou de intermediários da via glicolítica como hexocinase, 6-fosfofruto-1-cinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, piruvato-cinase e outras enzimas, é geralmente regulada por oncogenes, incluindo c-myc, fator indutor de hipóxia 1 α (HIF1 α) e supressor tumoral TP53 (MORENO-SÁNCHEZ, RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, *et al.*, 2007).

No entanto, há um considerável corpo de evidências que desafia o paradigma da célula cancerosa puramente "glicolítica". Foi demonstrado que algumas linhagens celulares de glioma, hepatocarcinoma e câncer de mama possuem mitocôndrias funcionais e que obtêm ATP principalmente a partir da fosforilação oxidativa (DIAZ-RUIZ, RIGOULET e DEVIN, 2011).

Algumas células cancerígenas, apesar de possuírem mitocôndrias funcionais, podem alternar entre metabolismo glicolítico e oxidativo de maneira reversível, chamado de *Efeito Crabtree* (DIAZ-RUIZ, RIGOULET e DEVIN, 2011). O mecanismo pelo qual o *Efeito Crabtree* é acionado é pouco descrito. Mas ao comparar com o *Efeito Pasteur* (metabolismo glicolítico em anaerobiose), a limitação da respiração no *Efeito Crabtree* não se deve à disponibilidade de oxigênio, mas a uma cascata de sinalização repressiva aguda desencadeada por glicose sobre a função mitocondrial. Por esse motivo, às vezes o *efeito Crabtree* também é chamado de *Efeito Pasteur reverso (ou invertido)* (DE OLIVEIRA, AMOÊDO e RUMJANEK, 2012); (DIAZ-RUIZ, RIGOULET e DEVIN, 2011).

Além disso, as mitocôndrias parecem ter um papel ativo, principalmente na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) como sinal ativador para o desenvolvimento metastático das células cancerígenas. Ou seja, células metastáticas induzem uma parcial ativação do metabolismo oxidativo para gerar ATP e EROs, sustentando a alta demanda energética e sinalizatória metastática que aparentemente foi adormecida nos processos iniciais tumorigênicos. Portanto, esse fenômeno é denominado como "*Efeito Warburg reverso*" (SOTGIA, WHITAKER-MENEZES, *et al.*, 2012).

1.1.5 Estresse oxidativo: uma relação sobre as características do câncer de mama

As EROs são constantemente geradas no corpo humano, principalmente durante o metabolismo celular aeróbico (KIM, KIM e BAE, 2016). É conhecido que células cancerígenas mostram níveis persistentemente altos das EROs devido à transformação oncogênica, incluindo alteração no microambiente genético, metabólico e tumoral (KIM, KIM e BAE, 2016).

1.1.5.1 Homeostase redox e estresse oxidativo

A produção das EROs é obtida através de reações catalisadas por enzimas como NADPH oxidases (NOX), xantina oxidase, óxido nítrico sintetase endotelial (NOSe), ácido araquidônico e outras enzimas, como as enzimas do citocromo P450, lipoxigenase e ciclooxigenase, que, de modo geral, produzem superóxido ($O_2^{\cdot-}$); enquanto que a cadeia respiratória mitocondrial é uma fonte não enzimática genuína das EROs (HECHT, PESSOA, *et al.*, 2016).

De modo geral, a baixa concentração das EROs atua como mitógeno e promove a proliferação e sobrevivência celular; enquanto a concentração intermediária leva a uma interrupção transitória ou permanente do ciclo celular e induz à diferenciação celular (DEL RIO, 1992). Em alta concentração, elas produzem danos oxidativos, especialmente no DNA, causando mutações que eventualmente levam ao câncer (DEL RIO, 1992); (BARRERA, 2012).

Portanto, é preciso que os níveis das EROs sejam mantidos bem equilibrados, promovendo a proliferação e diferenciação tumoral sem causar danos oxidativos. Esse equilíbrio é mantido por meio de defesas antioxidantes endógenas. O sistema de defesa antioxidante compreende enzimas e moléculas antioxidantes (não enzimáticas) (GURER-ORHAN, INCE, *et al.*, 2018). As enzimas antioxidantes mais conhecidas são a superóxido dismutase (SOD: catalisa $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) que podem remover o H_2O_2 por catálise em H_2O (Figura 8) (HECHT, PESSOA, *et al.*, 2016).

Vários tipos de antioxidantes químicos desempenham papéis importantes na homeostase das EROs, incluindo antioxidantes naturais da dieta como o β -caroteno (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), moléculas antioxidantes endógenas como glutathione, ferritina, ácido úrico, bilirrubina e antioxidantes sintéticos, utilizados em ensaios experimentais como N-acetilcisteína (NAC) (GURER-ORHAN, INCE, *et al.*, 2018).

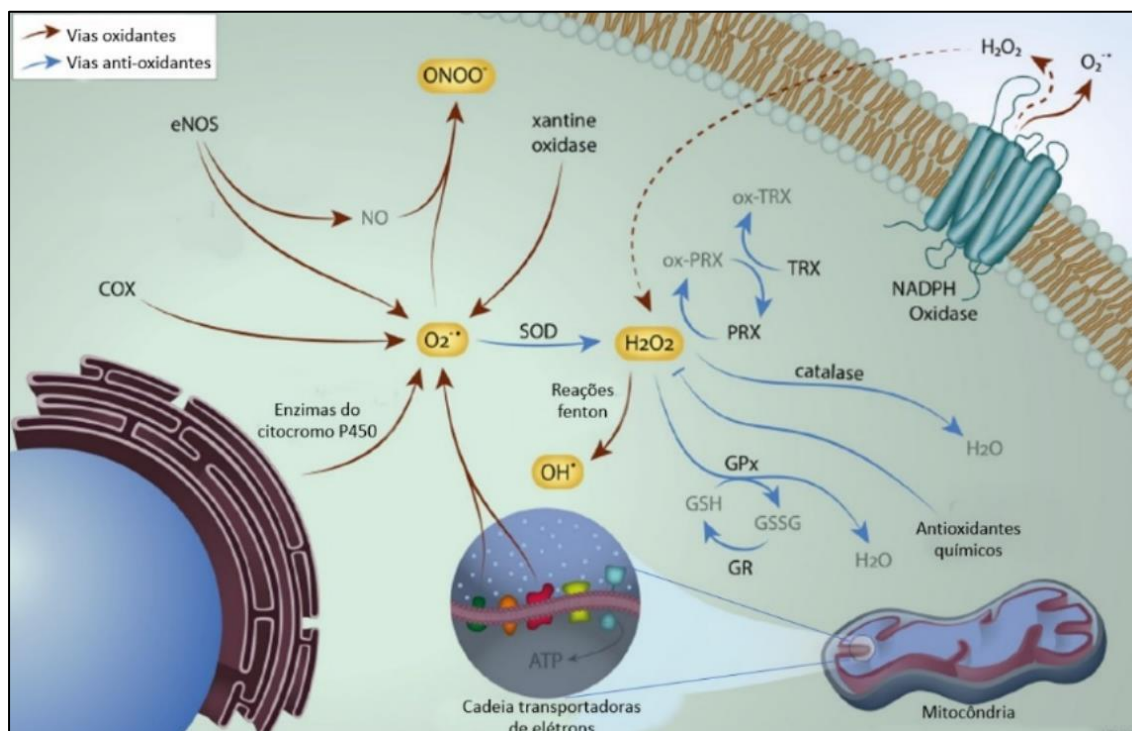


Figura 8: Homeostase redox - mecanismos de geração e eliminação das EROs. As células eucarióticas produzem constantemente EROs por reações enzimáticas e não enzimáticas. As principais enzimas responsáveis pela geração das EROs, as NADPH oxidases (NOX), estão localizadas em membranas. Os organismos vivos possuem enzimas antioxidantes endógenas e moléculas antioxidantes naturais (eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, COX: ciclooxigenase, SOD: superóxido dismutase, GPx: glutathione peroxidase, TRX: tioredoxina redutase, PRX: peroxiredoxina, $O_2^{\cdot-}$: radical superóxido, H_2O_2 peróxido de hidrogênio, OH^{\cdot} : radical hidroxila e ONOO: peroxinitrito). Imagem traduzida de (HECHT, PESSOA, *et al.*, 2016).

Quando as EROs são geradas em excesso e os sistemas de defesa antioxidante são inadequados para eliminá-las, ocorre um processo chamado *estresse oxidativo*. Durante o processo de carcinogênese, esse estresse ocorre por mutações nos genes e por hipóxia. Ambos regulam a expressão de proteínas relacionadas a homeostase das EROs; por exemplo, mutações oncogênicas em Ras podem promover um aumento da expressão da isoforma NOX4, levando a um aumento da produção de H_2O_2 (BREWER, GARCIA, *et al.*, 2015); (NOURAZARIAN, KANGARI e SALMANINEJAD, 2014).

1.1.5.2 NADPH oxidase em câncer de mama

Particularmente a respeito das NOXs, a família NADPH oxidases é constituída por sete isoformas: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2. Elas são proteínas que transferem elétrons através das membranas biológicas, o aceptor de elétrons é o oxigênio e geralmente o produto da reação de transferência de elétrons é o superóxido (BEDARD e KRAUSE, 2007).

Existem propriedades estruturais conservadas das enzimas NOX que são comuns a todos os membros da família (Figura 9). A partir do COOH terminal, esses recursos estruturais conservados incluem 1) um local de ligação ao NADPH no próprio terminal do COOH; 2) uma região de ligação a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) na proximidade do domínio transmembranar; 3) seis domínios transmembranas conservados; e 4) quatro histidinas de ligação a heme altamente conservadas. Portanto, as enzimas NOX's são transportadoras de elétrons, passando elétrons do NADPH para a FAD, para o primeiro e segundo heme e; finalmente, para oxigênio, produzindo assim O_2^- , exceto a NOX4 que produz H_2O_2 em vez de O_2^- (BEDARD e KRAUSE, 2007).

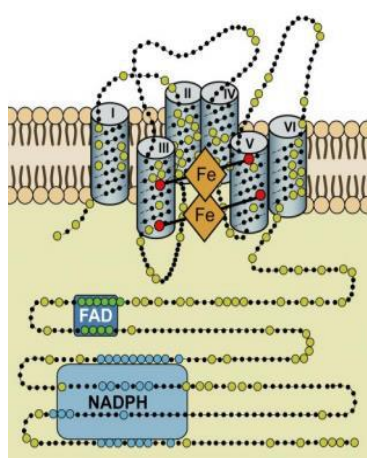


Figura 9: Estrutura proposta da região central das NOXs. Todos os membros da família NOX compartilham seis domínios transmembranares altamente conservados. Os domínios transmembranares III e V contêm, cada um, duas histidinas, abrangendo dois hemes assimétricos. O terminal citoplasmático de COOH contém domínios de ligação conservados de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e NADPH. As enzimas NOX são transportadoras de elétrons, passando elétrons do NADPH para o FAD, para o primeiro heme, para o segundo heme e, finalmente, para o oxigênio (BEDARD e KRAUSE, 2007).

Ao contrário das outras isoformas, a NOX4 não requer subunidades citosólicas para sua atividade, e é ativada sem a necessidade de estimulação celular para produzir H_2O_2 (COSENTINO-GOMES, ROCCO-MACHADO e MEYER-FERNANDES, 2012); (BEDARD e KRAUSE, 2007). No entanto, nem todos os dados disponíveis favorecem esse conceito (BEDARD e KRAUSE, 2007), no qual foi demonstrado que a NOX4 é ativada por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, do inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*), um ativador *in vitro* da proteína cinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) (KURODA, NAKAGAWA, *et al.*, 2005). Um outro estudo mostra a complexação da subunidade p47^{phox} na NOX4, indicando que a PKC fosforila na sequência C-terminal da subunidade p47^{phox} nos resíduos de serina, tornando a NOX4 mais funcional (ZHANG, WANG, *et al.*, 2016).

Em células epiteliais de mama (MCF10-A), foi demonstrada uma moderada expressão da NOX4, DUOX1 e DUOX2. Já na linhagem MDA-MB-231, uma moderada expressão de NOX2, NOX3, um pouco maior de NOX5 e uma elevada expressão de NOX 4 (BOUDREAU, CASTERLINE, *et al.*, 2012). Mas só a NOX4 apresentou um estímulo da expressão na presença do TGF β . Uma possível explicação é que a expressão da NOX4 nessas linhagens seria regulada pelo receptor TGF β , no qual a expressão de fibronectina (fenótipo de TEM) dependeria da expressão da NOX4 (BOUDREAU, CASTERLINE, *et al.*, 2012). Ou seja, células com um fenótipo mais mesenquimal, como a linhagem MDA-MB-231, possuem uma maior quantidade do receptor de TGF β ; consequentemente, uma maior expressão de NOX4 para TEM e assim para migração celular (BOUDREAU, CASTERLINE, *et al.*, 2012).

1.1.5.3 Produção de ERO mitocondrial

Durante o processo de respiração celular, os elétrons são transportados através de uma série de complexos mitocondriais para o aceptor de elétrons terminal, o oxigênio (O_2) (HA, WILLIAMS e CADENAS, 2001). Durante o metabolismo celular, ocasionalmente os elétrons vazam da cadeia transportadora de elétrons (CTE) dos complexos mitocondriais I, II e III que reagem com O_2 para produzir radicais $O_2^{\cdot-}$ na matriz ou no espaço intermembranar, especificamente pelo complexo III (Figura 10) (TURRENS, 2003); (HA, WILLIAMS e CADENAS, 2001); (HECHT, PESSOA, *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a taxa de vazamento de elétrons e a formação de EROs são influenciadas por diversos fatores, dentre eles, aumento da taxa de respiração (SENDENSKY e MORGAN, 2006) ou desregulação da força próton-motiva mitocondrial.

O poro da transição da permeabilidade mitocondrial da membrana externa permite a passagem de radicais $O_2^{\cdot-}$ para o citoplasma, em que é dismutado para peróxido de hidrogênio (um mensageiro secundário altamente difusível) pela superóxido dismutase que pode ocorrer no citosol (Cu/ZnSOD ou SOD1) ou na matriz mitocondrial (MnSOD ou SOD2) (HA, WILLIAMS e CADENAS, 2001).

A força próton-motiva mitocondrial (Δp) é regulada por dois componentes: 1) O potencial da membrana interna mitocondrial ($\Delta\Psi$, ou a diferença no potencial elétrico através da membrana interna), e 2) ΔpH , a diferença nas concentrações de prótons na membrana interna ($\Delta pH = pH_{dentro} - pH_{fora}$). Nas mitocôndrias, o ΔpH é o menor componente da Δp , devido à abundância de ácidos fracos permeáveis à membrana que atuam como tampões (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004).

Vale ressaltar que a força próton-motiva mitocondrial não é só um fator importante para criar um gradiente de próton para a ATP sintase, é o regulador da diferença de cargas entre as superfícies das membranas intermembranar, importante para direcionar a taxa de transporte de elétrons na CTE (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004).

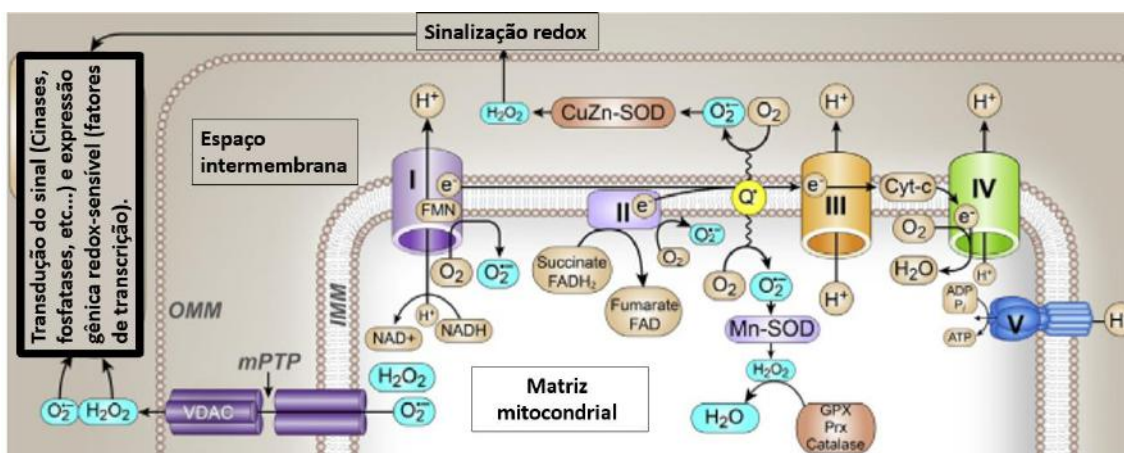


Figura 10: Principais pontos de geração das EROs na cadeia transportadora de elétrons. As cadeias de transporte de elétrons mitocondriais podem formar superóxido e peróxido de hidrogênio que podem atuar como moléculas de sinalização, transduzindo sinais redox de processos metabólicos para o núcleo. OMM, membrana mitocondrial externa; IMM, membrana mitocondrial interna; VDAC, canal aniónico dependente de voltagem; Ref-1, fator redox 1; FMN, mononucleotídeo de flavina; mPTP, poro de transição de permeabilidade mitocondrial; MnSOD, superóxido dismutase de manganês; CuZnSOD, superóxido dismutase de cobre / zinco; CytC, citocromo C (ZHOU, SHAO e SPIT, 2014).

Presumivelmente, quando o Δp é baixo, ocorre o vazamento de elétrons e promove a geração das EROs (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004). Logo, existe uma expressão matemática que explica esse fenômeno na Equação 1:

$$\Delta p = \Delta \Psi - (2,3RT.F^{-1})\Delta pH$$

Equação 1

Compreende-se que R é a constante de gás, F é a constante de Faraday e T é a temperatura absoluta, bem como é possível observar que Δp é inversamente proporcional do $\Delta \Psi$ (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004).

Atualmente, é amplamente aceito que as mitocôndrias produzem mais EROs em resposta ao alto potencial de membrana. Foi proposto por Selianov, Zeak e outros colaboradores (2008) que embora a permeabilidade dos tampões mitocondriais diminua a contribuição do ΔpH para o Δp , o ΔpH experimental exerce uma grande influência no $\Delta \Psi$. O gradiente de prótons entre o espaço intermembranar/matriz mantém uma

contribuição para a manutenção elétrica da membrana mitocondrial. Mesmo que rápido, qualquer mecanismo, que em grande proporção diminua o ΔpH , exerce uma significativa contribuição para a hiperpolarização do potencial da membrana mitocondrial de forma rápida e reversível (SELIANOV, ZEAK, *et al.*, 2008). Dessa forma, a hiperpolarização permite que os elétrons vazem da CTE para a molécula de oxigênio, formando EROs (SELIANOV, ZEAK, *et al.*, 2008).

Muitas funções das mitocôndrias estão intimamente ligadas à sua morfologia, e há uma tênue estabilização entre os eventos de fusão e fissão. A dinâmica mitocondrial é o resultado de um delicado equilíbrio entre a fusão mitocondrial (caracterizada pela presença de cristas mitocondrial tubuladas, longas e interconectadas) e a fissão (caracterizada por pequenas mitocôndrias fragmentadas) (MAYCOTTE, MARÍN-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2017). Em células de câncer, esse equilíbrio é deslocado principalmente para a fissão por fatores tumorigênicos que atuam na expressão de genes mitocondriais responsáveis pela manutenção mitocondrial. Desse modo, promove-se, portanto, uma fragmentação parcial ou total, de forma a impactar negativamente na transferência de elétrons na CTE, fosforilação oxidativa, permitindo com mais facilidade o vazamento das EROs (MAYCOTTE, MARÍN-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2017) ; (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019).

Recentemente foi demonstrada por Sarmiento-Salinas, Delgado-Magallón e outros colaboradores (2019) a influência da produção das EROs para tumorigênese por meio de um comparativo entre célula não tumoral (MCF10-A) e células de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (Figura 11) (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019).

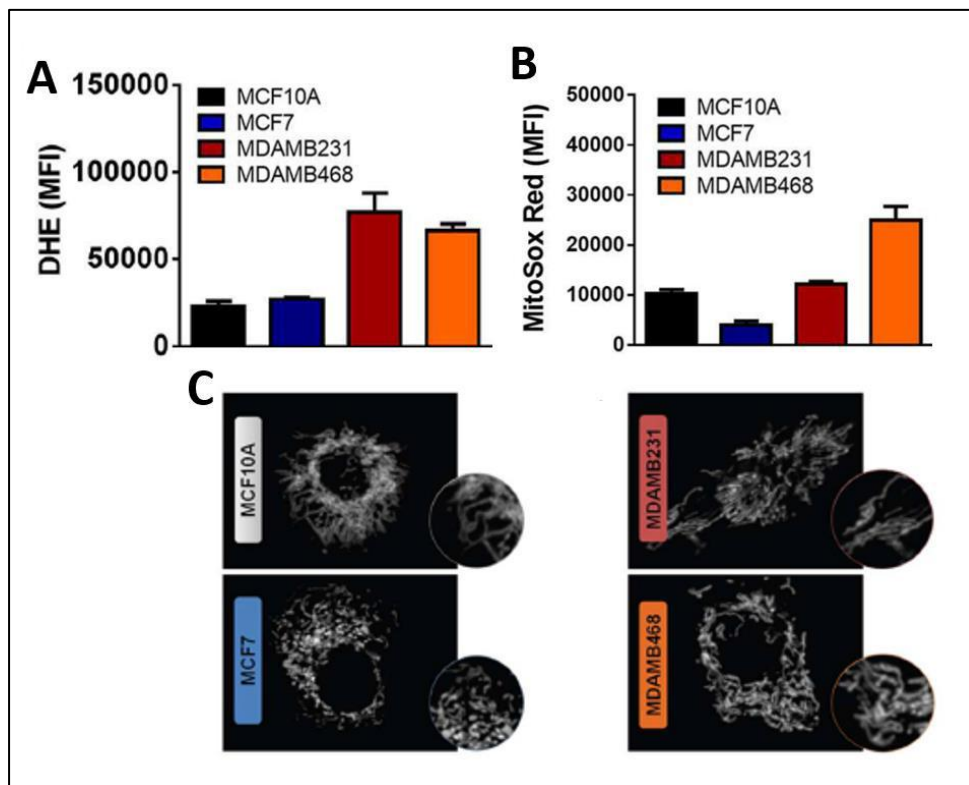


Figura 11: Os subtipos moleculares de câncer de mama apresentam uma produção diferencial das EROs). A) Os níveis das EROs foram avaliados quantitativamente por citometria de fluxo nas diferentes linhagens celulares. B) Produção das EROs mitocondrial quantificado por MitoSox em citometria de fluxo. C) Imagens representativas da morfologia mitocondrial característica por subtipo de células de câncer de mama. Figuras experimentais retiradas de (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019).

A produção de EROs total foi maior na linhagem MDA-MB-231 e MDA-MB-468 comparado com a MCF-7 e MCF10-A (Figura 11 A). No entanto, a produção de EROs mitocondrial apenas foi elevada na linhagem MDA-MB-468 (Figura 11 B). Os autores argumentam que na MDA-MB-468 existe uma fragmentação completa das mitocôndrias, o que seria responsável pelo elevado nível de EROs total. Enquanto na linhagem MDA-MB-231 e MCF-7 existe uma morfologia tubular com uma parcial fragmentação e uma morfologia tubular completa na MCF10-A (Figura 11 C) (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019). Especificamente no caso da MDA-MB-231, os autores acreditam, embora não demonstrado experimentalmente, que uma outra fonte produtora de EROs além da mitocondrial estaria contribuindo para a produção das EROs total para sustentar a sinalização oncogênica (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019).

1.1.5.4 Tumorigênese mediada por EROs

As células cancerígenas que apresentam um estresse oxidativo metabólico persistente em comparação com as células normais, geralmente compreendem uma mistura de lesões de DNA e ativação de oncogenes, de modo a promover um aumento da indução da proliferação tumoral (GURER-ORHAN, INCE, *et al.*, 2018).

Estrógenos naturais, como o estrogênio, podem induzir danos ao DNA e aberrações cromossômicas *in vitro* e *in vivo* em vários tecidos como a mama (ROY e LIEHR, 1999). É provável que alterações no genoma das células mamárias sejam produzidas pelo ataque oxidativo de EROs em conjunto com o receptor de estrogênio (LI *et al.*, 2013). O H₂O₂ também oxida reversivelmente os grupos cisteína tiol de fosfatases, como fosfatase homólogo à tensina (PTEN), proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) e proteína fosfatase 2, as quais causam perda de atividade e conseqüentemente promovem a ativação da via de proliferação PI3K/Akt /mTOR (D'AUTREAUX e TOLEDANO, 2007).

1.1.5.5 Migração, invasão e metástase mediada por EROs

Como demonstrado anteriormente, o aumento da expressão de MMPs é preditivo de agressividade tumoral, metástase e baixa sobrevida do paciente. Recentemente, as MMPs têm sido consideradas um fator importante no desencadeamento da transição epitelial-mesenquimal (FAN, HSU, *et al.*, 2019).

A expressão de MMPs-2, 3, 9 induziu uma clivagem de E-caderina, no qual resulta na perda de aderências célula-célula e na realocação de β -catenina transcricionalmente ativa no núcleo, por uma via de sinalização que promove um aumento da motilidade e a invasividade tumoral (RADISKY, LEVY, *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que níveis elevados de H₂O₂ gerados por células metastáticas de adenocarcinoma mamário promovem uma regulação dos marcadores de TEM, em que o H₂O₂ diminui a marcação de E-caderina, aumenta a marcação de fibronectina e vimetina (CICHON e RADISKY, 2014); (LEE, JU, *et al.*, 2019). No entanto, o mecanismo de ativação ou via de sinalização promovido pelo H₂O₂ ainda permanece pouco esclarecido (RADISKY, LEVY, *et al.*, 2005); (FAN, HSU, *et al.*, 2019).

1.1.6 Linhagens celulares do câncer de mama

Seja no desenvolvimento de novas terapias ou no estabelecimento do conhecimento sobre biologia do câncer de mama, a utilização das linhagens celulares *in vitro* têm mostrado um papel crucial antes mesmo de utilizar os modelos *in vivo* (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011). A primeira linhagem celular para ensaios *in vitro* foi

estabelecida por George Gey, em 1952, ao utilizar células de carcinoma cervical da paciente Henrietta Lacks, cuja linhagem é conhecida como HeLa (GEY, COFFMAN e KUBICEK, 1952). Seis anos depois, a linhagem de câncer de mama BT-20 foi estabelecida (LASFARGUES e OZZELLO, 1958). Somente na década de 70, as linhagens celulares começaram a ser efetivamente estabelecidas e cultivadas em diversos tipos celulares (DAI, CHENG, *et al.*, 2017).

A nomenclatura das linhagens celulares, em geral, não reflete sua associação fenotípica, mas sim como são estabelecidas, seja em relação ao laboratório, ao mesmo paciente ou ao isolamento por subcultura em série. Por exemplo, as linhagens celulares da “série MDA” foram estabelecidas no *M. D. Anderson Hospital e no Tumor Institute*, a partir dos pacientes diagnosticados como portadores de carcinoma mamário infiltrante e intra-ductal (DAI, CHENG, *et al.*, 2017). Já a “série MCF” foi estabelecida em 1973 no *Michigan Cancer Foundation* (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011) (Tabela 1). No entanto, nem todas as células seguem esse padrão de séries, pois na década de 70 não tinha um padrão de nomenclatura (DAI, CHENG, *et al.*, 2017).

Tabela 1: Classificação molecular das linhagens celulares de câncer de mama

Subtipo molecular	Marcadores hormonais	Linhagens celulares	Morfologia
Não tumoral	ER, PR, HER2 basal	MCF10-F, MCF10-A	Epitelial.
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2-	MCF-7, T47D	Mais diferenciado; junções célula-célula justas.
Luminal B	ER+, PR+/-, HER2+	BT474, ZR-75	Mais diferenciado; junções célula-célula justas.
HER2 enriquecido	ER-, PR-, HER2+	SKBR3, MDA-MB-453	Quebra de junções célula-célula.
Triplo-negativo	ER-, PR-, HER2-	MDA-MB-231, MDA-MB-468	Aparência mais mesenquimal e altamente invasiva.

Tabela adaptada de (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011), com informações adicionadas sobre morfologia de (DAI, CHENG, *et al.*, 2017).

Até o final da década de 70, o reconhecimento da heterogeneidade das células do câncer de mama era realizado através de observações microscópicas e citopatológicas da morfologia da célula (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares como o microarranjo de DNA, por exemplo, permitiu-se a classificação molecular do câncer de mama; nesse processo, inclui-se as linhagens celulares *in vitro* (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011) (Tabela 1).

Portanto, as linhagens celulares foram excessivamente utilizadas em trabalhos científicos sobre câncer de mama, dentre elas estão a MCF10-A (uma linhagem não tumoral, mas imortalizada), MCF-7 e T47-D (Luminal), MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (Triplo-negativo), utilizadas principalmente em trabalhos sobre microambiente tumoral, modelos de xenoenxertos (inserção de células tumorais *in vitro* em camundongos para indução de tumores), resposta e sensibilidade à drogas e identificação de novos alvos terapêuticos (DAI, CHENG, *et al.*, 2017).

Embora os distintos subtipos de câncer de mama *in vitro* sejam importantes para associação de um determinado efeito tumoral por diferenças moleculares, outras características como diferenças morfológicas ou capacidades metastáticas são utilizadas como base para a construção de um modelo experimental (NEVE, CHIN, *et al.*, 2006). De modo geral, as células triplo-negativa tendem a apresentar uma morfologia de transição epitélio-mesenquimal e uma maior capacidade invasiva comparada com às linhagens luminais (NEVE, CHIN, *et al.*, 2006)(Figura 12).

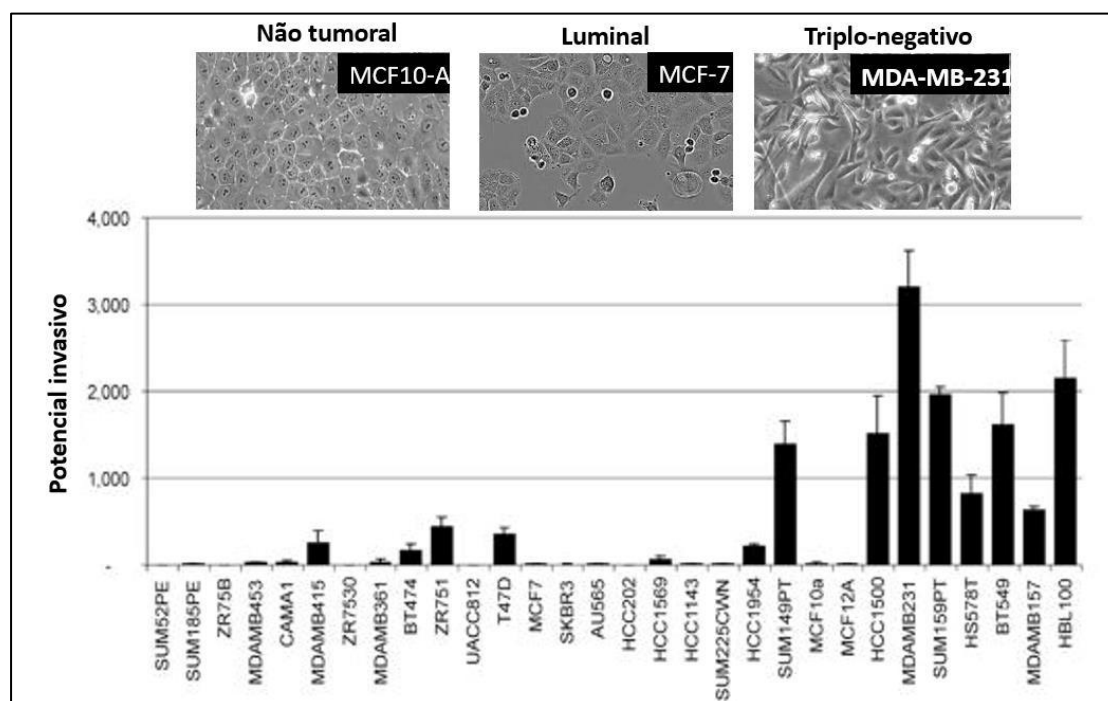


Figura 12: Relação morfológica e potenciais invasivos de diferentes linhagens de mama. A) Imagens microscópicas em campo claro com aumento de 400X da cultura de células: MCF10-A (não tumoral), MCF-7 (luminal) e MDA-MB-231 (triplo-negativo). B) Potencial invasivo realizado pelo método de Boyden em diferentes linhagens celulares epiteliais de mama (MCF10-A e MCF12-A) e de câncer de mama. Imagem retirada, adaptada e traduzida de (NEVE, CHIN, *et al.*, 2006).

A grande utilização de linhagens celulares *in vitro* pelos grupos de pesquisas ocorre devido à grande facilidade de manusear. Elas representam uma fonte ilimitada de autorreplicação com alta de homogeneidade, embora ainda são vistas como modelos brutos de tumores, pois não conseguiram capturar todas as características e

heterogeneidade do tumor (BURDALL, HANBY, *et al.*, 2003); (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011); (DAI, CHENG, *et al.*, 2017)). Além disso, as linhagens celulares *in vitro* possuem uma maior probabilidade de acumular aberrações genômicas durante o cultivo com um grande número de passagens. Portanto, a genotipagem periódica, estoque de células congeladas e controle do número de passagens é sempre necessária (BURDALL, HANBY, *et al.*, 2003).

1.1.7 Diagnóstico, estadiamento e tratamento

O entendimento da biologia molecular do câncer de mama tem impactado profundamente na conduta clínica oncológica, no entanto métodos tradicionais ainda são recomendados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) e amplamente aplicados pela comunidade médica no rastreamento (exames clínicos e de imagem em mulheres assintomáticas), diagnóstico e tratamento (INCA, 2015).

1.1.7.1 Rastreamento

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o rastreamento do câncer é aplicação em um teste ou exame numa população assintomática, aparentemente saudável, com o objetivo de identificar lesões sugestivas de câncer e encaminhá-las para investigação e tratamento (WHO, 2020). A mamografia (imagens radiográficas de espécimes de mastectomia), dentre os métodos de diagnóstico por imagem, é o mais utilizado para o *screening* e diagnóstico do câncer de mama em mulheres sem sinais e sintomas de câncer de mama; recomendada na faixa etária de 50 a 69 anos, a cada dois anos. A mamografia permite identificar melhor as lesões mamárias em mulheres após a menopausa. Antes desse período, as mamas são mais densas e a sensibilidade da mamografia é reduzida (INCA, 2015).

1.1.7.2 Diagnóstico

Para detecção do câncer de mama, o exame clínico, apesar de não ser unicamente recomendado, é uma metodologia importante na identificação dos principais sintomas e sinais, tais como tumoração não dolorosa de limites irregulares, descarga papilar sanguinolenta, edema na pele da mama (“casca de laranja”), retração da papila mamária, prurido na papila mamária, erosão da papila mamária e linfonodos axilares aumentados de tamanho (VIEIRA, 2012). Em casos suspeitos, os exames de imagens tais como mamografia, mamografia digitalizada ou ultrassonografia são utilizados para melhor auxiliar no diagnóstico (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014).

Com base nos resultados desses testes, o médico pode ou não solicitar uma biópsia para obter uma amostra das células ou tecido mamário. As biópsias são realizadas usando cirurgia (biópsia excisional) ou uma agulha (biópsia central) e depois são enviadas para um patologista que confirma ou não a presença do câncer (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014). Testes de laboratório, como testes de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e receptores de HER2, são metodologias importantes para a classificação molecular do câncer de mama e para um melhor direcionamento no tratamento (LANG, WECSLER, *et al.*, 2015).

1.1.7.3 Tratamento

O tratamento para o câncer de mama deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar, com vistas ao tratamento integral da paciente. As decisões terapêuticas são baseadas no tamanho do tumor, o tipo e os níveis dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (VIEIRA, 2012). Os tratamentos para câncer de mama utilizados são locais ou sistêmicos (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014).

Tratamentos locais como cirurgia e terapia de radiação são usados para remover, eliminar ou controlar as células cancerígenas em uma área específica. Na maioria dos casos, a cirurgia é o primeiro curso de ação. Após a cirurgia, usualmente utiliza-se a terapia de radiação, com a aplicação de feixes de alta energia em partículas para matar células cancerosas (MAUGHAN, 2010).

Os tratamentos sistêmicos são usados para destruir ou controlar células cancerígenas em todo o corpo, como a quimioterapia, terapia hormonal e terapia dirigida Tabela 2 (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014).

Tabela 2: Tipos de tratamento do câncer de mama.

<u>Tipo de tratamento</u>	<u>Classes de terápicas</u>	<u>Exemplos</u>
<u>Quimioterápicos</u>	Antraciclina	Doxorrubicina Epirubicina
	Taxanos	Paclitaxel Docetaxel Docetaxel
	Bloqueadores dos receptores de estrogênio	Tamoxifeno Toremifeno
<u>Terapia hormonal</u>	Agonista do hormônio liberador de gonadotropina	Oserelina Leuprolide
<u>Terapia dirigida</u>		Trastuzumabe Adotrastuzumabe emtansina Pertuzumabe

Tabela adaptada de (MAUGHAN, 2010).

Os quimioterápicos mais comuns usados para o câncer de mama incluem as antraciclina e taxanos que controlam a progressão acelerada do ciclo celular

(MAUGHAN, 2010). Na terapia hormonal, incluem-se os bloqueadores dos receptores de estrogênio e os inibidores aromatases que bloqueiam a enzima produtora de estrogênio no tecido adiposo e agonista do hormônio liberador de gonadotropina e interrompem a produção de estrogênio pelos ovários nas mulheres em estágio de pré-menopausa Tabela 2 (MAUGHAN, 2010).

Na terapia dirigida, o trastuzumabe é um tipo de medicamento conhecido como anticorpo monoclonal que se liga ao HER2 e pode ajudar a retardar o crescimento de células do subtipo enriquecida com HER2. Alternativamente, utiliza-se o adotrastuzumabe emtansina e o pertuzumabe (Tabela 2) (GIRISH, VIJAYALAKSHMI, *et al.*, 2014).

Os tratamentos sistêmicos, descritos anteriormente, são geralmente mais eficazes para cânceres do subtipo molecular luminal A, B e enriquecido de HER2. No caso do subtipo molecular CMTN, o tratamento precisa ser diferenciado. Medicamentos quimioterápicos à base de platina como carboplatina e cisplatina mostraram uma eficácia para esse subtipo (NCCN, 2019); (SILVER, RICHARDSON, *et al.*, 2010). Além disso, a terapia dirigida (imunoterapia) tem sido recentemente direcionada para CMTN como o Otezolizumabe positivo para PD-L1 (marcador de célula com capacidade de evasividade imune) (SCHMID, ADAMS, *et al.*, 2018).

Tem sido mostrado que em algumas subpopulações do CMTN há níveis mais elevados de uma proteína Trop-2, envolvida em distintas vias de sinalização intracelular relacionada a cálcio e β -catenina (SHVARTSUR e BONAVIDA, 2015), do que em outros cânceres de mama. A utilização de um conjugado anticorpo-droga como Trop-2 sacituzumabe govitecan-hziy mostrou-se eficaz no tratamento do CMTN (BARDIA, MAYER, *et al.*, 2019). Apesar dessas terapias serem eficazes ao CMTN em algumas subpopulações desse subtipo, estudos precisam ser intensificados para abrangerem mais amplamente o espectro de sensibilidade do subtipo triplo-negativo (NCCN, 2019).

1.1.8 O papel adjuvante do resveratrol no tratamento do câncer de mama

Desde os tempos antigos, os produtos químicos naturais derivados de plantas (fitoquímicos) têm sido usados para prevenir várias doenças crônicas, incluindo o câncer. O interesse renovado em fitoquímicos obtidos de fontes de plantas dietéticas ou medicinais forneceu uma fonte alternativa de compostos bioativos que podem ser usados como agentes preventivos ou terapêuticos contra uma variedade de doenças. Fitoquímicos como os polifenóis com múltiplas hidroxilas ligadas ao anel aromático foram associados como modulador de múltiplas vias de sinalização celular, com baixa toxicidade para

células normais. Dessa forma, eles se tornaram uma ótima alternativa para prevenir ou retardar o desenvolvimento da carcinogênese (SHANMUGAMA, LEEB, *et al.*, 2016).

Dentre a classe de polifenóis, o resveratrol (3,4,5-trihidroxi-trans-estilbeno) está ganhando destaque por meio de seu efeito em uma infinidade de alvos moleculares (SINHA, SARKAR, *et al.*, 2016). As fontes primárias de resveratrol são encontradas em uvas (*Vitis vinifera*), frutas vermelhas, amendoim e numa planta medicinal japonesa conhecida como *Polygonum cuspidatum* Siebold e Zucc (SINHA, SARKAR, *et al.*, 2016).

A estrutura do resveratrol compreende dois anéis fenólicos conectados por uma ligação dupla de estireno para produzir 3,4,5-trihidroxiestilbeno, que ocorre nas isoformas *trans* e *cis* (Figura 13). A isoforma *trans* é a isoforma principal e representa a forma química mais extensamente estudada. No entanto, em exposição ao calor e à radiação ultravioleta, pode induzir à conversão para isoforma *cis*, cuja estrutura se assemelha muito à do estrogênio sintético dietilestilbestrol. Por causa disso, o resveratrol também foi classificado como um fitoestrogênio (KO, SETHI, *et al.*, 2017).

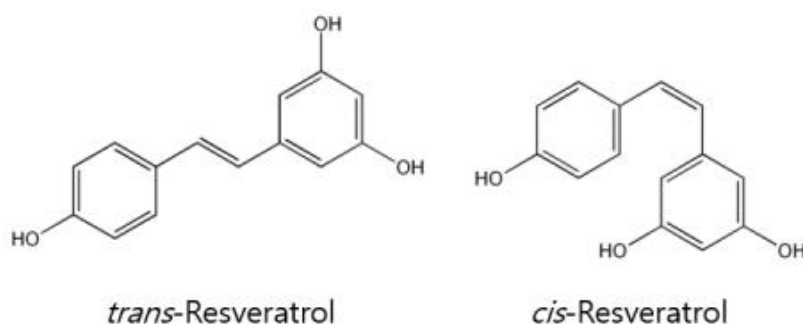


Figura 13 - Estrutura química de dois isômeros geométricos do resveratrol (KO, SETHI, *et al.*, 2017).

O potencial anticancerígeno do resveratrol foi relatado pela primeira vez em 1997 contra o câncer de pele, induzido pelo hidrocarboneto aromático polinuclear dimetilbenz(a) antraceno (DMBA) (JANG, CAI, *et al.*, 1997). A partir daí inúmeros trabalhos investigaram mais a fundo o efeito anti-tumoral do resveratrol, supressão do crescimento de células malignas, indução da parada do ciclo celular, restauração da apoptose, bem como a regulação negativa da expressão de genes específicos do câncer (SINHA, SARKAR, *et al.*, 2016).

Recentemente, foi demonstrado que o resveratrol tem grande capacidade de diminuir a proliferação de células altamente metastáticas (MDA-MB-231) e menos agressivas de células metastáticas (MCF-7) no câncer de mama (RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, PACHECO-VELÁZQUEZ, *et al.*, 2019). Um estudo, buscando avaliar os

efeitos do resveratrol na TEM induzida por TGF- β 1 em células CMTN (MDA-MB-231), observou que o tratamento do câncer de mama com resveratrol é capaz de inibir a migração celular ao diminuir os níveis de MMP-2, MMP-9, P-PI3K, P-AKT, Vimentina, Snail1 e Slug, revertendo a TEM (SUN, ZHOU, *et al.*, 2019).

Em relação ao metabolismo energético, o resveratrol diminui o conteúdo de ATP e a viabilidade celular ao interromper o metabolismo da glicose, uma vez que inibe diretamente a atividade da 6-fosfofruto-1-quinase (PFK) nas células do câncer de mama (GOMEZ, ZANCAN, *et al.*, 2013). Além disso, ele pode suprimir a captação de glicose ao inibir os níveis de EROs intracelulares e, assim, diminuir o acúmulo de HIF-1 α (JUNG, LEE, *et al.*, 2013).

Todas essas observações, embora sejam entusiasmantes na teoria, na prática não são aplicadas, uma vez que o efeito biológico do resveratrol é diversificado e dificulta na aplicação clínica como um medicamento quimioterápico. No entanto, tem sido bastante discutida a ação adjuvante do resveratrol na quimioterapia (KO, SETHI, *et al.*, 2017).

Um grupo de pesquisadores buscou avaliar o papel do resveratrol em situações de resistência ao quimioterápico paclitaxel, demasiadamente utilizado no tratamento do câncer de mama, e desenvolveu a linhagem MDA-MB-231, resistente ao paclitaxel, em comparação com a linhagem não transformada (sensível ao paclitaxel) (SPROUSE e HERBERT, 2014). O tratamento com resveratrol reduziu a proliferação celular e a formação de colônias bem como aumentou a senescência e a apoptose nas células resistentes, como também na linhagem sensível ao paclitaxel (SPROUSE e HERBERT, 2014). Estes resultados podem impactar em novas práticas do tratamento de células de câncer de mama triplo-negativas sensíveis e resistentes ao paclitaxel (SPROUSE e HERBERT, 2014).

1.2 HOMEOSTASE DE FOSFATO INORGÂNICO E CÂNCER

É estimado um aumento de 53% do número de novos casos para o ano 2030 em relação ao ano 2012, o que parcialmente está relacionado ao estilo de vida do paciente incidente (ACS, 2019); (BROWN e RAZZAQUE, 2018). Além da idade ser um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de mama, o alimento e a dieta são fatores determinantes para a incidência (ACS, 2019). Por exemplo, o excesso de certos micronutrientes, como magnésio, ferro, zinco e fosfato inorgânico (Pi) promove a proliferação celular excessiva ou facilita os danos ao DNA (BROWN e RAZZAQUE, 2018).

Especificamente em relação ao Pi, existem condições patológicas que levam a um desbalanço do Pi, como por exemplo a hiperfosfatemia (aumento do fosfato sérico). No contexto tumoral, é hipotetizado um aumento da biossíntese do RNA ribossomal, o que leva ao aumento da síntese proteica que suporta o crescimento do tumor (GOYAL e JIALAL, 2020); (BROWN, 2019). Portanto, para compreender profundamente como o Pi ou o desbalanço do Pi sérico influencia na progressão tumoral, é preciso entender antes a importância biológica do Pi para tecidos normais e sua regulação por processos fisiológicos (homeostase).

1.2.1 Importância biológica do Pi

O fósforo (P) é um elemento químico simples. Devido à sua característica altamente reativa com quatro átomos de oxigênio (fosfato: PO_4^{-3}), em sua forma livre com as hidroxilas ligadas, é denominado como fosfato inorgânico (IHEAGWARA, ING, *et al.*, 2013).

O Pi é um nutriente importante para a mineralização óssea devido a formação de cristais com cálcio, gerando hidroxiapatita. É essencial para formação de ATP seja pela glicólise ou fosforilação oxidativa (SAPIO e NAVIGLIO, 2015). O Pi serve como fonte para constituintes celulares orgânicos, como DNA, RNA, fosfolipídeos e uma variedade de intermediários metabólicos fosforilados (TAKEDA, TAKETANI, *et al.*, 2000). Por ser capaz de doar H^+ pelos grupamentos de OH^- , o Pi contribui para o sistema tampão no sangue (pH 7,4), alterando a taxa entre fosfato valente ou bivalente de acordo com o pH que se encontra (IHEAGWARA, ING, *et al.*, 2013) (Figura 14).

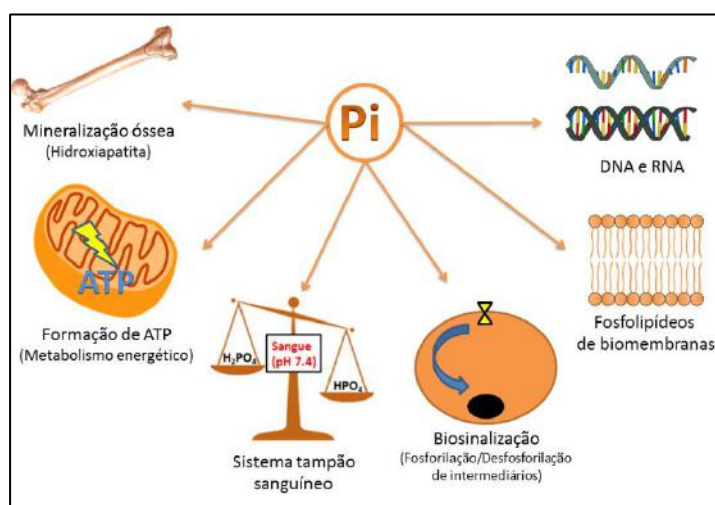


Figura 14 - Ilustração gráfica da importância biológica do Pi. O fosfato inorgânico (Pi) é importante para a mineralização óssea, devido a formação de cristais com cálcio gerando hidroxiapatita, formação de ATP (SAPIO e NAVIGLIO, 2015), sistema tampão sanguíneo (IHEAGWARA, ING, *et al.*, 2013), biosinalização através da fosforilação/defosforilação de intermediários, constituinte de fosfolipídeos, DNA, e RNA (TAKEDA, TAKETANI, *et al.*, 2000).

1.2.2 Transportadores de Pi sódio-dependente

A absorção de Pi é possível devido à translocação mediada pelos transportadores através das membranas celulares. O Pi entra nas células via co-transportadores de Na⁺/Pi (WAGNER, HERNANDO, *et al.*, 2014); (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013) (TAKEDA, TAKETANI, *et al.*, 2000). Esses co-transportadores constituem duas grandes famílias de transportadores de fosfato inorgânico que foram caracterizados em mamíferos, tais como, SLC20 e SLC34 (Figura 15), embora exista uma família de transportadores de Pi Na⁺-dependente (NaPi-I, NPTI) expressa predominantemente na membrana de borda em escova tubular proximal (Tabela 3). Estudos recentes sugerem que o NaPi-I pode funcionar mais como um modulador de transporte de Pi intrínseco, em vez de como um co-transportador de Na/Pi (TAKEDA *et al.*, 2000). Além de transportar fosfato, o NPT1 também transporta ânions e urato (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018).

A família SLC20 consiste em dois membros, tais como o PiT-1, que é codificado por SLC20A1, e o PiT-2, que é codificado por SLC20A2 (Figura 15). Esses dois membros da família SLC20 foram inicialmente identificados em receptores retrovirais Glvr-1 (receptor do vírus da leucemia gibbonape) e Ram-1 (receptor do vírus da leucemia ratamphotrópica) (MILLER, EDWARDS e MILLER, 1994). Eles são co-transportadores de fosfato de sódio que preferencialmente carregam o fosfato inorgânico monovalente (H₂PO₄⁻), juntamente com dois íons de sódio; e são expressos quase que exclusivamente no rim (Tabela 3) (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013).

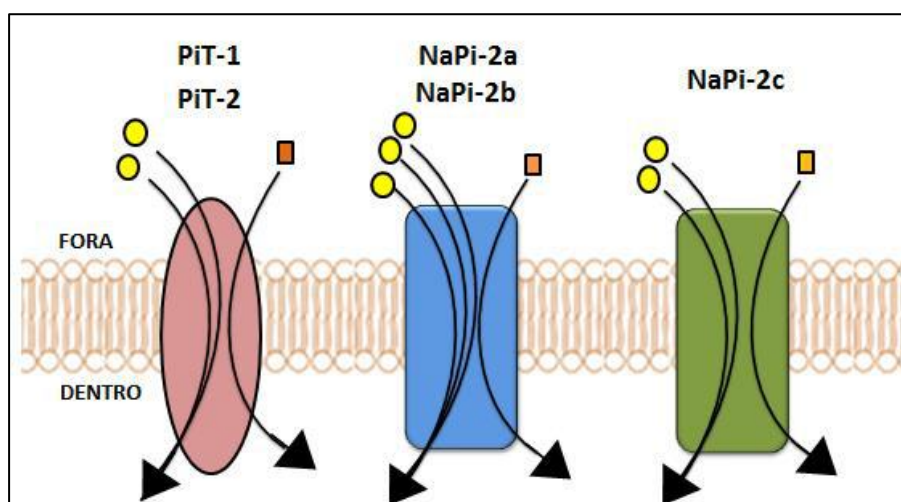


Figura 15: Modelos de transporte de Pi Na⁺-Dependente. SLC34A1 (NaPi-IIa) ou SLC34A2 (NaPi-IIb), SLC34A3 (NaPi-IIc) e SLC20A1 (PiT-1) ou SLC20A2 (PiT-2). A seta representa a direção do fluxo, o quadrado laranja representa a molécula de fosfato inorgânico e o círculo amarelo representa a molécula de sódio. Informações utilizadas para construção da figura foi baseada no estudo de (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013).

A família SLC34 consiste de três membros, a saber: NaPi-IIa (SLC34A1), NaPi-IIb (SLC34A2) e NaPi-IIc (SLC34A3) (Figura 15), com composições de aminoácidos e padrões de expressão únicos em tecidos humanos. Todos os membros desta família são co-transportadores de fosfato de sódio, embora apresentem uma cinética bioquímica diferente, conduzindo o transporte de fosfato inorgânico divalente (HPO_4^{2-}) juntamente com dois ou três íons de sódio (Tabela 3) (WAGNER, HERNANDO, *et al.*, 2014). Portanto, vale ressaltar que a expressão distinta do transportador em diferentes tecidos possui um valor fisiológico para aquele determinado tecido e sua respectiva contribuição para homeostase de Pi (TAKEDA, TAKETANI, *et al.*, 2000).

Tabela 3 - Transportadores de Pi Na⁺-Dependente.

Características	Tipo I (NPTI)	Tipo II			Tipo III
		Tipo II a (NPT2a)	Tipo II b (NPT2b)	Tipo II c (NPT2c)	
Nome	NaPi-I	NaPi – IIa	NaPi – IIb	NaPi - IIc	PiT - 1 / PiT - 2
Substratos	ânions orgânicos	Pi (Diprótico)	Pi (Diprótico)	Pi (Diprótico)	Pi (Monoprótico)
Afinidade por Pi	5-10 nM	0,1-0,2 mM	0,05 mM	0,1-0,2 mM	0,025 mM
Afinidade por Na ⁺	50-60 mM	50-70 mM	33 mM	50 mM	40-50 mM
Dependência de pH	Nenhuma	+	Alta em pH ácido	+ em pH neutro e alcalino	+
Expressão em tecidos	Rim e fígado	Rim, pulmão e osso	Intestino, pulmão, mama.	Rim	Rim, cérebro, pulmão, coração, fígado, músculo e osteoblastos.

Tabela adaptada de (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013)

1.2.3 Homeostase de Pi e sua regulação pelos transportadores de Pi sódio-dependente

A homeostase de Pi é mantida por um balanço entre a absorção de Pi intestinal obtido pela dieta, a mobilização de Pi nos ossos e a excreção renal. Em humanos, as concentrações extracelulares de Pi variam entre 0,8 e 1,4 mM (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018); (CAMALIER, YOUNG, *et al.*, 2010).

No intestino, o Pi é absorvido pelo co-transportador de Pi Na⁺-dependente NaPi-IIb (SLC34A2) (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018). Cerca de 60-65% da ingestão dietética de Pi é absorvida pelo intestino delgado (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018) e 30% da absorção é regulada e dependente de vitamina D (JACQUILLET e UNWIN, 2019) que se liga aos receptores nucleares das células da mucosa, iniciando a síntese de RNA mensageiro de transportadores de cálcio e fósforo (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018).

No rim, o Pi é absorvido para a formação da urina na cápsula renal, mas 70% da carga filtrada é reabsorvida pelas células dos túbulos proximais através dos cotransportadores do Pi NaPi-IIa e NaPi-IIc, com uma menor contribuição dos transportadores do PiT-2 (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018).

1.2.3.1 A homeostase de Pi é por fatores endócrinos

Fatores endócrinos afetam diretamente o balanço de Pi no corpo humano, dentre os mais conhecidos estão o paratormônio (PTH), a vitamina D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) e o fator de crescimento fibroblástico 23 (CHRISTOV e JÜPPNER, 2018); (JACQUILLET e UNWIN, 2019). O PTH é o principal modulador do metabolismo ósseo e mineral através de sua regulação da homeostase do cálcio e Pi. A síntese e clivagem do PTH ocorrem dentro da glândula paratireoide quando existe um elevado nível de Pi (JACQUILLET e UNWIN, 2019). Um estudo por Tatsumi e colaboradores (1998) exemplifica esse mecanismo fisiológico, no qual utilizaram ratos alimentados com alto (0.6% Pi) ou baixo (0.02% Pi) (TATSUMI, SEGAWA, *et al.*, 1998). Ratos alimentados com alto PI apresentaram um aumento na abundância de mRNA de PiT-1 na glândula paratireoide, ao passo que o PTH sérico foi diminuído (TATSUMI, SEGAWA, *et al.*, 1998). O PTH circulante no sangue regula a homeostase do fosfato promovendo a rápida internalização do transportador NaPi-IIa e a sua subsequente degradação lisossomal através da ligação do PTH aos receptores PTH / PTHrP na membrana apical ou basolateral. Com isso, percebe-se que há um aumento da sinalização de cAMP e ativação da proteína cinase A (PKA) ou PKC, ativando a via de sinalização ERK/MAPK para induzir a internalização mediada por PTH de NaPi-IIa (JACQUILLET e UNWIN, 2019) (Figura 16).

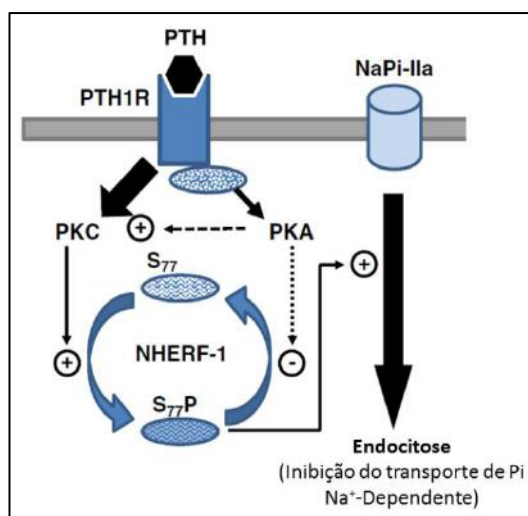


Figura 16 – “Downregulation” de NaPi-IIa por PTH no túbulo proximal renal. Adaptado de (JACQUILLET e UNWIN, 2019).

A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (vitamina D biologicamente ativa) é um outro hormônio que participa na homeostase de Pi e é sintetizada no túbulo proximal renal por mecanismos ainda não muito bem esclarecidos, mas possivelmente associados com o PTH e o hormônio FGF-23. Sabe-se que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sérica promove um aumento da expressão de PiT-2 no intestino e inibe a expressão do PTH nas glândulas paratireóide (JACQUILLET e UNWIN, 2019).

O hormônio FGF-23 (do inglês *fibroblast growth factor 23*, fator de crescimento fibroblástico 23) tem uma função distinta de outros membros da família FGF, pois atua principalmente como fator fosfatúrico. Ao contrário do hormônio PTH, o FGF-23 não apenas aumenta a excreção renal de Pi, mas também reduz a síntese de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, levando a um balanço de Pi negativo (OLIVEIRA e MOYSÉS, 2010). Além disso, estudos mostraram que osteoblastos em elevado Pi estimularam a síntese desse hormônio. Assim, no sangue, o FGF-23 liga-se a uma proteína *Klotho* que se complexa ao receptor de FGF-23 em células renais, ativando uma via da MAPK/ERK ao mesmo tempo que promove uma inibição da reabsorção de Pi pela inibição da expressão do NaPi-IIa e NaPi-IIc (YAMASHITA, KONISHI, *et al.*, 2002).

1.2.4 Regulação da homeostase de Pi pelos transportadores de Pi Na⁺-independente

Embora os transportadores de Pi Na⁺-dependente tenham sido investigados em detalhes, foi demonstrada, em alguns estudos, outra classe de transportador de Pi independente de sódio que se refere ao transporte Pi Na⁺-independente não como um transporte Pi inespecífico. Mostra, sobretudo, que não é meramente uma consequência do aumento da difusão, pelo contrário, essa captação exhibe várias características exclusivas dos mecanismos de transporte: saturação, dependência de pH, inibição por substratos putativos e diminuição do transporte por inibidores (Tabela 4).

1.2.4.1 Absorção de Pi intestinal

As concentrações fisiológicas de fosfato luminal no jejuno humano variam de 0,7 a 12,7 mM, dependendo do tipo de alimento ingerido (DAVIS, ZERWEKH, *et al.*, 1983). No entanto, foi demonstrado que a captação de fosfato depende criticamente do sódio, com uma afinidade pelo fosfato de aproximadamente 0,1 mM, possivelmente responsável por apenas 50% do transporte transepitelial de fosfato, através do intestino delgado. Os 50% restantes do transporte transepitelial de fosfato são sódio-independentes (Figura 17) (LEE e MARKS, 2015).

Utilizando a linhagem celular humana Caco2BBE como modelo de células intestinais, um estudo caracterizou bioquimicamente o transporte de Pi sódio-independente crescido em Pi 1 mM (condição de controle) e Pi 4 mM, um valor representativo da alta concentração de Pi no lúmen intestinal (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014). Em cada condição, foi possível observar um comportamento cinético distinto; além disso, os autores mostraram que o transporte de Pi sódio-independente em Pi 1 mM é próton ativado, o que não é observado para o transporte de Pi sódio-independente em Pi 4 mM (Tabela 4) (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014).

Tabela 4: Parâmetros cinéticos dos transportadores de Pi Na⁺-independente em diversos tecidos.

Tecido ou célula	Transporte de Pi	Afinidade	K _m (mM Pi)	V _{max}	Ref
Células intestinais Caco2BBE (1 mM Pi)	Na ⁺ -Independente proton ativado	Alta	0.071 ± 0.020	0.073 ± 0.017 nmol Pi·mg cell proteína ⁻¹ ·min ⁻¹	(CANDEAL, CALDAS, <i>et al.</i> , 2014)
Células intestinais Caco2BBE (4 mM Pi)	Na ⁺ -Independente	Alta	0.155 ± 0.025	0.849 ± 0.11 nmol Pi·mg cell proteína ⁻¹ ·min ⁻¹	(CANDEAL, CALDAS, <i>et al.</i> , 2014)
Células vasculares do músculo liso	Na ⁺ -Independente	Alta	0.10 ± 0.04	180.7 ± 32.8 pmol/mg proteína·min	(VILA-BELLOSTA, BOGAERT, <i>et al.</i> , 2007)
Condrócitos da cartilagem articular	Na ⁺ -Independente	Alta	0.22 ± 0.07	0.50 ± 0.005 mmol (L células) ⁻¹ (10 min) ⁻¹	(SOLOMON, WILKINS, <i>et al.</i> , 2007)
Vesículas matriz da cartilagem articular	Na ⁺ -Independente	Alta	0.16 ± 0.04	0.67 ± 0.04 nmol (mg proteína) ⁻¹ (min) ⁻¹	(SOLOMON, WILKINS, <i>et al.</i> , 2007)
Osteoclastos-like	H ⁺ -dependente	Alta	0.35	~15 nmol/mg/10 min	(ITO, MATUKA, <i>et al.</i> , 2005)
	H ⁺ -dependente	Baixa	7.5	~55 nmol/mg/10 min	(ITO, MATUKA, <i>et al.</i> , 2005)
Capilares da barreira hematoencefálica	Trocador de ânions	Alta	0.16	0.37 nmol/mg proteína/30 segundos	(DELLAIRE e BÉLIVEAU, 1992)
Membranas basolaterais renal	Na ⁺ -Independente	Baixa	10.1 ± 1.2	13.6 ± 2.0 nmol (mg proteína) ⁻¹ min ⁻¹	(AZZAROLO, RITCHIE e QUAMME, 1991)
Células de câncer de mama: MDA-MB-231	H ⁺ -dependente	Baixa	1.387 ± 0.1674	198.6 ± 10.23 Pi × h ⁻¹ × mg protein ⁻¹	(LACERDA-ABREU, RUSSO-ABRAHÃO, <i>et al.</i> , 2019)

1.2.4.2 Transporte de Pi e a reabsorção óssea

O esqueleto ósseo é continuamente alterado, seja na sua massa ou na forma (TEITELBAUM e ROSS, 2003). Tal ação é mediada pelos osteoblastos (as células responsáveis pela formação óssea) e osteoclastos (as células responsáveis pela reabsorção óssea) (TEITELBAUM e ROSS, 2003). Tem sido classicamente mostrado que o ambiente de reabsorção óssea é altamente ácido por causa de uma H^+ -ATPase do tipo V, que libera prótons para o ambiente extracelular, de modo a desfazer a hidroxiapatita em cálcio e Pi (TEITELBAUM e ROSS, 2003).

Foi caracterizado o transporte de Pi H^+ -dependente em osteoclastos (Figura 17), no qual a adição de 2 mM de K_2HPO_4 induziu uma ligeira diminuição no pH intracelular. Isso sugere que o H^+ fluiu para o citoplasma dos osteoclastos junto com o Pi. O sistema de transporte de Pi H^+ -dependente compreende dois componentes cinéticos, um de alta e outra de baixa afinidade (Tabela 4). Esse sistema de transporte é importante não só por fornecer o Pi para a H^+ -ATPase do tipo V, mas também é essencial para a manutenção do gradiente de H^+ intracelular e para um melhor funcionamento da H^+ -ATPase do tipo V (ITO, MATUKA, *et al.*, 2005).

1.2.4.3 O sistema de transporte de Pi renal

No rim, um considerável número de néfrons funcionais desempenha um papel significativo na homeostase do Pi; em que 75% do Pi filtrado é reabsorvido no túbulo proximal, já no túbulo distal apenas 10% e 15% do Pi é perdido na urina (GOYAL e JIALAL, 2020).

O túbulo proximal é uma região intensivamente ativa, no qual dois terços do filtrado glomerular é reabsorvido por esse túbulo (Figura 17). Ou seja, íons, água e outras moléculas, dentro do lúmen do túbulo proximal, são reabsorvidos pelas microvilosidades da membrana em forma de escova (BBM, do inglês *brush-border membrane*); e, do citoplasma, passam para o plasma sanguíneo pela membrana basolaterais das células do túbulo proximal (BLM, do inglês, *basolateral membrane*) (CARLSON, 2019).

É conhecido que a diferença no potencial eletroquímico do sódio através da MMB no túbulo proximal fornece a força motriz para o acúmulo intracelular de Pi (BURCKHARDT e BURCKHARDT, 2003). Não muito surpreendente, o transporte de Pi nessa membrana é sódio-dependente, com uma alta afinidade pelo Pi (0,1 mM Pi). Mas o transporte de Pi de baixa afinidade na BLM é sódio-independente; e esse tipo de transportador de Pi está presente naquela membrana justamente para não liberar o sódio junto com o Pi no plasma sanguíneo (Tabela 4) (HOFMAN, THEES e KINNE, 1976).

1.2.4.4 Captação de Pi pelos capilares da barreira hematoencefálica

Os capilares do cérebro são formados por um endotélio especializado, cuja função é regular o movimento de solutos entre o sangue e o cérebro. A concentração de fosfato inorgânico no líquido intersticial do cérebro é mantida entre 0,5 e 1,0 mM (DELLAIRE e BÉLIVEAU, 1992).

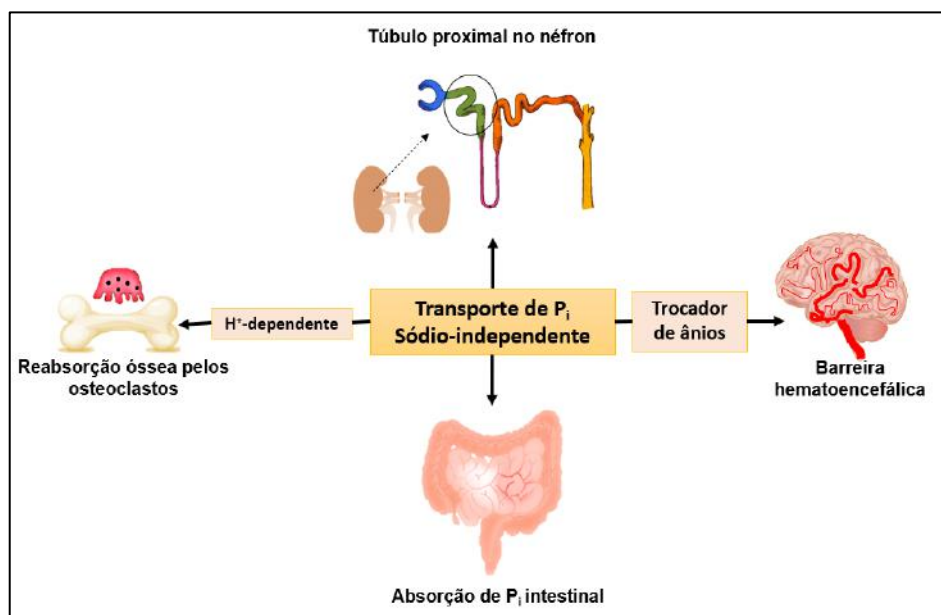


Figura 17: Representação da importância do transporte Pi sódio-independente para a homeostase do Pi. O transporte Pi Na^+ -independente participa na absorção de Pi nas células intestinais (LEE e MARKS, 2015), nas células dos túbulos proximais (AZZAROLO, RITCHIE e QUAMME, 1991), na reabsorção óssea pelos osteoclastos (transporte de Pi H^+ -dependente) (ITO, MATUKA, *et al.*, 2005) e capilares da barreira hematoencefálica (troca de ânions) (DELLAIRE e BÉLIVEAU, 1992).

Foi demonstrado por Dallaire e Béliveau (1992) que nos capilares cerebrais bovinos, o transporte de Pi é um sistema de alta afinidade (Tabela 4), insensível a qualquer outro cátion para a translocação do fosfato. Foi sugerido que o transporte de Pi sódio-independente seria realizado por um trocador de ânions, pois são inibidas concentrações de vários ânions: piruvato, acetato, citrato, glutamato e sulfato e por inibidores específicos de trocadores de ânions (ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfônico, DIDS e 4-acetamido-4-isotiocianostilbeno-2,2'-disulfonato, SITS), importantes para manter a pequena concentração de fosfato inorgânico do fluido intersticial cerebral (Figura 17) (DELLAIRE e BÉLIVEAU, 1992).

1.2.4.5 Absorção de Pi para desenvolvimento de doenças (calcificação vascular e osteoartrite)

As calcificações vasculares (VCs, do inglês *vascular calcifications*) são processos biológicos regulados ativamente que envolvem formação de hidroxiapatita, ossificação celular e a participação de fatores que promovem ou inibem a deposição organizada de hidroxiapatita no músculo liso vascular (LANZER, BOEHM, *et al.*, 2014). Nas células do músculo liso vascular (CMLV) em ratos, foi caracterizado cineticamente o transporte de fosfato. As CMLV exibem componentes de transporte Pi sódio-dependente e sódio-independente com comportamentos cinéticos semelhantes: uma alta afinidade (Tabela 4). Em outras palavras, ambos os componentes contribuem quase igualmente para a absorção total de Pi pelos CMLV, importante para o processo de calcificação vascular (Figura 18 A) (VILA-BELLOSTA, BOGAERT, *et al.*, 2007).

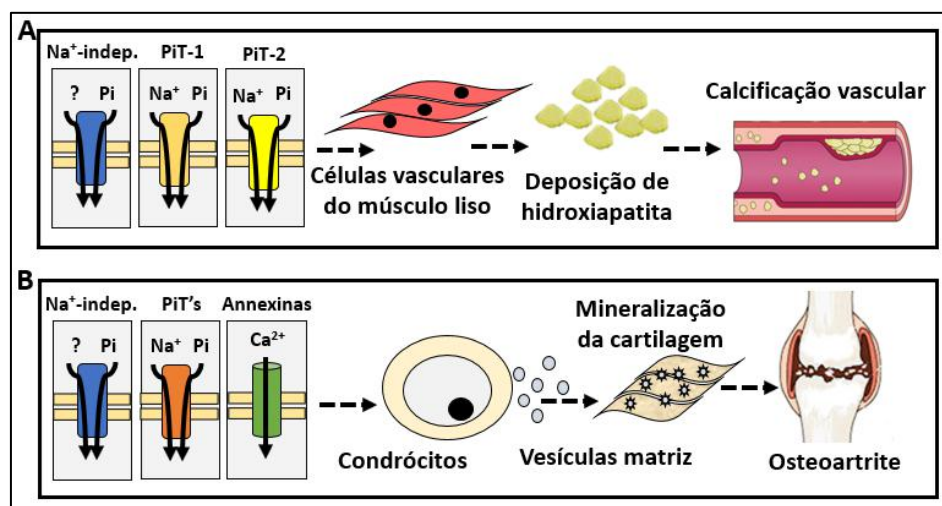


Figura 18: Mecanismo esquemático do transporte de Pi sódio-independente para a patologia. A) O transporte Pi sódio-independente junto com Pi (PiT-1 e PiT-2) nas células do músculo liso vascular contribui para a deposição de hidroxiapatita no músculo liso vascular (VILA-BELLOSTA, BOGAERT, *et al.*, 2007). B) O transporte Pi Na⁺-independente junto com Pi (PiT-1 e PiT-2) e anexinas (canais de Ca²⁺) em condrócitos ou vesículas matriz promove a mineralização da cartilagem e consequentemente osteoartrite (SOLOMON, WILKINS, *et al.*, 2007).

Muitas doenças articulares, como a osteoartrite, são caracterizadas por eventual destruição da cartilagem articular e são associadas à deposição de cristais no líquido sinovial, como cristais de hidroxiapatita (HAYES, HARRIS, *et al.*, 1993). O cálcio e o Pi são absorvidos pelos condrócitos e liberam vesículas da matriz (VM) que, ao formarem cristais de hidroxiapatita nas fibrilas de colágeno, mineralizam a matriz extracelular e desenvolvem a osteoartrite (MICHIGAMI, 2019).

Em condrócitos articulares e em VM foi demonstrado um transporte de Pi dependente e independente de sódio, ambos de alta afinidade pelo Pi (0,1 mM Pi) (Tabela

4). Embora possuam afinidade pelo Pi de forma semelhante, possuem afinidades de inibições distintas. O ácido fosfonoacético (PAA, do inglês *phosphonoacetic acid*) apresentou uma baixa inibição para o componente sódio-dependente, mas foi possível observar uma alta inibição para o componente sódio-independente (SOLOMON, WILKINS, *et al.*, 2007). Seja nos condrócitos ou nas vesículas da matriz, os autores acreditam que os sistemas de transporte do Pi podem contribuir para a deposição de minerais na cartilagem, promovendo distúrbios articulares degenerativos, como a osteoartrite (Figura 18 B) (SOLOMON, WILKINS, *et al.*, 2007).

1.2.5 Distúrbios da homeostase do Pi

O fosfato inorgânico é mantido em equilíbrio na faixa de 0,8-1,4 mM Pi mediado pelos transportadores de Pi sódio-dependente, transportadores de Pi sódio-independente e por fatores endócrinos (FGF-23 PTH e vitamina D3). A diminuição (hipofosfatemia) ou aumento (hiperfosfatemia) dos níveis séricos de Pi podem ser influenciados pela ingestão oral, alterações na reabsorção do trato gastrintestinal ou alterações na excreção renal (DUTRA, TALLO, *et al.*, 2012).

A hipofosfatemia é definida com a concentração sérica de fosfato < 2,7 mg/dL (0,872 mM) (DUTRA, TALLO, *et al.*, 2012). É usualmente categorizada como moderada com 0,32-0,65 mM Pi ou severa com < 0,32 mM Pi (DUTRA, TALLO, *et al.*, 2012). Geralmente, a hipofosfatemia crônica conseqüentemente diminui a reabsorção do Pi associada a um aumento nos níveis circulantes de PTH (hiperparatireoidismo primário ou secundário), deficiência ou resistência de vitamina D (JACQUILLET e UNWIN, 2019).

A hiperfosfatemia é definida quando a concentração sérica de fósforo é >4,5 mg/dL (1,4535 mM). É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com doença renal crônica (DRC) e também pode ser uma causa de lesão renal aguda (LRA). Um declínio na função renal leva à retenção de fosfato, níveis elevados de hormônio paratireóide e níveis baixos de 1,25-di-hidroxi vitamina D (KESTENBAUM, SAMPSON, *et al.*, 2005).

A manifestação clínica mais comum de hiperfosfatemia é relacionada com a hipocalcemia, devido à precipitação de fosfato de cálcio, o que pode levar à tetania e outras manifestações clínicas de hipocalcemia. O risco de precipitação de fosfato de cálcio parece aumentar quando o produto cálcio X fósforo é superior a 55-60 mg/dL (17.765-19.38 mM). Cristais de fosfato de cálcio também podem depositar em tecidos moles e causar lesões a vários órgãos (DUTRA, TALLO, *et al.*, 2012).

A hiperfosfatemia também pode ocorrer independentemente de DRC, como resultado do aumento da reabsorção do túbulo proximal de Pi no hipoparatiroidismo, acromegalia, tratamento com bisfosfonatos; e, após toxicidade da vitamina D, com hipercalcemia, que do mesmo modo reduz a excreção de Pi e a secreção de PTH (JACUILLET e UNWIN, 2019).

1.2.6 Alterações da sinalização celular pela hiperfosfatemia

Diversos estudos têm relatado a relação da hiperfosfatemia com modificações hormonais ou agravamento de outras doenças, principalmente pela interferência da sobrecarga de Pi na sinalização celular. Um estudo demonstrou que diferentes concentrações de Pi (0,1-1 mM) causou uma indução da morte celular em osteoblastos cultivados. A morte apoptótica foi confirmada após medição da atividade da caspase-3. Além disso, após a incubação com Pi, observou-se que o Pi diminuiu o potencial da membrana mitocondrial como um gatilho indutor apoptótico. Mas ao incubar com um inibidor específico do transporte de Pi Na⁺-dependente, o ácido fosfonofórmico (PFA, do inglês *phosphonoformic acid*), a apoptose induzida por Pi foi bloqueada; com isso, sugere-se que o Pi precisa entrar na célula através de um transportador específico de Na-Pi da membrana plasmática (ADAMS, MANSFIELD, *et al.*, 2001).

Em células de osteoblásticas de camundongos (UMR-106), a elevada concentração de Pi extracelular (5 mM) foi capaz de induzir a expressão do hormônio FGF-23 ; a sinalização sugerida pelos autores é que o elevado Pi induziu a produção de H₂O₂, possivelmente originada pela uma NOX. O H₂O₂ produzido foi capaz de aumentar a atividade da via de sinalização MEK/ERK, provavelmente uma via reguladora da expressão do FGF-23 (HORI, KINOSHITA, *et al.*, 2015).

No entanto, o Pi (2 mM) foi capaz de estimular a liberação de H₂O₂ mitocondrial em mitocôndrias isoladas de cérebro, coração e fígado de ratos (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004). As autoras justificam que o Pi é transportado prontamente pelo co-transportador mitocondrial de Pi/H⁺. De acordo com a Equação 1, os prótons de forma rápida e reversível alteram o ΔpH, o que contribui para um aumento do potencial de membrana mitocondrial, bem como um vazamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons e conseqüentemente um aumento da produção de EROs (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004).

Esse efeito também foi observado em mitocôndrias de células β -pancreáticas, em que a produção de EROs mitocondrial mediado pelo elevado Pi (5 mM) atua na abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (NGUYEN, QUAN, *et al.*, 2015); (QUAN, DAS, *et al.*, 2013). A despolarização mitocondrial é observada em estágio tardio, precedida por morte celular apoptótica em células β -pancreáticas e induzida pela elevada concentração de Pi. Os autores discutem que a co-relação entre a hiperfosfatemia com pacientes diabéticos tipo 1 possivelmente seria justificada pelo efeito do Pi na mitocôndria (NGUYEN, QUAN, *et al.*, 2015); (QUAN, DAS, *et al.*, 2013).

Em células endoteliais, foi mostrado que a sobrecarga de Pi (2,8 mM) promove a ativação da PKC o qual ativa a NOX e conseqüentemente produz mais EROs; tudo isso contribui para uma função endotelial prejudicada (SHUTO, TAKETANI, *et al.*, 2009). Já em células endoteliais humanas, estudos demonstram que o aumento do Pi (7 mM) induz a produção de EROs e a diminuição do potencial da membrana mitocondrial duas horas após o tratamento, seguido pela promoção da apoptose e pela ativação de caspase-3 (DI MARCO, HAUSBERG, *et al.*, 2008).

1.2.7 Hiperfosfatemia e câncer

Reconhece-se a importância do Pi como um essencial nutriente para o metabolismo energético. Entende-se que elevados níveis de Pi promovem aberrações sinalizatórias, nesse sentido, tem sido bastante descrito por pesquisadores a associação da hiperfosfatemia com o desenvolvimento do câncer. Um estudo clínico realizado por Papaloucas, Papaloucas e outros colaboradores (2014) mostrou que pacientes diagnosticados com câncer de cabeça, pescoço, pulmão e cérvix apresentavam uma concentração sérica de Pi com 2,52 (\pm 0,19) mM, duas vezes mais do que em pacientes saudáveis sem a detecção de câncer com Pi sérico 1,09 (\pm 0,72) mM (PAPALOUCAS, PAPALOUCAS, *et al.*, 2014). Os autores, no entanto, não sabem dizer se o aumento do fosfato sérico é a causa da doença ou um resultado (PAPALOUCAS, PAPALOUCAS, *et al.*, 2014).

Em 2000, um estudo mostrou o Pi como um fator limitante na taxa de crescimento biológico, principalmente pelo fato de ele ser um dos elementos fundamentais para os ácidos nucleicos como o DNA e o RNA (ELSER, STERNER, *et al.*, 2000). Elser *et al.* (2000) publicaram um modelo matemático baseado na hipótese da taxa de crescimento (HTC), que prevê uma redução de três quartos do tamanho do tumor se o paciente reduzir pela metade a ingestão de fosfato (ELSER, STERNER, *et al.*, 2000).

Semelhante a citocinas e vários fatores de crescimento, o fosfato também pode induzir o crescimento de células cancerígenas por meio de várias sinalizações promotoras de crescimento (BROWN e RAZZAQUE, 2018). Em células de câncer de pele (JB6), concentrações elevadas de Pi (3 mM Pi) promoveram a transformação celular *in vitro* e estimularam a proliferação celular pela ativação da via de sinalização N-ras, ERK1/2. Ao se utilizar um modelo de iniciação tumoral pelo agente químico altamente carcinogênico - o DMBA - a elevada dieta em Pi ($3,25 \pm 0,58$ mM Pi), comparada com uma dieta normal em Pi ($2,17 \pm 0,19$ mM Pi), promove uma acelerada indução para formação de papilomas em camundongos (Figura 19 A) (CAMALIER, YOUNG, *et al.*, 2010).

Um outro grupo de pesquisadores, ao utilizar camundongos como modelo de indução de câncer de pulmão por mutação K-ras^{LA1}, observou que ao alimentar os animais por quatro meses com 0.5% Pi (normal Pi) e 1.0% Pi (alto Pi), a incidência de tumores em pulmões e os diâmetros dos tumores foram maiores em camundongos alimentados com alto Pi (Figura 19 B) (JIN, XU, *et al.*, 2009). Além disso, os pesquisadores também descobriram que os altos níveis de fosfato na dieta suprimiram a fosfatase e o PTEN, um supressor de tumor (JIN, XU, *et al.*, 2009).

Recentemente, em tumores de glândula mamária de camundongos, percebeu-se uma alta concentração de Pi no microambiente tumoral ($Pi\ 1,8 \pm 0,2mM$) em comparação com a glândula mamária normal ($Pi\ 0,84 \pm 0,07mM$), considerada como um marcador para a progressão do tumor (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017).

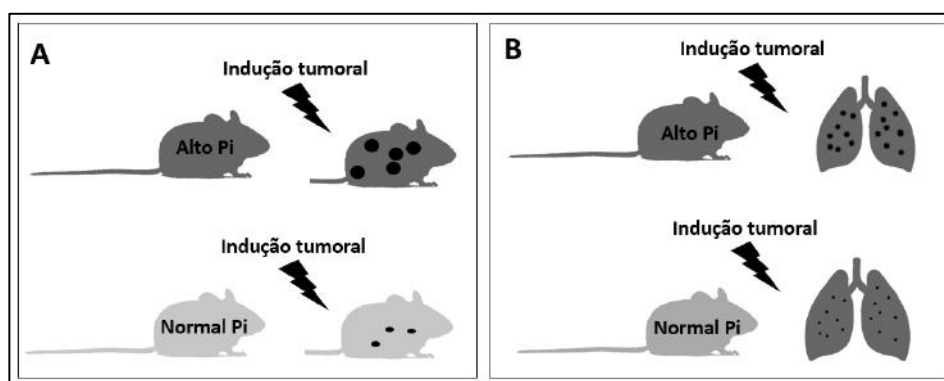


Figura 19: Influência da elevada dieta de Pi para indução tumoral. A) Camundongos alimentados com alto Pi (1,2%) comparado com normal Pi (0,2%). Quando induzidos ao câncer, apresentaram uma elevada incidência e diâmetros de papilomas (câncer de pele) (CAMALIER, YOUNG, *et al.*, 2010). B) Camundongos alimentados com alto Pi (1%), comparado com normal Pi (0,5%), quando induzidos ao câncer, apresentaram uma maior incidência e diâmetros de lesões tumorais pulmonares (JIN, XU, *et al.*, 2009).

Em células de câncer de mama, o efeito do Pi como estimulador proliferativo não foi observado em MCF-7 e até uma forte inibição da proliferação na linhagem MDA-MB-231, até 72 horas de incubação (Figura 20 A) (SAPIO, SORVILLO, *et al.*, 2015). Na verdade, Sapio, Sorvillo e outros colaboradores (2015) sugerem fortemente que o Pi atua como uma nova molécula de sinalização, capaz de provocar uma forte ação antiproliferativa em células de câncer de mama triplo-negativas MDA-MB-231 (SAPIO, SORVILLO, *et al.*, 2015). Além disso, foi mostrado que o Pi inibe a proliferação de células MDA-MB-231 pelo retardamento da progressão do ciclo celular e por meio da inibição da expressão de ciclina A e E, sem ocorrência de apoptose pela ausência de clivagem da caspase efetora 3 (SAPIO, SORVILLO, *et al.*, 2015).

No mesmo ano, um outro grupo de pesquisa composto por Lin, McKinnon e outros colaboradores (2015) buscou avaliar o efeito do elevado Pi para metástase e angiogênese em células de câncer de pulmão (A549) e células de câncer de mama (MDA-MB-231). Observou-se, então, um efeito positivo do Pi para esses processos (Figura 20 B) (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015). Especificamente em relação ao câncer de mama, por volta de 72 horas de incubação com diferentes concentrações de Pi (1, 3 e 5 mM Pi), foi possível observar um estímulo crescente da migração celular, acompanhado pelo estímulo da expressão de marcadores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), osteopontina e o “*forkhead box protein C2*”, um fator de transcrição relacionado a vasculogênese e angiogênese (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015).

Além do Pi, as EROs são importantes moléculas sinalizadoras para a progressão tumoral (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019). Em alguns modelos celulares em células de mamíferos, foi mostrado que o elevado Pi extracelular é capaz de aumentar a produção de ERO mitocondrial (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004). Em relação a elevada concentração de Pi no microambiente tumoral de mama, ainda não foi investigado se o Pi é capaz de aumentar a produção de EROs, uma vez que o elevado Pi é conhecido por estimular migração celular (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015). Além disso, seria de extrema relevância investigar se os transportadores de Pi no microambiente tumoral regularia essa produção de EROs induzida por Pi para apontar como alvos terapêuticos para a progressão tumoral induzida pelo Pi.

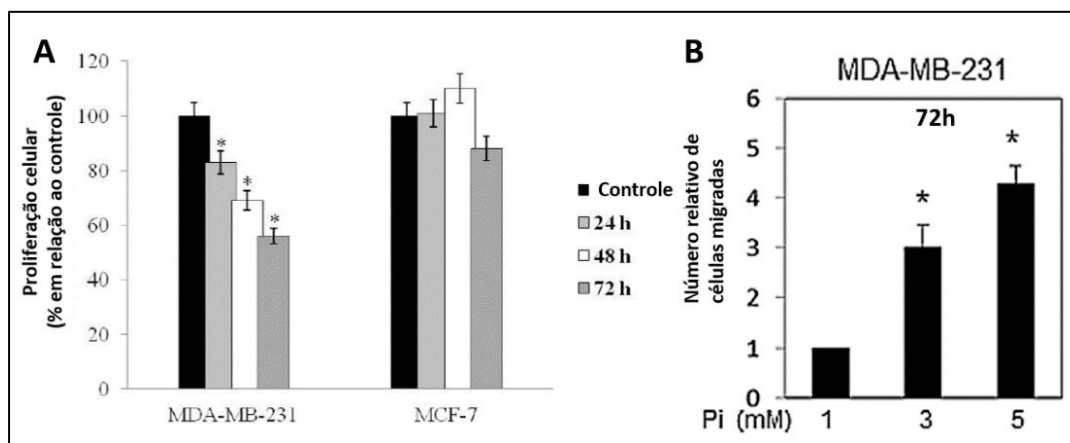


Figura 20: Efeito do elevado Pi na proliferação e migração em células de câncer de mama. A) Duas linhagens de câncer de mama: MDA-MB-231 e MCF-7 foram crescidas em 5 mM Pi ou não (controle) em diferentes tempos. Posteriormente o número de células foram contados para estimar a proliferação celular em relação ao controle (SAPIO, SORVILLO, *et al.*, 2015). B) Migração celular realizada pelo método “Boyden” após 72 horas de incubação em crescentes concentrações de Pi (1, 3 e 5 mM Pi) (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015). Para todos os gráficos, os dados representam a média de três experimentos independentes. * representa diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle de células não tratadas com 1 mM Pi.

1.3 PRODUÇÃO DE PI EXTRACELULAR: PARTICIPAÇÃO DAS ECTO-ENZIMAS

Cerca de 60-70% do Pi total na ingestão de alimentos está presente como composto de fosfato orgânico, portanto, as enzimas ecto-nucleotidase e ecto-fosfatase são necessárias para fornecê-lo a partir da hidrólise de compostos fosforilados, como glicose 1-fosfato, ATP, ADP e 5'AMP (ZIMMERMANN, 2000) (ROTHSTEIN, MEIER e SCHARF, 1953). Nucleosídeos extracelulares e nucleotídeos derivados da porção purina (como adenosina, ADP e ATP) ou pirimidina (como UDP e UTP) não apenas atuam como fonte de energia para organismos vivos, mas também desempenham papel de sinalização, uma vez que os nucleotídeos são liberados para o ambiente extracelular.

Através das panexinas, as junções de conexinas controlam várias condições patológicas e fisiológicas (BAQI, 2015) (IQBAL, 2019). Essas moléculas de sinalização modulam uma variedade de funções fisiológicas, como coagulação do sangue, inflamação e reações imunológicas e proliferação celular (RASHIDA e IQBAL, 2014). Essas funções são controladas pela ativação específica de receptores purinérgicos que são ativados por nucleotídeos extracelulares, como os subtipos de receptores purinérgicos: P2 (ATP) e P1 (Adenosina) (IQBAL, 2019) (RASHIDA e IQBAL, 2014). A ativação de receptores purinérgicos pode ser controlada por hidrólise extracelular de nucleotídeos; enquanto as ecto-nucleotidases são responsáveis pela hidrólise do ATP, ao passo que gera ADP, AMP, adenosina e Pi (Figura 21) (ZIMMERMANN, 2000) (BAQI, 2015) (IQBAL, 2019) (RASHIDA e IQBAL, 2014). Outra classe de enzimas que podem hidrolisar compostos

fosforilados são as ectofosfatases ácidas, como a fosfatase ácida transmembrana da próstata (TM-PAcP), recentemente descoberta como uma variante de uma fosfatase secretada usada no diagnóstico de câncer de próstata (MUNIYAN, CHATURVEDI, *et al.*, 2013) (QUINTERO, ARAUJO, *et al.*, 2017).

Vários tecidos tumorais apresentam níveis elevados de expressão de ectonucleotidase, ecto-fosfatase e transportadores de Pi (SCHETINGER, MORSCH, *et al.*, 2007) (LEE e MULLER, 2017) (STAGG e SMYTH, 2010). No entanto, nenhum estudo procurou integrar essas enzimas com foco na liberação de Pi para o ambiente do tumor e suas possíveis funções para a progressão do tumor até o momento.

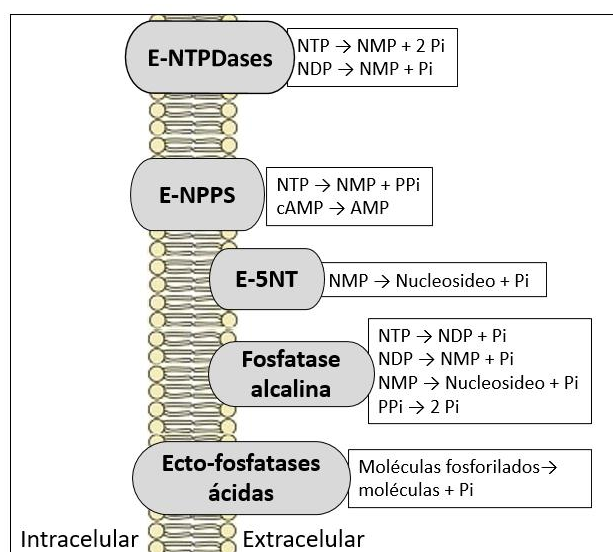


Figura 21 - Catálises das ecto-nucleotidases e ecto-fosfatases. Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) catalisam a desfosforilação de nucleotídeo trifosfato (NTP) e nucleotídeo difosfato (NDP) (ZIMMERMANN, 2000). Fosfodiesterases / fosfodiesterases (E-NPPs) catalisam a desfosforilação de NTP. Além disso, NPP2 catalisa ATP, ADP, AMP e desfosforilação PPi (ZIMMERMANN, 2000). A ecto-5-nucleotidase (E-5NT) catalisa a desfosforilação do monofosfato de nucleotídeo (NMP) (ZIMMERMANN, 2000). A fosfatase alcalina catalisa a desfosforilação NTP, NDP, NMP e PPi (ZIMMERMANN, 2000). A ectofosfatase ácida catalisa a desfosforilação de moléculas fosforiladas (ZIMMERMANN, 2009).

1.3.1 Ecto-Nucleotidases

As ecto-nucleotidases são um conjunto de enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares fosforilados derivados de purina ou pirimidina (Figura 21). As quatro classes principais de ecto-nucleotidase são:

a) Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase): geração de ADP e AMP a partir da hidrólise de ATP (ZIMMERMANN, 2000) (BAQI, 2015) (IQBAL, 2019) (RASHIDA e IQBAL, 2014);

b) Ecto-nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterases (E-NPPs): hidrólise de ATP em AMP (ZIMMERMANN, 2000) (BAQI, 2015) (IQBAL, 2019) (RASHIDA e IQBAL, 2014);

c) Ecto-5-nucleotidase (e5NT): geração de adenosina a partir da hidrólise de 5'AMP (ZIMMERMANN, 2000) (RASHIDA e IQBAL, 2014).

1.3.1.1 E-NTPDases

A família E-NTPDase compreende oito enzimas que diferem na localização celular e especificidade do substrato, enquanto quatro apresentam sítio catalítico extracelular: NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3) e NTPDase8 (CD39L4) (ZIMMERMANN, 2000) (IQBAL, 2019) (RASHIDA e IQBAL, 2014). Alta hidrólise de ATP ou superexpressão de NTPDases tem sido observada em vários tipos de câncer, como por exemplo os melanomas, Walker 256, câncer de bexiga e câncer de mama (SCHETINGER, MORSCH, *et al.*, 2007) (LEE e MULLER, 2017) (STAGG e SMYTH, 2010).

1.3.1.2 E-NPPs

Em relação à família de E-NPPs, foram relatadas sete classes de enzimas (E-NPP1 - E-NPP7), porém quatro são capazes de hidrolisar uma variedade de nucleotídeos: E-NPP1, NPP2 (autotaxina), NPP3 e NPP4. Com relação à expressão dessas enzimas em tecidos tumorais, NPP1 é amplamente identificada em tumores cerebrais neurais, membranas celulares de glioma C6 de rato, tumores cerebrais astrocíticos humanos e células-tronco de glioblastoma humano (SCHETINGER, MORSCH, *et al.*, 2007) (LEE e MULLER, 2017) (STAGG e SMYTH, 2010). NPP2 foi intimamente associado com o fenótipo de migração em melanomas e vários tumores, tais como carcinoma hepatocelular, neuroblastoma, carcinoma de próstata, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de mama (YANG, LEE, *et al.*, 2002) (LEE e MULLER, 2017) (STAGG e SMYTH, 2010).

1.3.1.3 Ecto-5'-NT

Ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT; CD73) é uma enzima transmembrana encontrada em vertebrados, plantas e até em bactérias. A ecto-5'-nucleotidase hidrolisa AMP em adenosina, que é a principal fonte de adenosina para os receptores de adenosina (P1) (IQBAL, 2019). Ecto-5'-NT é ancorado à membrana plasmática por uma âncora GPI. Ecto-5'-NT catalisa a hidrólise do fosfato esterificado com carbono 5 'da ribose ou desoxirribose (BAQI, 2015). A superexpressão de CD73 está bem estabelecida na literatura para vários cânceres, incluindo o câncer de mama (STAGG e SMYTH, 2010) (DO CARMO ARAÚJO, ROCHA, *et al.*, 2005).

1.3.1.4 Fosfatases alcalinas

Outro tipo de enzima capaz de hidrolisar nucleotídeos são as fosfatases alcalinas (Figura 21). As fosfatases alcalinas (ALP) são metaloenzimas ubíquas e representam uma família de proteínas de fosfomonoesterases. Essas enzimas podem ser divididas em dois grupos: fosfatase alcalina não específica de tecido (TNALP) e ALPs específicas de tecido, incluindo ALP placentária (PALP), ALP intestinal (IALP) e células germinativas ALP (GCALP) (RASHIDA e IQBAL, 2014). Todas essas isoformas apresentam altos níveis de expressão em células cancerosas: TNALP foi identificada em metástases ósseas osteoblásticas (DEMERS, COSTA, *et al.*, 1995); PALP foi identificada em câncer de ovário, testículo, pulmão, mama, trato gastrointestinal e coriocarcinoma (NATHANSON e FISHMAN, 1971); IALP foi identificada no carcinoma hepatocelular e GCALP foi identificada no carcinoma testicular (RASHIDA e IQBAL, 2014).

1.3.2 Fosfatases ácidas

As fosfatases ácidas são enzimas que hidrolisam substratos fosforilados em ambientes ácidos (Figura 21). Cinco classes de enzimas foram relatadas em tecidos humanos (MOSS, RAYMOND e WILE, 1995). Na próstata humana, uma fosfatase ácida citosólica prostática (PacP) é relatada intracelularmente. No entanto, em pacientes com câncer de próstata avançado, foi identificada uma elevação da fosfatase ácida protática secretada (PAPsec), acompanhada por uma diminuição na expressão da isoforma citosólica. Ambas as formas são transcritas a partir do mesmo gene, mas possuem diferentes modificações pós-transcricionais (MUNIYAN, CHATURVEDI, *et al.*, 2013). Recentemente, um novo RNA mensageiro variante de PacP, denominado como proteína transmembrana tipo I com atividade de fosfatase extracelular (TM-PAP), foi identificado em vários tecidos, como cérebro, rim, fígado, pulmão, músculo, placenta, glândula salivar, baço, tireóide e timo (QUINTERO, ARAUJO, *et al.*, 2017). No entanto, nenhum trabalho buscou identificar essa enzima em células de câncer de mama.

1.3.3 Co-Relação das Ecto-Nucleotidases, Ecto-Fosfatases e Transporte de Pi

Décadas atrás, muitos estudos buscavam relacionar a importância das ecto-nucleotidases e ecto-fosfatases para a absorção dos produtos gerados por elas. Ao constatarem que havia uma alta expressão de fosfatase alcalina não específica em células epiteliais do intestino delgado de rato, identificaram inclusive a importância de ALP para hidrólise de 1-fosfato de glicose, o que gera glicose a ser transportada para as células (ROTHSTEIN, MEIER e SCHARF, 1953).

Em relação à absorção de Pi, em microrganismos como *Escherichia coli*, a baixa concentração extracelular de Pi induz um aumento da expressão de ecto-fosfatases. Sugere-se fortemente uma função dessas enzimas na disponibilidade do conteúdo de Pi (TORRIANI, 1960). Anos depois, foi demonstrado um aumento do Pi intracelular no intestino celular de galinhas e ratos quando adicionado um composto fosforilado (β -glicerofosfato). Essa ação sugere uma relação entre a atividade da fosfatase alcalina e a absorção de Pi (MOOG e GLAZIER, 1972). No entanto, uma vez que inibiu a fosfatase alcalina, nenhuma regulação dos níveis de Pi intracelular foi observada; mas a presença de outras atividades ecto-fosfatase não pode ser excluída (MOOG e GLAZIER, 1972). Nos últimos vinte anos, estudos que relacionam ectonucleotídeos e/ou ecto-fosfatases e transportadores de Pi têm se tornado escassos. Após a elucidação do sistema homeostático do Pi em humanos, novos estudos se voltaram para solucionar a estrutura do portador e sua relação com a fisiopatologia (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013).

O aumento da expressão de ecto-nucleotidases e ectofosfatases em tecidos tumorais tem sido principalmente associado à liberação de adenosina extracelular, como um agonista do receptor de adenosina (receptor P1), no qual desencadeia a sinalização envolvida com processos de proliferação e metástase (STAGG e SMYTH, 2010). Pouco se discute sobre a contribuição do Pi liberado pela hidrólise para esses tecidos tumorais, uma vez que (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017) mostraram que a concentração de Pi intersticial no tumor para aproximadamente 2mM pode ser uma consequência direta da alta hidrólise de ATP pelas células tumorais (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017). Portanto, mais estudos precisam ser feitos para relacionar a importância das ecto-nucleotidases e ecto-fosfatases para a liberação de Pi no ambiente tumoral e a possível regulação dessas enzimas de acordo com a concentração extracelular de Pi.

1.4 TRANSPORTADORES DE P_i E CÂNCER

Devido ao seu papel essencial na suplementação de nutrientes, o estudo dos transportadores de fosfato inorgânico da membrana plasmática na biologia do câncer tem recebido muita atenção nos últimos anos. Vários estudos sugerem que esses transportadores são regulados positivamente nas células tumorais e, portanto, têm sido considerados importantes promotores da progressão tumoral (BROWN e RAZZAQUE, 2018). Níveis de expressão alterados de NaPi-IIb (SLC34A2), PiT-1 (SLC20A1) e atividade de transporte de Pi sódio-independente foram demonstrados.

1.4.1 Transportadores de Pi sódio-dependente

1.4.1.1 Transportadores da família SLC20 em câncer

Poucos estudos têm relatado a importância dos transportadores SLC20 para o desenvolvimento do câncer. Apenas em relação do transportador PiT1, foi demonstrado em carcinoma cervical humano, com o uso de células HeLa, que as células silenciadas por PiT1 são mais sensíveis à apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*, 30% mais sensível que as células do tipo selvagem), independentemente do Pi extracelular e de sua atividade de transporte (SALAUN, LEROY, *et al.*, 2010). Em outro estudo, com o uso de células HeLa, o silenciamento de PiT 1 promoveu uma redução de cerca de 40% no número de células após 72 h de transfecção. No entanto, a perda da função da PiT1 por mutação pontual induzida foi capaz de resgatar a proliferação de células HeLa empobrecidas com PiT1 pelo silenciamento shRNA de PiT1. Isso mostra que o PiT1 (mas não o PiT2) é uma proteína crítica para a proliferação celular, independente da função de transporte do Pi (BECK, LEROY, *et al.*, 2009). Portanto, os dois estudos qualificam a função portadora PiT como um transceptor. Ou seja, as proteínas PiT podem desempenhar um papel na detecção de Pi e podem ser importantes para outras funções celulares, como a proliferação (SALAUN, LEROY, *et al.*, 2010); (BECK, LEROY, *et al.*, 2009) .

Em um estudo recente, três linhagens de glioblastoma tratadas com gefitinibe - um inibidor específico e reversível do receptor tirosina-quinase do fator de crescimento epidermal (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) - mostraram uma forte diminuição no transporte de Pi. O gefitinibe também promoveu uma inibição significativa na expressão do PiT1, em quase 40%. Isso provavelmente ocorreu devido à regulação da expressão de PiT1 pela sinalização de EGFR, que por sua vez está diretamente ligada à proliferação celular. Não foram realizadas experiências demonstrando como a sinalização de EGFR bloqueia a expressão de PiT1; percebe-se, com isso, que ainda há questões em aberto a serem discutidas no futuro (PUECH, PREVOT e PEREK, 2014).

1.4.1.2 Transportadores de Pi da família SLC34 em câncer

Vários estudos concentraram suas pesquisas apenas no transportador NaPi-IIb, precisamente porque ele é expresso em vários tecidos humanos, ao contrário do NaPi-IIa e NaPi-IIc, que são expressos apenas nos rins. No geral, observou-se que diversos tecidos tumorais apresentaram uma maior expressão desse transportador comparado com tecidos normais (Tabela 5).

Hong, Minais-Tehrani e colaboradores (2013) usaram aerossóis com RNA pequeno de interferência (siRNA, do inglês *small interference RNA*), direcionados contra NaPi-IIb que foram entregues aos pulmões de camundongos K-rasLA1. Os resultados mostraram reduções significativas no número e tamanho dos tumores pulmonares; níveis aumentados de proteína dos promotores de apoptose BAX (cerca de 2 vezes) e BAD (cerca de 2 vezes); diminuição dos níveis de expressão de PCNA (33% menor que o controle), uma proteína que regula a proliferação celular; e diminuição dos níveis de VEGF (55,5% menor que o controle), um potente regulador da angiogênese (Figura 22) (HONG, MINAIS-TEHRANI, *et al.*, 2013).

Tabela 5: Diferentes resultados observados dos transportadores de Pi em câncer.

Transportador de Pi	Tipo celular tumoral	Resultados observados em tecidos tumorais comparados com tecidos não tumorais	Referência
NaPi-IIb	Ovário	Altos níveis de expressão em células derivadas de câncer de ovário e tumores primários	(RANGEL, SHERMAN-BAUST, <i>et al.</i> , 2013)
NaPi-IIb	Tireóide	Altos níveis de expressão em tecidos de tumores da tireóide em pacientes	(JARZAB, WIENCH, <i>et al.</i> , 2005)
NaPi-IIb	Mama	Altos níveis de expressão em tumores mamários	(CHEN, CHIEN, <i>et al.</i> , 2010)
NaPi-IIb	Pulmão: células não pequenas	Baixos níveis de expressão em câncer de pulmão: células não pequenas em células <i>in vitro</i> : A549, H1299 e H460.	(WANG, YANG, <i>et al.</i> , 2015)
		Altos níveis de expressão em células CD166+ em amostras de pacientes	(JIANG, HAO, <i>et al.</i> , 2016)
NaPi-IIb	Rim	O gene SLC34A2 mostrou 66% no estado metilado em amostras de pacientes	(SOARES, SIMÕES, <i>et al.</i> , 2012)

A expressão do gene SLC34A2 aumentou significativamente no câncer de mama em comparação com os tecidos mamários normais adjacentes (tecidos normais: $6,71 \pm 0,77$; tecidos tumorais: $10,29 \pm 0,80$; $p = 0,001$). Além disso, houve um perfil de expressão semelhante para CA125 (tecidos normais: $7,26 \pm 0,62$; tecidos tumorais: $10,51 \pm 0,58$; $p < 0,0001$), um preditor de biomarcador; com isso, sugere que o SLC34A2 pode ser um novo marcador para o diagnóstico e terapia direcionada de câncer de mama (CHEN, CHIEN, *et al.*, 2010).

Mais recentemente, foi estudado o transporte de Pi sódio-dependente em linhagens de câncer de mama: MCF-7, T47-D e MDA-MB-231 (rever características dessas células na Tabela 1) (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). A linhagem mais invasiva e migratória das testadas (MDA-MB-231) apresentou um maior transporte (Figura 23 A).

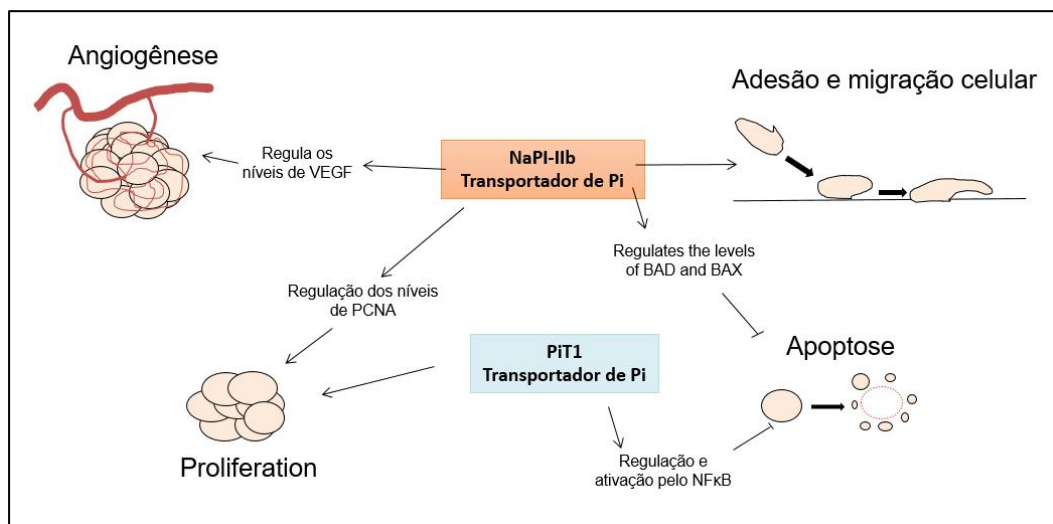


Figura 22: Ilustração dos possíveis papéis dos transportadores Pi nos processos tumorais. O PFA, um inibidor específico do transporte Pi dependente de sódio (NaPi-IIb), inibe a adesão celular e a migração na linhagem de câncer de mama (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). As células HeLa e HepG2 após o silenciamento de PiT1 reduziram a inibição da apoptose via NFκβ (SALAUN, LEROY, *et al.*, 2010) e a proliferação tumoral (BECK, LEROY, *et al.*, 2009). O uso de aerossóis com siRNA direcionado contra NaPi-IIb, que foram entregues aos pulmões de camundongos K-rasLA1, mostrou uma diminuição na proliferação celular pela redução dos níveis de PCNA, uma redução do regulador de angiogênese (VEGF) e um aumento dos níveis de apoptose promove (BAX e BAD) (HONG, MINAIS-TEHRANI, *et al.*, 2013).

Além disso, foi confirmado na linhagem MDA-MB-231 que, dentre a família dos transportadores SLC34, o NaPi-IIb apresenta um alto nível de expressão (Figura 23 B). Esse transportador foi caracterizado bioquimicamente e modulado por concentrações crescentes de Pi, seguindo a cinética de Michaelis-Menten com um valor de $K_m = 0,08$ mM Pi); por ser dependente de sódio, apresentou um K_m de 21,98 mM de NaCl para transportar Pi (Figura 23 C e D). Além disso, a inibição do transporte de Pi Na^+ -dependente pelo PFA levou à diminuição da migração e adesão de células tumorais em aproximadamente 50% (Figura 22) (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

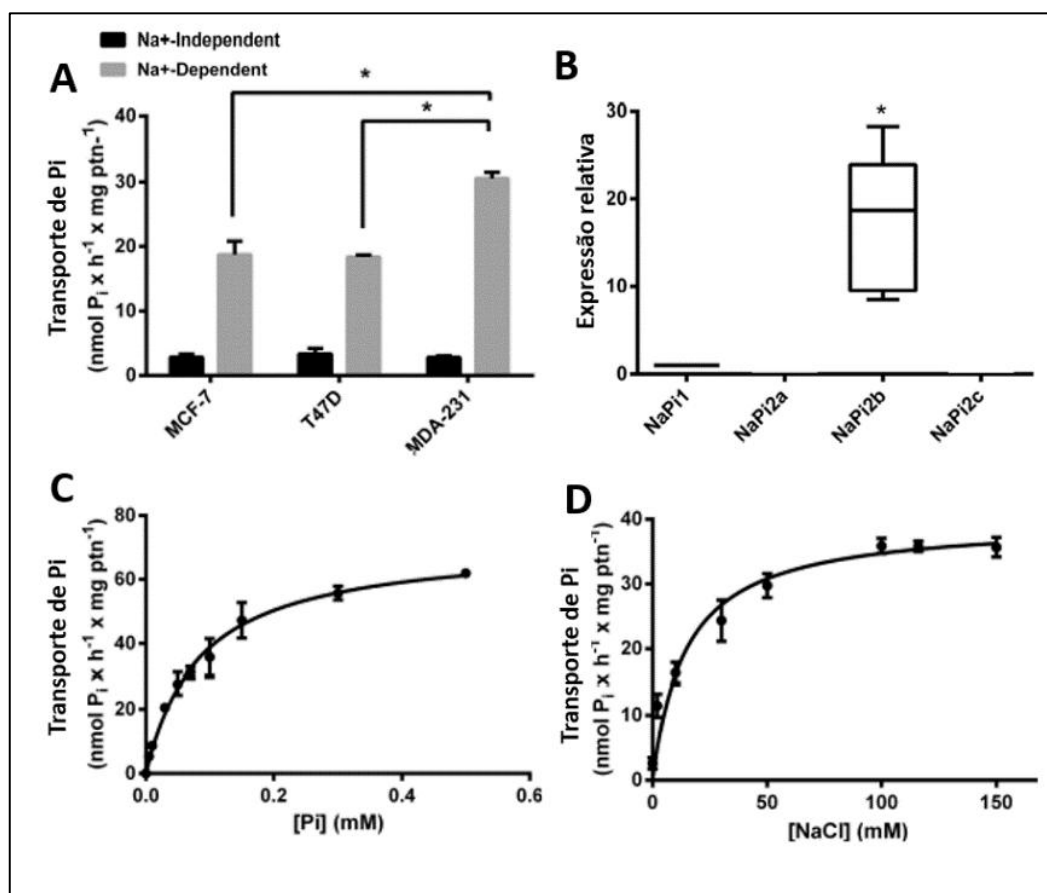


Figura 23: Caracterização do transporte de Pi sódio-dependente em células de câncer de mama. A) Linhagens subtipo luminal A (MCF-7 e T47-D) apresentaram menores níveis de transporte de Pi sódio-dependente (na presença de baixas concentrações de Pi, como 100 μ M), comparados com a linhagem triplo-negativa (MDA-MB-321); na ausência de sódio, níveis basais de transporte de Pi não apresentaram regulação entre as linhagens celulares. B) qRT-PCR foi feito para os genes: NaPi-1, NaPi2a, NaPi2b e NaPi2c na linhagem celular MDA-MB-231. C) Transporte de Pi em crescentes concentrações de Pi (0-0,5 mM Pi) ou D) e em crescentes concentrações de NaCl (0-150 mM NaCl). Para os gráficos C e D, os valores de transporte de Pi foram levados para equação Michaelis-Mentem para calcular valores de V_{max} e K_m . Todos esses gráficos foram extraídos e traduzidos de (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

Um outro grupo, ao utilizar a abordagem de citometria de fluxo com células de câncer de mama, mostrou que as células CD44⁺/CD24⁻ constituíam uma população de células com alto potencial de agressividade e exibiam quimiorresistência à doxorrubicina, utilizada na terapia do câncer de mama (GE, ZHOU, *et al.*, 2015). Essas populações de células apresentaram altos níveis de expressão de SLC34A2 e que, após silenciamento, causaram perda de quimiorresistência. Os autores propuseram um mecanismo regulador através do eixo SLC34A2-Bmi1-ABCC5 no qual a expressão do transportador ABC (ABCC5) se tornou suscetível ao fator de transcrição relacionado a células-tronco (Bmi1), modulado pelo transportador SLC34A2(Figura 24) (GE, ZHOU, *et al.*, 2015).

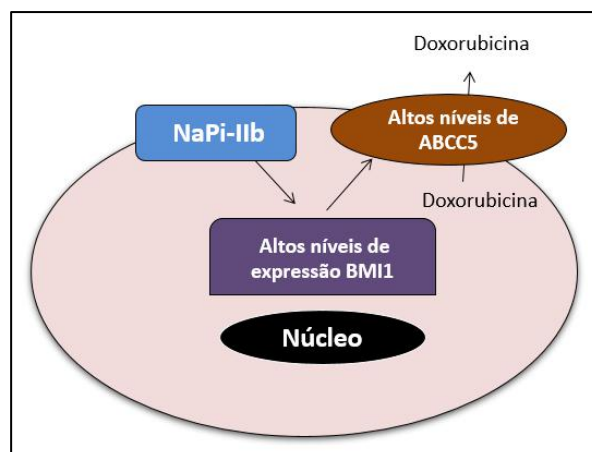


Figura 24: NaPi-IIb confere resistência a quimioterápicos em células de câncer de mama. A presença de NaPi-IIb, independente de sua atividade de transporte no câncer de mama, modula os níveis do fator de transcrição do IMC1, o que promove a regulação dos níveis de expressão do transportador ABCC5 (ABCC5), responsáveis pelo efluxo de doxorubicina (GE, ZHOU, *et al.*, 2015).

Portanto, o conjunto desses trabalhos mostra que o transportador Pi desempenha um papel importante na biologia do tumor, especificamente em relação ao câncer de mama. Além disso, o transportador de fosfato inorgânico pode ser usado como um alvo para agentes quimioterapêuticos, para investigações de mecanismos de resistência a medicamentos ou como um marcador molecular para o diagnóstico de pacientes com câncer.

1.4.2 Transportadores de Pi sódio-independente em células de câncer

Devido aos crescentes estudos dos transportadores de Pi independente de sódio em diversos processos fisiológicos e no desenvolvimento de doenças, também foi correlacionado e caracterizado o transporte de Pi Na^+ -independente para os processos tumorais. Nos tumores ascísticos de Ehrlich, foi demonstrado um transporte de Pi dependente de Na^+ como principal papel na manutenção da concentração intracelular de Pi. No entanto, um componente independente de Na^+ do transporte de Pi abrange por volta de 12% do fluxo total de Pi (BOWEN e LEVISON, 1986). Portanto, os processos de transporte Pi Na^+ dependente e o transporte de Pi Na^+ -independente parecem ser, pelo menos, entidades separadas.

Além disso, no mesmo trabalho, foi demonstrado que o H^+ estimulava o transporte $Pi Na^+$ -independente com uma cinética de saturação em relação a $[H^+]$. Os autores discutem que a estimulação por H^+ no transporte de $Pi Na^+$ -independente de Pi promove uma diminuição do pH intracelular (abaixo de cerca de 6,5). Eles observaram, inclusive, que a estimulação do transporte de $Pi Na^+$ -independente por H^+ inibe o transporte de $Pi Na^+$ -dependente, possivelmente pela interação do H^+ intracelular com um local intracelular que regula o transportador de $Pi Na^+$ -dependente (BOWEN e LEVISON, 1986).

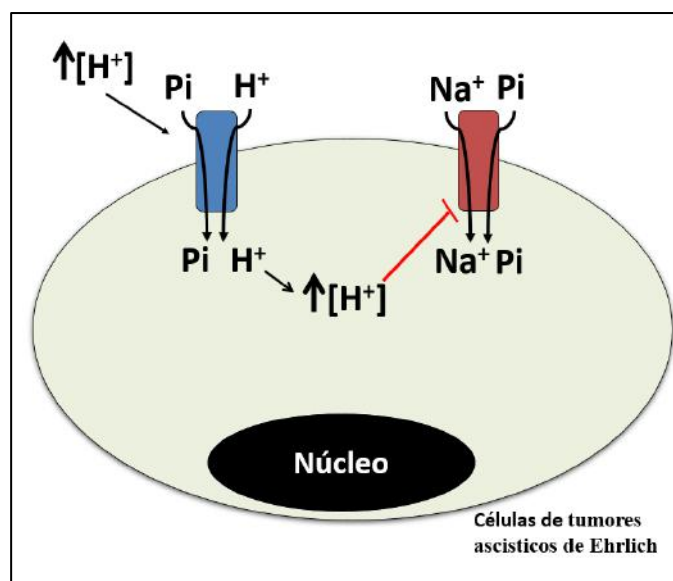


Figura 25: Sistema de transporte de Pi em células de tumores ascísticos de Ehrlich. O transporte de $Pi H^+$ -dependente é estimulado pelo aumento da concentração de H^+ , o pH intracelular aumenta com o aumento do transporte de Pi independente de sódio (ou H^+ -dependente). O aumento intracelular da concentração de H^+ interage com os aminoácidos do transportador de $Pi Na^+$ -dependente, de modo a inibir o transporte de Pi dependente de sódio. Setas pretas indicam estimulação ou aumento. Linhas vermelhas indicam inibição (BOWEN e LEVISON, 1986).

Em câncer de mama, ainda não foi mostrado o transporte de Pi independente de sódio. É possível inferir que haja um transporte de $Pi H^+$ -dependente, que transporte Pi em concentrações mais elevadas que o transporte de Pi dependente de sódio (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). Seria importante não só identificar esse transporte sódio-independente em células tumorais, como também caracterizar bioquimicamente esse transportador, pois no microambiente tumoral de mama, a concentrações de Pi pode elevar de 1 até 4 mM Pi (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017); (PAPALOUCAS, PAPALOUCAS, *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do fosfato inorgânico (Pi) extracelular nos processos metastáticos do câncer de mama, bem como os mecanismos de produção de Pi extracelular, os possíveis transportadores de Pi e as vias envolvidas transdução do sinal para o controle da metástase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

PARTE 1: Produção de Pi extracelular: participação das ecto-fosfatases além das ecto-nucleotidases.

- Verificar a atividade ecto-fosfatásica em diferentes células de câncer de mama comparada com células não-tumorais.
- Demonstrar possíveis substratos para a atividade ecto-fosfatásica comparada com as atividades ecto-nucleotidásicas.
- Correlacionar a atividade ecto-fosfatase com os processos tumorais metastáticos, bem como a migração e adesão celular.
- Investigar a participação da ecto-fosfatase como uma ecto-enzima importante para produção de Pi extracelular em câncer de mama, além das ecto-nucleotidases já descritas.

PARTE 2: Transportador de Pi H⁺-dependente: identificação e correlação com a metástase.

- Testar o transporte de Pi Na⁺-independente em células de câncer de mama comparadas com células não-tumorais.
- Avaliar o co-transporte de H⁺ para o transporte de Pi Na⁺-independente.
- Investigar uma possível associação entre o transporte de Pi H⁺-dependente e os processos metastáticos, bem como adesão, migração celular e a transição epitélio-mesenquimal.
- Verificar a influência do elevado Pi extracelular para o transporte de Pi H⁺-dependente e Na⁺-dependente.

PARTE 3: Transportador de Pi Na⁺-dependente: inibição pelo resveratrol e dessensibilização em alto Pi extracelular.

- Identificar uma possível regulação do resveratrol nos transportadores de Pi Na⁺-dependente e H⁺-dependente.
- Avaliar a atuação do resveratrol como um inibidor direto do transportador de Pi dependente de Na⁺.
- Avaliar a inibição do transportador de Pi Na⁺-dependente pelo resveratrol em alto Pi extracelular.
- Testar a inibição da adesão e migração celular pelo resveratrol, possivelmente relacionado com a inibição do transportador de Pi Na⁺-dependente.

PARTE 4: Transdução do sinal: geração de H₂O₂ como uma resposta subjacente ao alto nível de Pi extracelular

- Avaliar se o elevado Pi extracelular pode induzir a produção de H₂O₂ em células de câncer de mama.
- Investigar as possíveis fontes de geração de H₂O₂ em resposta ao elevado Pi extracelular.
- Demonstrar o efeito de alto Pi extracelular nos transportadores de Pi Na⁺-dependente e H⁺-dependente, na produção de H₂O₂, migração celular e adesão.
- Examinar a regulação dos transportadores de Pi (Na⁺-dependente e H⁺-dependente) e dos processos metastáticos mediados pelo H₂O₂.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Todos os reagentes foram adquiridos da E. Merck (Darmstadt, Alemanha), da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), da Thermo Fisher (Brasil) e da Cripion Biotechnology (Brasil). O fosfato inorgânico radioativo ($^{32}\text{P}_i$) foi adquirido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). A água destilada utilizada na preparação de todas as soluções foi deionizada com um sistema de resinas Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA).

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

Neste trabalho, foi utilizado o modelo celular *in vitro* de quatro linhagens de mama, com fenótipos diferentes. A linhagem epitelial não tumorigênica da mama humana (MCF10-A) e as linhagens de câncer de mama: a MCF-7 e a T47-D, que representam o subtipo molecular luminal A, e a linhagem MDA-MB-231, que representa o subtipo molecular do câncer de mama triplo negativo. Todas as linhagens de mama foram cultivadas em 37°C em 5% de CO₂. Todas as células foram genotipadas e foi feita a produção de um perfil que confirma a identidade delas em comparação com dados de ATCC, DSMZ, CLIMA e ICLAC. Neste projeto, geralmente após 20 passagens, foi iniciado o descongelamento de um novo *vial*.

3.2.1 Cultura das células não tumorigênicas

Origem da linhagem: A linhagem celular epitelial não tumorigênica da mama humana, MCF10-A, foi gentilmente fornecida pelo Prof. Jerson Lima da Silva, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Meio de crescimento: As células foram mantidas em meio DMEM-F12 (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) com a adição de 10% de soro fetal bovino (SFB, Cripion Biotechnology, Brazil), 10 µg/mL de insulina (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO), 20 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO), 0,5 µg/mL de hidrocortisona, pH 7,4 (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher, Brasil). O meio de cultura, após preparado, foi mantido por até 15 dias em 4°C. Após esse período, um novo meio com as respectivas adições foi preparado para ser utilizado durante a cultura de células.

Passagem de células: O cultivo foi feito em garrafas de cultura com uma área de superfície de 75 ou 175cm². Rotineiramente, a linhagem MCF10-A tem um crescimento mais lento quando comparada com células de câncer de mama: MCF-7 e MDA-MB-231 (Gráfico disponível em ANEXO I). Portanto, a concentração inicial de células partiu de 80x10⁴/mL (o dobro que é utilizado para células MCF-7, T47-D e MDA-MB-231). Durante 3-4 dias, as células com 80-90% de confluência foram soltas com tripsina (2.5 g/L, pH 7.2), numa proporção de volume por superfície de 0.01 mL/cm² por 20 minutos em 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, a suspensão foi misturada em DMEM/F12 com 10% de SFB, centrifugada em 1500 rpm, durante 5 minutos. Foi suspendida novamente com DMEM/F12 com 10% de SFB, com os hormônios de crescimento (insulina, EGF e hidrocortisona), com os antibióticos (penicilina e estreptomicina) e o número de célula foi reajustado seja para a preparação de um novo inóculo ou para plaqueamentos experimentais - geralmente nas seguintes proporções: 96 poços (1x10⁴ células/poço), 24 poços (5x10⁴ células/poço) e 6 poços (5x10⁵ células/poço).

3.2.2 Cultura das células de câncer de mama

Origem da linhagem: As linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Robson Queiroz Monteiro, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil. A linhagem de câncer de mama T47-D foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Biologia Molecular Tumoral, na época (2018), chefiado pelo professor Franklin Rumjanek (*in memoriam*).

Meio de crescimento: As células foram mantidas em meio IMDM (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) com a adição de 10% de SFB e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher, Brasil). O meio de cultura, após preparado, foi mantido por até 15 dias em 4°C. Após esse período, um novo meio, com as respectivas adições, foi preparado para ser utilizado durante a cultura de células.

Passagem de células: O cultivo foi feito em garrafas de cultura com uma área de superfície de 75 ou 175cm². A concentração inicial de células partiu de 40x10⁴/mL. Durante 3-4 dias, as células com 80-90% de confluência foram soltas com tripsina (2.5 g/L, pH 7.2), numa proporção de volume por superfície de 0.01 mL/cm² por 10 minutos em 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, a suspensão foi misturada em IMDM com 10% de SFB, centrifugada em 1500 rpm - durante 5 minutos - e suspendidas novamente com IMDM em 10% de SFB com os antibióticos (penicilina e estreptomicina). O número de célula foi reajustado seja para a preparação de um novo inóculo ou para plaqueamentos

experimentais, geralmente nas seguintes proporções: 96 poços (1×10^4 células/poço), 24 poços (5×10^4 células/poço) e 6 poços (5×10^5 células/poço).

3.2.3 Adição de Pi no crescimento das linhagens celulares de mama

As linhagens celulares de mama foram mantidas em meio IMDM ou DMEN-F12 e contêm aproximadamente 1 mM de Pi. Para concentrações maiores de Pi (2, 4 e 8 mM de Pi) foram adicionados por 1h ou 24h antes dos experimentos, 1, 3 e 7 mM de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) respectivamente (pH 7.4 ajustadas com HCl e NaOH, Sigma – Aldrich, St. Louis MO).

3.2.4 Adição de compostos químicos potencialmente farmacológicos no crescimento das células MDA-MB-231

O resveratrol (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) a uma concentração de estoque final de 10 mM. Os controles nos testes experimentais foram realizados na ausência ou presença de 1% de DMSO para garantir que o DMSO não induzisse citotoxicidade. PFA (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO), PAA (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO), NAC (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) e ortovanadato de sódio (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) foram diluídos em água, com concentração de estoque final de 100 mM; nestes casos, os controles dos testes experimentais foram realizados na ausência das drogas.

3.2.5 Lavagem de células antes dos testes experimentais

Antes dos testes experimentais, o meio de cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas duas vezes com tampão ausente de Pi, constituído por 116 mM de cloreto de sódio (NaCl), 5,4 mM de cloreto de potássio (KCl), 5,5 mM de glicose, 0,8 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2) e 50 mM de ácido 2- [4- (2-hidroxi)etil] piperazin-1-il] etanossulfônico (HEPES) em pH 7,2. Utilizou-se 100 μL para placas de 96 poços, 500 μL para placas de 24 poços e 2 mL para placas de 6 poços - mesmo volume equivalente para o meio de cultura. As células aderentes foram dissociadas após incubação a 37°C e CO_2 a 5% com uma solução de tripsina (2,5 g/L, pH 7,2, 0,01 mL/cm²). O número de células e a concentração de proteínas após o tratamento com Pi, NAC, PAA, PFA e ortovanadato de sódio, foram avaliados por contagem em uma câmera de Neubauer e dosagem colorimétrica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.2.6 Congelamento e descongelamento de células

Congelamento: A suspensão de células MCF10-A, MCF-7, T47-D e MDA-MB-231, seja em meio DMEN/12 (para MCF10-A) ou IMDM (MCF-7, T47-D e MDA-MB-231) com 10% de SFB, com uma densidade aproximadamente de 20×10^5 células/mL, foi centrifugada em 1500 rpm por 5 minutos, re-suspendida em SFB com 10% de DMSO e 1 mL foi aliqotado em tubos criogênicos com roscas de 2mL. Esses tubos foram submetidos a -4°C por 2 horas, depois foram submetidos a -80°C por 24 ou 48 h, para finalmente serem depositados no nitrogênio líquido (-200°C , aproximadamente).

Descongelamento: Os tubos criogênicos retirados do nitrogênio líquido foram submetidos a banho-maria de 30°C por 10 minutos e depois foram diluídos em 9 mL de meio DMEN/F12 ou IMDM com 10% de SFB para serem centrifugados em 1500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, as células foram re-suspendidas em seus respectivos meios de cultura, em garrafas de 25cm^2 à 37°C com 5% de CO_2 . Nas primeiras 12 h, o meio foi trocado por um novo, submetido ao mesmo processo após as 24 h do descongelamento. Pelo menos 8 dias foram esperados durante as passagens, para utilizar as células nos ensaios experimentais.

3.3 ATIVIDADE FOSFATÁSICA

A atividade da fosfatase foi determinada usando *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) como substrato pela medição da taxa de produção de *p*-nitrofenol (*p*-NP, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO). As células MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram submetidas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 em uma mistura de reação (0,1 ml) no qual continha NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, glicose 5,5 mM, HEPES 50 mM (pH 7,2) e MgCl 2 0,8 mM.

As reações foram iniciadas pela adição de 5mM *p*-NPP e o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços sem células. Após 60 min, as reações foram interrompidas pela adição de 0,2 ml de NaOH 1 N e os resultados foram determinados espectrofotometricamente a 425 nm. A atividade da fosfatase foi calculada por meio da subtração da hidrólise *p*-NPP inespecífica, medida na ausência de células. Para determinar a concentração do *p*-NP liberado, uma curva *p*-NP foi traçada e usada como padrão.

Também foram testados nucleotídeos (ATP, ADP e AMP, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) e fosfoaminoácidos (fosfotirosina, fosfotreonina, fosfoserina, Sigma –

Aldrich, St. Louis, MO) como possíveis substratos de ectofosfatase. Nestes casos, as atividades hidrolíticas foram analisadas espectrofotometricamente a 660 nm, medindo o Pi liberado desses substratos nas mesmas condições empregadas acima (FISKE e SUBBAROW, 1925). Como controle, foi analisada a hidrólise de *p*NPP pelo método de Fiske e Subbarow. Os valores obtidos para a atividade *p*NPP, que usaram ambos os métodos, foram idênticos.

3.4 PCR EM TEMPO REAL

O RNA total das células MDA-MB-231 foi purificado a partir do TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), conforme descrito no manual do fabricante. Após o tratamento do RNA com DNase I, um kit de síntese de fita (Invitrogen) foi usado para gerar o cDNA de comprimento total a partir de 1 µg de RNA total. qPCR foi realizada em StepONE Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) e utilizou um kit FastStart Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemanha).

Os dados de expressão do gene NaPi-IIb (primer sense: 5'-CCCAGCTTATAGTGGAGAGCTTC-3'; primer antisense: 5'-GCACCAAATCTTGACAAGACTCTTG-3') foram normalizados para uma referência endógena (β -actina, primer sense: 5'-TGACGTGACAAAG-3'; primer antisense: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'), conforme descrito anteriormente (LIU, ZHAO, *et al.*, 2015) e de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 TRANSPORTE DE P_i

As células MCF-10A, MCF-7, T47-D e MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera umidificadas de 5% de CO₂, por 1 h, em uma mistura de reação (0,5 mL) que continha NaCl 116 mM (transporte de Pi Na⁺-dependente) ou cloreto de colina 116 mM (transporte de Pi Na⁺-independente), 0,1 mM de fosfato monopotássico (KH₂PO₄, transporte de Pi de alta afinidade) ou 1 mM de KH₂PO₄ (transporte de Pi de baixa afinidade), 5,4 mM de KCl, 5,5 mM de glicose, 50 mM de HEPES em pH 7,2, MgCl₂ 0,8 mM e 2,5 µCi/nmol ³²Pi. As reações foram interrompidas e as células foram lavadas com 0,5 mL de uma solução salina de tampão fosfato (PBS) (pH 7,2) gelada. As células foram rompidas com 0,5 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) 0,1%. Estes Pi internalizados libertados por lise celular foram transferidos para um papel de filtro que foi então imerso em líquido de cintilação.

Paralelamente, o transporte de Pi foi realizado a 4°C como controle (valores em branco) (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

3.5.1 Transporte de Pi sódio-dependente

Para determinar a atividade de transporte de Pi Na⁺-dependente de alta afinidade, uma baixa concentração de Pi (0,1 mM de KH₂PO₄) foi usada na mistura de reação e os valores de transporte de Pi na presença de NaCl foram subtraídos dos valores de transporte de Pi na presença de cloreto de colina. Obteve-se, assim, apenas a fração de transporte de Pi estimulada por NaCl.

3.5.2 Transporte de Pi próton-dependente

Para determinar o transporte Pi de baixa afinidade e dependente de H⁺, uma maior concentração de Pi, KH₂PO₄ de 1 mM (10 vezes mais concentrado que o Pi para o transporte de Pi Na⁺-dependente) foi usado na mistura de reação e NaCl foi substituído por cloreto de colina, em que se obtêm valores de transporte de Pi mesmo na ausência de NaCl, ou seja, um transporte de Pi Na⁺-independente.

3.6 ATIVIDADE NA⁺-K⁺-ATPASE E NA⁺-ATPASE

A atividade Na⁺/K⁺ ATPase foi medida em uma mistura de reação que consistia em HEPES-Tris 20 mM (pH 7,2), MgCl₂ 10 mM, NaCl 120 mM, 30 mM KCl, ATP 5 mM e [γ ³²P] ATP (com atividade específica de aproximadamente 0,25 μ Ci /nmol ATP) em um volume final de 0,1 mL.

Para avaliar a atividade da Na⁺-ATPase, foi utilizada uma mistura de reação que consiste de HEPES-Tris 20 mM (pH 7,0), MgCl₂ 10 mM, 5 mM ATP, [γ ³²P] ATP (0,25 μ Ci/nmol ATP) e NaCl 120 mM.

Para ambos os testes, a reação foi iniciada pela adição de lisado celular (0,5 mg de proteína/mL) e interrompida após 60 min pela adição de 1,0 mL de carvão 25% gelado em HCl 0,1 M (BRADFORD, 1976). Os tubos foram centrifugados a 1500 g, durante 10 min a 4°C. Para evitar contaminação por fosfato inorgânico, a suspensão de carvão foi lavada pelo menos 20 vezes com HCl 0,1 N antes de ser usada. Alíquotas (0,5 mL) do sobrenadante que contém o ³²Pi liberado, foram transferidas para frascos. A quantidade de ³²Pi liberada foi medida usando um contador de cintilação.

A atividade Na⁺/K⁺ATPase foi calculada como a diferença entre a quantidade de ³²Pi liberado na ausência e presença de ouabaína 2 mM, enquanto a atividade da Na⁺-ATPase foi determinada na ausência e presença de furosemida 1 mM (DE ALMEIDA-

AMARAL, CARUSO-NEVES, *et al.*, 2007) (ROCCO-MACHADO, COSENTINO-GOMES e MEYER-FERNANDES, 2015) (CARUSO-NEVES, MEYER-FERNANDES, *et al.*, 1988).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DO pH INTRACELULAR

Para analisar as mudanças no pH intracelular (pHi) após o influxo de Pi, células MDA-MB-231 (1×10^4 células/poço em placa de 96 poços) foram lavadas três vezes em solução tampão, que contém NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, glicose 5,5 mM, 0,8 MgCl₂ mM, HEPES 50mM (pH 7,2) e incubadas por 30 min com BCECF-AM 6 μ M (Thermo Fisher). As células foram lavadas para remover o excesso de BCECF-AM extracelular.

As alterações do pH intracelular foram quantificadas em um leitor de placas múltiplas VICTOR com comprimentos de onda de excitação e emissão de 500 e 550 nm, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. O pHi foi medido em intervalos de 2 minutos após a adição de KH₂PO₄ 1 mM. Em condição controle, o mesmo volume do KH₂PO₄ foi substituído por água. As medições do tempo 0 foram realizadas imediatamente antes da adição de 1mM de KH₂PO₄. A razão da fluorescência para a emissão de excitação foi convertida para valores de pH, usando o método de alto K⁺ induzido por nigericina (THOMAS, BUCHSBAUM, *et al.*, 1979).

3.8 IMAGEM DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células de câncer de mama MDA-MB 231 (5×10^4) foram tratadas ou não com PAA 1 mM por 24 h em placas de 24 poços. Elas foram então lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 24 h.

As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS por 5 min em locais inespecíficos e foram bloqueados em PBS-BSA a 5% por 2 h. As amostras foram então incubadas a 4°C durante a noite com anticorpos de camundongo anti-vimentina (1: 100; DAKO clone V9) ou camundongo anti-E-caderina (1: 100; BD610182).

Após lavagem extensa, as amostras foram coradas com anticorpo secundário IgG *anti-rabbit* (H + L) conjugado com Alexa Fluor®- 594 (1: 500; Molecular Probes A11032) por 1 h em temperatura ambiente e extensivamente lavadas.

As lâminas foram montadas usando ProLong® Gold Antifade Mountant com DAPI. As imagens foram coletadas utilizando confocal LSM 710 de alta resolução, equipado com sistema Elyra PS.1 e câmera sCMOS-pco (ZEISS). As imagens foram analisadas pelo software ZEN lite blue edition (ZEISS). As intensidades de

fluorescência foram quantificadas pelo software Image J como o pixel de intensidade de coloração vermelha por célula (de 10 células para cada condição experimental). A significância estatística da quantificação foi analisada aplicando o teste t não-pareado.

3.9 PRODUÇÃO DE H₂O₂

A liberação de H₂O₂ produzida pelas linhagens de células mamárias foi determinada pelo método fluorométrico de oxidação Amplex red (Invitrogen) (VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2004).

Células MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231 (1×10^6 células/mL) foram adicionadas a um meio de reação contendo PBS com adição de glicose 5 mM, Amplex red 10 μ M e peroxidase de raiz forte (HPR) 0,1 U/mL em um volume final de 0,2 mL.

A fluorescência foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 ± 5 nm e 587 ± 5 nm por 30 min. A concentração de H₂O₂ foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de H₂O₂.

3.10 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O potencial da membrana mitocondrial foi analisado nas células MDA-MB-231 usando o kit de ensaio MitoProbe JC-1 (Molecular Probes). Células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) foram submetidas a 100 nM de JC-1 e incubadas a 37°C por 15 min, seguido por uma lavagem com PBS (NGUYEN, QUAN, *et al.*, 2015).

A razão da intensidade de fluorescência do vermelho (excitação de 540 nm e emissão de 590 nm) em relação ao verde (excitação de 490 nm e emissão de 540 nm) foi monitorada com a utilização de um leitor de fluorescência de múltiplos poços.

3.11 TAXAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO

As taxas de consumo de O₂ foram avaliadas em células MDA-MB-231 (1×10^6 células/mL) por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2K; OROBOROS Instruments, Innsbruck, Áustria) em um volume final de 2 mL de meio IMDM. A temperatura foi mantida a 37 ° C, a mesma da condição de crescimento. A capacidade máxima e o vazamento de prótons foram obtidos na presença de 1 μ M de FCCP e 2,6 nM de oligomicina, respectivamente. Para determinar os níveis de respiração associado a síntese de ATP, os níveis basais foram subtraídos dos valores na presença de oligomicina 2,6 nM.

3.12 CONTEÚDO DE ATP INTRACELULAR

O conteúdo de ATP intracelular foi quantificado nas células MDA-MB-231 com a utilização do kit de ensaio de células somáticas bioluminescente 5'-trifosfato de adenosina (ATP) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) plaqueadas em 24 poços foram preparadas por meio da adição de 0,1 mL de ATP de células somáticas, liberando reagente em placas de 24 poços colocadas em gelo por 10 min. Em seguida, os extratos celulares foram transferidos para minitubos MTS-11C (Axygen) contendo 0,1 mL da mistura de ensaio de ATP e misturados por 10 s.

A quantidade total de luz emitida foi medida com um sistema de detecção GloMax Multi JR (Promega). A concentração total de ATP intracelular por número de células foi calculada usando uma curva de ATP padrão preparada e analisada em cada experiência.

3.13 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

As células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 (1×10^4 células por poço) foram crescidas em placas de 24 poços. Após 12 h, as células foram incubadas em diferentes condições (especificado nas legendas das figuras) por mais 6, 12, 24, 48 e 72 horas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Para medições do conteúdo celular, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas e quantificadas, usando uma câmara de Neubauer.

A viabilidade das células MCF-10A, T47-D, MCF-7 e MDA-MB-231 foram testadas usando um kit de ensaio de proliferação CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio (MTS) foram usados em combinação com metossulfato de fenazina, um acoplamento de elétrons reagente para gerar uma reação de formazan. A quantidade de produto formazan liberado no sobrenadante foi medida por um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 490 nm. A quantidade de formazan liberada no sobrenadante é diretamente proporcional ao número de células viáveis e os valores foram convertidos em porcentagem em relação ao controle.

3.14 ADESÃO CELULAR

O gel de matriz extracelular, obtido a partir de células de sarcoma de rato diluídas em PBS (32 µg/mL), foi usado para pré-revestir cada poço de uma placa de cultura de 96

poços mantida por 12 h a 4 ° C e depois bloquear com 1 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*). As células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 ($2,5 \times 10^4$ células/100 μ L), suspensas em meio sem soro, foram adicionadas a cada poço e mantidas a 37° C e em 5% de CO₂ por 24 h. Após este período de incubação, as células não aderentes conseqüentemente foram descartadas após as duas lavagens com PBS e fixadas com paraformaldeído a 3% por 10 min. As células fixas foram então lavadas com PBS duas vezes, coradas com violeta de cristal a 0,5% por 5 min e lavadas 2x com PBS. Finalmente as células lavadas foram rompidas com ácido acético (1% em etanol). Os lisados celulares foram lidos espectrofotometricamente a 570 nm e expresso graficamente. Em alguns experimentos com duas condições apenas para comparar, os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (BUCHEGGER, LLI, *et al.*, 2016).

3.15 MIGRAÇÃO CELULAR

Placas Corning Transwell© de 24 poços com suportes permeáveis e *insets* de 6,5 mm e poros de membrana de polycarbonato de 8,0 μ m foram utilizadas para os ensaios de migração. As células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) foram suspensas em meio sem soro mantido a 37°C e 5% de CO₂ por 24 h. Após a incubação, as células que não migraram para o compartimento inferior foram removidas com um cotonete; já as células migradas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 100% de metanol e coradas por 15 min em solução de violeta de cristal (0,5% de violeta de cristal em 25% de metanol / PBS).

Neste trabalho, dois tipos de quantificações de migração celular foram utilizados: pelo método colorimétrico do lisado celular ou por número de célula. No método colorimétrico, as células lavadas foram rompidas com ácido acético (1% em etanol), lidos espectrofotometricamente a 570 nm e expressos graficamente. Em alguns experimentos com duas condições apenas para comparar, os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. No método de quantificação por número de células, as células migradas na membrana inferior após fixadas, coradas e lavadas foram analisadas no microscópio de campo claro e cinco campos aleatórios em cada inserção foram fotografados com uma ampliação de 20 \times . A quantificação é expressa como a porcentagem da área coberta com células migradas, determinada usando o software ImageJ; os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (Wayne Rasband, National Institute of Health) (BUCHEGGER, LLI, *et al.*, 2016).

3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os casos, pelo menos três experiências independentes foram realizadas em triplicata. Os valores apresentados em todas as experiências representam a média \pm SE. A significância de qualquer diferença em cada parâmetro entre os grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA) unilateral e teste de comparações múltiplas de Tukey ou teste-*t* Student. Os critérios de significância estatística foram $p < 0,05$ (representado por *), a menos que especificado de outra forma nas legendas das figuras.

Os parâmetros cinéticos (valores aparentes de K_m e V_{max}) foram calculados usando a análise de dados de regressão não-linear para a equação de Michaelis-Menten. A análise de regressão linear dos gráficos de Lineweaver-Burk também foi determinada.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PARTE 1: PRODUÇÃO DE PI EXTRACELULAR NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA: PARTICIPAÇÃO DAS ECTO-FOSFATASES

Ecto-fosfatases são enzimas ligadas à membrana cujos sítios ativos estão voltados para o ambiente externo e a remoção de grupos fosfatos de vários substratos fosforilados (FREITAS-MEQUISA e MEYER-FERNANDES, 2014). Embora conhecidas, as fosfatases não foram bioquimicamente caracterizadas em células cancerosas, e é possível que as ecto-fosfatases sejam responsáveis pela liberação de Pi no microambiente tumoral.

4.1.1 Fosfatases extracelulares em linhagens celulares de mama

A remoção de grupos fosfatos de substratos fosforilados extracelulares podem ser catalisados por fosfatases solúveis secretadas ou por fosfatases transmembranas com o sítio catalítico voltado para o ambiente extracelular (ecto-fosfatase) (ZIMMERMANN, 2009). Portanto, o primeiro passo foi investigar as atividades da fosfatase secretada e ecto-fosfatase em células epiteliais da mama humana (MCF-10A) e células de câncer de mama MCF-7 (Luminal A) e MDA-MB-231 (CMTN). A atividade da ecto-fosfatase foi maior nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, no entanto, foi mais proeminente na linhagem celular MDA-MB-231 (Figura 26 A).

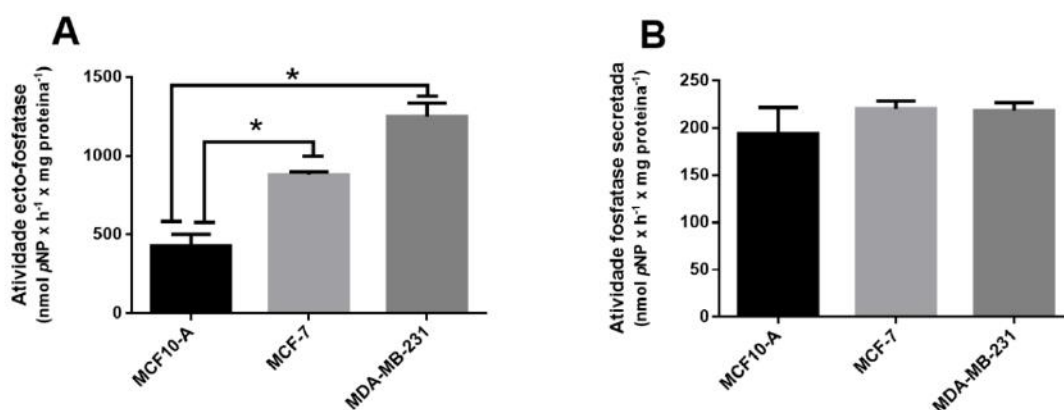


Figura 26 - Fosfatases extracelulares em linhagens de células mamárias. (A) Para avaliar a atividade da ectofosfatase, as células da mama (5×10^4 células / poço = 14,5 mg de proteína / ml) foram incubadas a 37°C em uma mistura de reação contendo NaCl 116 mM, glicose 5,5 mM, KCl 5,4 mM, HEPES 15 mM (pH 7,2), MgCl_2 0,8 mM e para-nitrofenilfosfato (pNPP) 5 mM por 60 min. (B) Para a fosfatase secretada, uma mistura de reação sem pNPP foi pré-incubada por 60 min, e 5mM pNPP foi adicionado ao sobrenadante livre de células. Os dados são as médias \pm SE de três experiências com diferentes suspensões de células. pNP, p-nitrofenol. * denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) de MCF10-A, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Para investigar a possibilidade de o p-NPP ser hidrolisado por enzimas solúveis secretadas, as células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram incubadas na ausência

de *p*-NPP. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas para remover as células e os sobrenadantes foram avaliados quanto à atividade de fosfatase. Não foram observadas diferenças na atividade de fosfatases secretadas entre as linhagens de células da mama (Figura 26 B).

Com base nesses resultados iniciais, foi optado por concentrar os estudos especificamente na linhagem MDA-MB-231. Nessas células, a atividade da fosfatase secretada não está relacionada à atividade da ectofosfatase ligada à membrana. O tartarato, um inibidor específico da atividade da fosfatase secretada (DUTRA, RODRIGUES, *et al.*, 1998) (SANTOS, SOUTO-PADRÓN, *et al.*, 2002) (VANNIER-SANTOS, MARTINY, *et al.*, 1995), inibiu fortemente a atividade da fosfatase secretada (Figura 27 A) e não teve efeito sobre a atividade ecto-fosfatase (Figura 27 B).

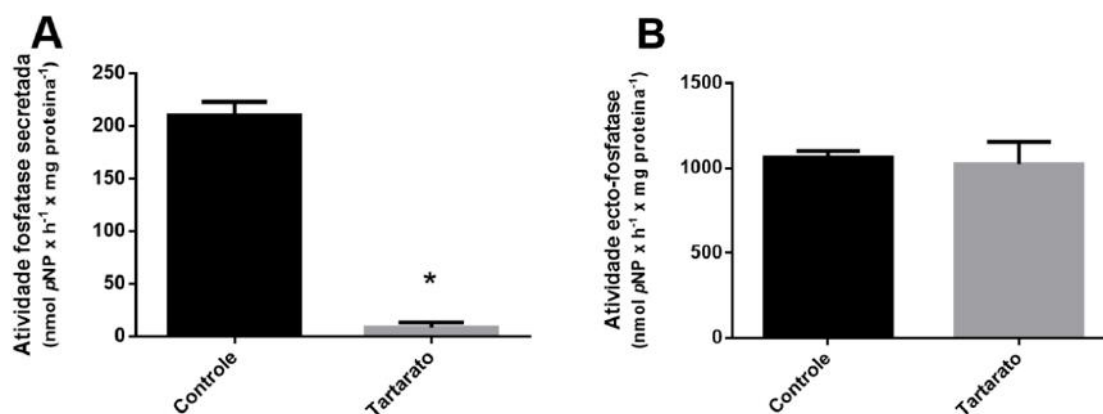


Figura 27 - Influência do tartarato nas atividades da fosfatase secretada e ectofosfatase. Células intactas (5×10^4 células / poço = 1,45 mg de proteína / ml) foram incubadas a 37 ° C. (A) Para a fosfatase secretada, uma mistura de reação sem para-nitrofenilfosfato (pNPP) foi pré-incubada por 60 min, e 5mM *p*NPP foi adicionado ao sobrenadante livre de células na ausência (controle) ou presença de tartarato (10 mM). (B) A atividade da ectofosfatase foi medida em uma mistura de reação, conforme descrito na Figura 1, na ausência (controle) ou na presença de tartarato (10 mM). *p*NP, p-nitrofenol. * denota diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle usando o teste de comparações teste-*t* Student..

4.1.2 Características cinéticas, inibidores e possíveis substratos

No intuito de analisar as características cinéticas da atividade ecto-fosfatásica em células MDA-MB-231, observou-se que ao longo do tempo a ecto-fosfatase foi linear até 1 hora, tempo fixo utilizado ao longo dos ensaios de atividade ecto-fosfatásica (Figura 28 A). A atividade da ecto-fosfatase foi examinada na presença de *p*-NPP em uma faixa de concentração de 0-15 mM (Figura 28 B). A atividade enzimática seguiu a cinética de Michaelis-Menten, mostrando um aparente $K_m = 4,5 \pm 0,5$ mM *p*NPP e $V_{max} = 2280 \pm 158$ nM \times h⁻¹ \times mg de proteína⁻¹. Uma análise de regressão linear de Lineweaver-Burk (Figura 28 B *inset*) confirmou que a atividade ectofosfatásica seguiu a cinética de Michaelis-Menten.

A atividade ecto-fosfatásica foi avaliada em diferentes faixas de pH (5,0–8,0). Os resultados na Figura 28 C mostram que a atividade ecto-fosfatásica mais alta ocorreu em condições de pH mais ácidas. Em todas as faixas de pH testadas, a viabilidade das células MDA-MB-231 não foi afetada (Figura 28 D).

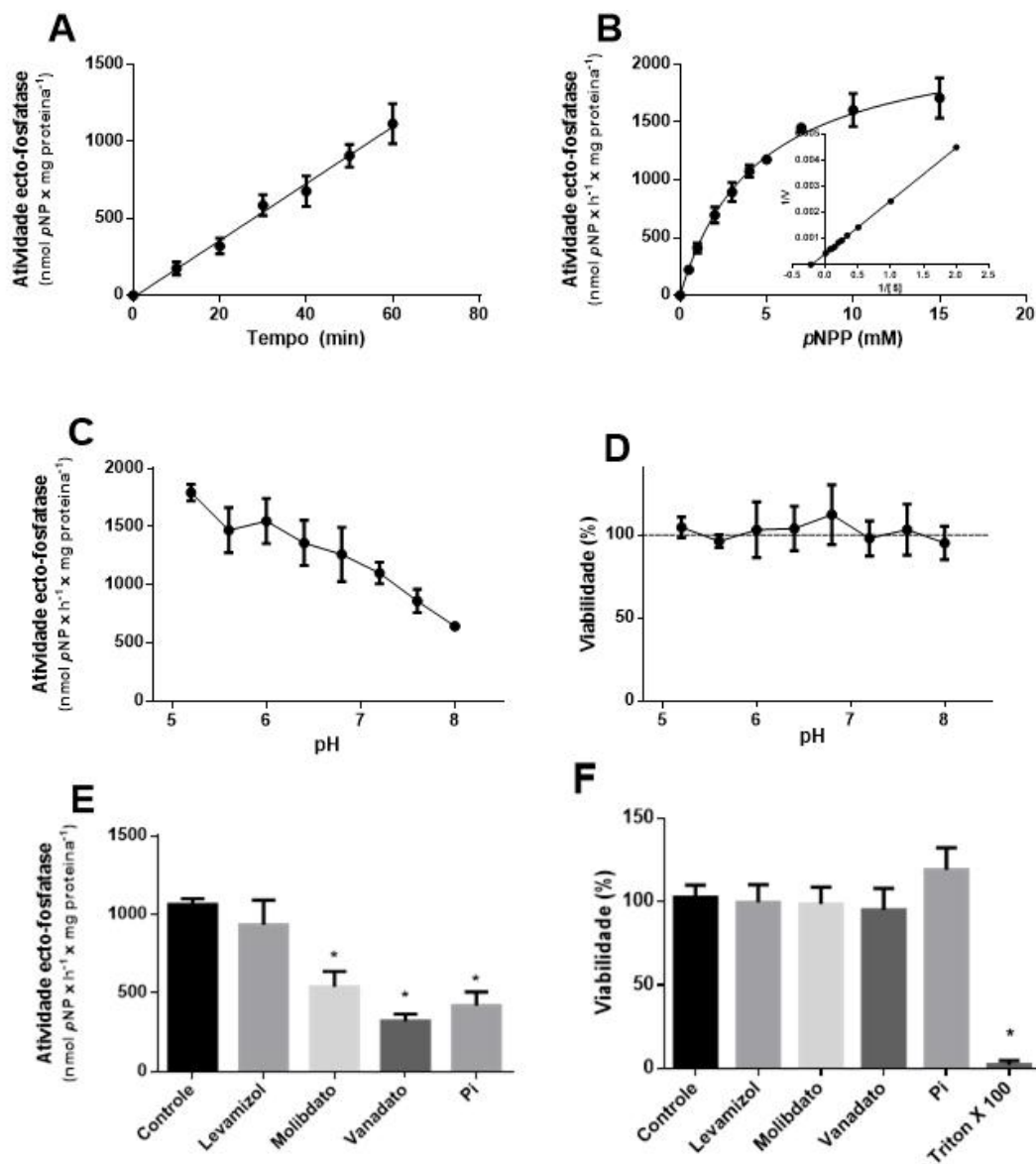


Figura 28 - Características cinéticas e teste de inibidores na atividade ecto-fosfatásica. Células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína/ml) foram incubadas a 37°C, e a atividade ectofosfatásica foi medida em uma mistura de reação conforme descrito na Figura 1 (A) com concentrações crescentes de para-nitrofenilfosfato (*p*-NPP; 0-10 mM). (B inset) Regressão linear de Lineweaver-Burk para concentrações de *p*NPP entre 0,5 e 10mM. (C) Os valores de pH foram ajustados de 5,0 a 8,0 usando acetato de magnésio 15mM, HEPES 15mM, Tris 15mM e MES 15mM. (D) Nessas faixas de pH, as células permaneceram viáveis ao longo do experimento. (E) Atividade ecto-fosfatásica na presença de levamisol 1 mM, tartarato de sódio 10 mM, amônio 1 mM molibdato, ortovanadato de sódio 1 mM e fosfato inorgânico 10 mM (Pi). (F) Nestas condições, as células permaneceram viáveis ao longo da experiência. Todos os dados mostrados são as médias \pm SE de três experiências com diferentes suspensões celulares, *p*NP, *p*-nitrofenol. * denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Os inibidores da fosfatase clássicos foram testados na atividade ecto-fosfatásica. O levamisol, um inibidor da fosfatase alcalina, não teve efeito sobre a atividade da ectofosfatase (Figura 28 E). O molibdato de amônio (um inibidor da fosfatase ácida) e o ortovanadato de sódio (um inibidor ácido da tirosina-fosfatase) promoveram uma redução significativa na atividade da ectofosfatase (Figura 28 E). Todos esses resultados sugerem que a atividade ecto-fosfatásica trata-se de uma ecto-fosfatase ácida. Em todas as condições testadas, os inibidores não diminuíram a viabilidade das células MDA-MB-231 (Figura 28 F).

O efeito do ortovanadato de sódio na hidrólise de nucleotídeos extracelulares também foi testado, e ATP, ADP e AMP foram usados como substratos. No entanto, apenas a hidrólise de *p*-NPP foi inibida (Tabela 6). Esses resultados excluem a noção de que a hidrólise de nucleotídeos está associada à atividade ectofosfatase em células MDA-MB-231.

Tabela 6: Hidrólise de *p*-NPP, ATP, ADP e AMP na presença ou ausência de ortovanadato de sódio.

Substrato	Atividades específicas (nmol Pi x h ⁻¹ x mg proteína ⁻¹)	
	Controle	Ortovanadato de sódio (1 mM)
<i>p</i>-NPP 5 mM	1378.1 ± 27.8	210.8 ± 15.7 *
ATP 5 mM	1474.5 ± 94.9	1424.3 ± 133.0
ADP 5 mM	764.2 ± 54.5	750.18 ± 118.4
AMP 5 mM	23031.8 ± 209.6	23221.2 ± 425.5

Os dados são médias ± SE de três experiências com diferentes suspensões de células. * denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Para clarificar os possíveis substratos da atividade ecto-fosfatásica, a fosfotirosina, fosfoserina e fosfotreonina foram hidrolisadas pela ectofosfatase em células MDA-MB-231. No entanto, semelhante ao *p*-NPP, apenas a hidrólise da fosfotirosina foi inibida pelo ortovanadato de sódio, sugerindo uma contribuição de pelo menos duas ectofosfatases (Figura 29 A). Para testar esta hipótese, a hidrólise de *p*-NPP foi medida na presença de diferentes concentrações de fosfoaminoácidos. Conforme mostrado na Figura 29 B, apenas a fosfotirosina foi capaz de inibir significativamente a hidrólise de *p*-NPP. Estes resultados sugerem que a fosfoaminoácidos, mais fortemente a fosfotirosina, podem ser substratos para a atividade ecto-fosfatásica em células MDA-MB-231, além do composto artificial *p*NPP.

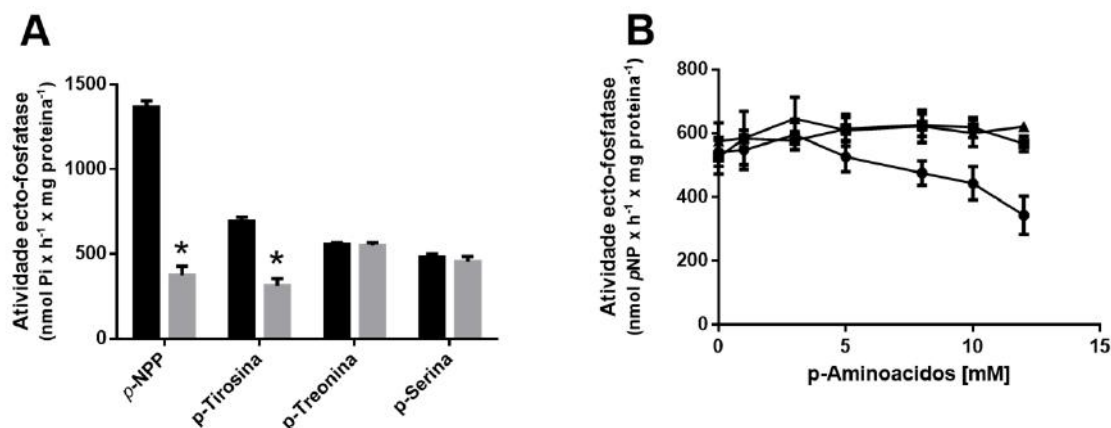


Figura 29 - Especificidade de substrato para atividade ecto-fosfatásica. (A) Células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína/mL) foram incubadas a 37°C. A atividade da ecto-fosfatásica foi medida no meio de reação, conforme descrito na Figura 1, na ausência (barras pretas) ou na presença de ortovanadato de sódio 1 mM (barras cinza) e com 5mM de um dos seguintes substratos: p-nitrofenilfosfato (p-NPP), fosfotirosina (p-Tyr), fosfotreonina (p-Thr) ou fosfoserina (p-Ser). (B) A influência do aumento das concentrações de fosfoaminoácidos (0-12 mM) na hidrólise de 1mMp-NPP; p-Tyr (círculo preto), p-Ser (quadrado preto) e p-Thr (triângulo preto). Os dados são as médias \pm SE de três experiências com diferentes suspensões de células. * denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey. pNP, p-nitrofenol.

4.1.3 Relação da ecto-fosfatase com processos tumorais

Tendo em vista que fosfoaminoácidos são substratos para atividade ecto-fosfatásica, sugere que essa enzima pode participar no processo de obtenção de Pi, liberando Pi livre no micrombiente tumoral, auxiliando nos processos de metástases e proliferação. O inibidor da ecto-fosfatase, ortovanadato de sódio, foi adicionado ao meio de crescimento das células MDA-MB-231. O número de células e a viabilidade foram monitorados por um período de 0-72 h. O ortovanadato de sódio foi capaz de inibir aproximadamente 90% da proliferação celular (Figura 30 A e B).

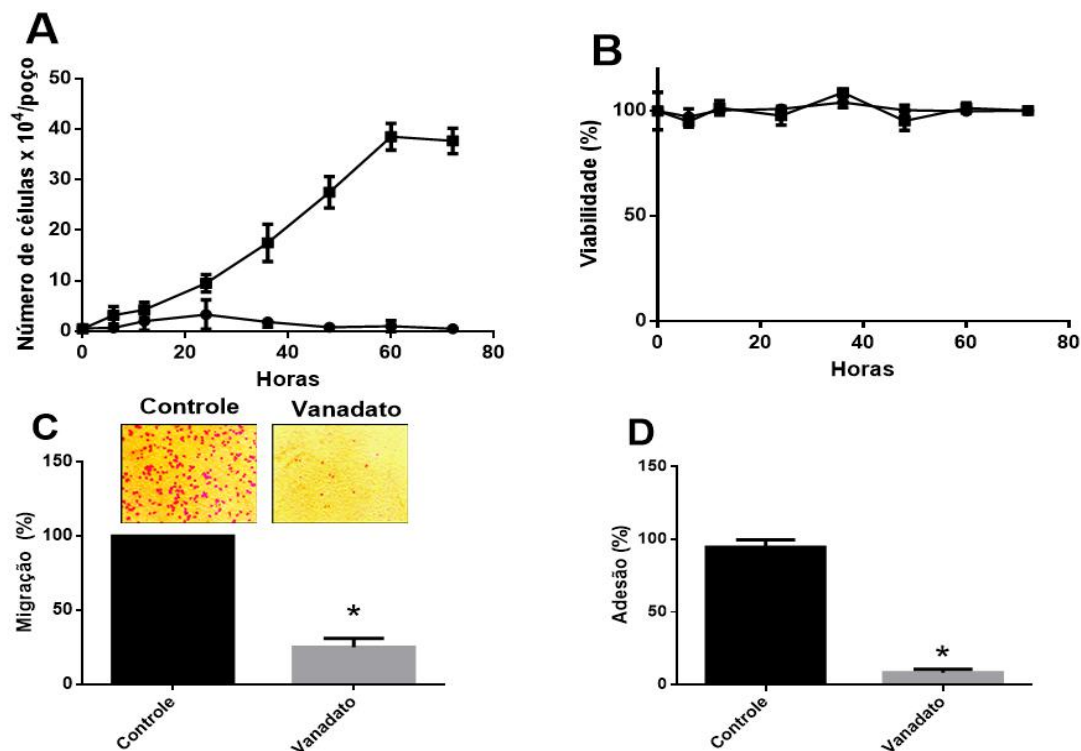


Figura 30 - Efeito do ortovanadato de sódio na proliferação, adesão e migração celular. A) Células MDA-MB-231 (1×10^4 células/poço) foram mantidas na ausência (círculos pretos) ou presença de ortovanadato de sódio 1mM (quadrados pretos) e foram quantificadas em um intervalo de 0h até 72 h usando uma câmara de Neubauer. B) Nestas condições, as células permaneceram viáveis ao longo da experiência. C) A migração das células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) foi avaliada após o pré-tratamento por 60 min na presença ou ausência de ortovanadato de sódio (vanadato 1 mM). Micrografias representativas de ensaios de migração transwell foram selecionadas para mostrar cada condição (ampliação de $20 \times$). D) A adesão das células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) foi avaliada após o pré-tratamento por 60 min na presença ou ausência de ortovanadato de sódio (vanadato 1 mM). Os dados são as médias \pm SE de três experimentos com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Foi analisado também o efeito do ortovanadato de sódio na migração e adesão celular. O ortovanadato de sódio reduziu significativamente a capacidade migratória em aproximadamente 70% (Figura 30 C). No caso de adesão celular, o ortovanadato de sódio induziu uma redução de 90% na capacidade das células MDA-MB-231 de aderir a uma matriz extracelular (Figura 30 D).

4.2 PARTE 2: TRANSPORTADOR DE P_i H^+ -DEPENDENTE: IDENTIFICAÇÃO E UMA CORRELAÇÃO COM A METÁSTASE.

O P_i gerado pelas ecto-nucleotidases e ecto-fosfatases pode ser internalizado pelos transportadores de P_i . Já foi demonstrado em células de câncer de mama (MDA-MB-231) a caracterização bioquímica do transportador de P_i Na^+ -dependente com um componente cinético de alta afinidade ($K_m = 0,08$ mM P_i) dependente de sódio (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi identificado e

analisado o nível de transporte de Pi H⁺-dependente, ensaiado na ausência de sódio, com uma concentração de Pi usada nos ensaios dez vezes mais concentrada (Pi 1 mM) do que a utilizada nos ensaios do transporte de Pi Na⁺-dependente (Pi 100µM) em células de câncer de mama. Portanto, nas condições do transporte de Pi H⁺-dependente, se houver alguma contaminação de Na⁺, o componente cinético do transporte de Pi Na⁺-dependente estaria saturado.

4.2.1 Transporte de Pi H⁺-dependente em diferentes linhagens celulares de mama

Uma linhagem celular não tumorigênica (MCF-10A) e três linhagens celulares de câncer de mama: MCF-7, T47D (ambos classificados como luminais A) e MDA-MB-231 (classificado como triplo negativo) foram usadas para medir o nível de transporte de Pi H⁺-dependente (ou Na⁺-independente). A célula MCF-10A apresentou transporte de Pi H⁺-dependente (Figura 31). Linhagens celulares classificadas como luminal A (MCF-7 e T47-D) também apresentaram níveis de transporte de Pi dependente de H⁺ sem diferenças significativas entre elas. No entanto, a linhagem MDA-MB-231 exibiu um nível mais alto de transporte de Pi H⁺-dependente em comparação com MCF-10, MCF-7 e T47-D (Figura 31).

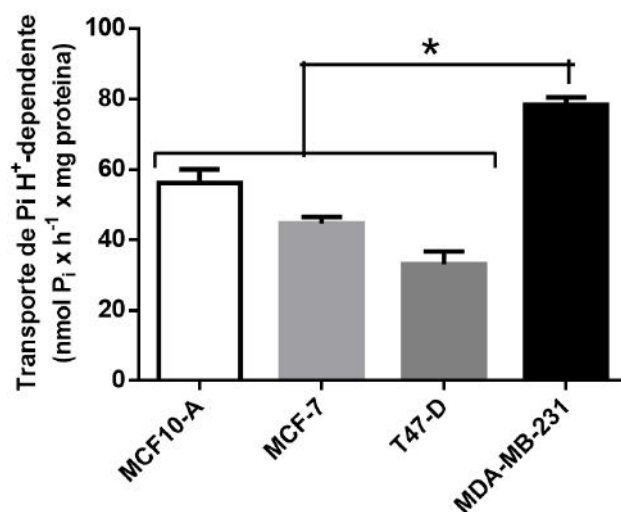


Figura 31: Taxas comparativas de influxo de ³²Pi H⁺-dependente em linhagens celulares de mama. Células intactas MCF-10A, MCF-7, T47-D ou MDA-MB-231 (5×10⁴ células/poço = 1,45 mg de proteína/mL) foram incubadas a 37°C em uma mistura de reação contendo cloreto de colina 116 mM, 5,5 mM Glicose, 5,4 KCl, HEPES 10 mM, MgCl₂ 0,8 mM, KH₂PO₄ 1 mM e 2,5 µCi/nmol ³²Pi. Os resultados são as médias ± SE de pelo menos 3 experimentos, com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas (p <0,05) do controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

4.2.2 Características cinética do transporte de Pi H⁺-dependente

Em seguida, caracterizamos bioquimicamente o transporte de Pi H⁺-dependente em MDA-MB-231. Os testes de transporte de Pi H⁺-dependente foram realizados em tempos diferentes de 0 a 40 minutos. É possível observar a linearidade do transporte em função do tempo por até 40 minutos (Figura 32 A). Como tempos mais longos podem levar à saturação do transporte de Pi, portanto, foram utilizados 40 min como o tempo padrão para a captura de Pi em ensaios de transporte de Pi ao longo do trabalho.

Os ensaios de transporte de fosfato inorgânico dependente de H⁺ foram realizados em diferentes faixas de pH (6,4 a 9,2). O resultado na Figura 32 B mostra que a maior absorção de Pi ocorreu em pH mais ácido. Em todas as faixas de pH realizadas, a viabilidade celular em MDA-MB-231 não foi afetada (Figura 32 B *inset*).

Foi realizado o transporte de Pi H⁺-dependente na presença de diferentes concentrações de Pi em células MDA-MB-231. Um perfil cinético de Michaelis-Menten foi observado na presença de concentrações crescentes de fosfato inorgânico de 0 a 5 mM até a saturação ser atingida (Figura 32 C). Isso rendeu um valor de $K_m = 1,387 \pm 0,1674$ mM Pi e $V_{max} = 198,6 \pm 10,23$ Pi \times h⁻¹ \times mg de proteína⁻¹. Um gráfico recíproco duplo é mostrado na Figura 32 D. Em comparação com os dados apresentados anteriormente para o transporte de Pi Na⁺-dependente (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018), o transportador aqui analisado exibe baixa afinidade para o fosfato inorgânico.

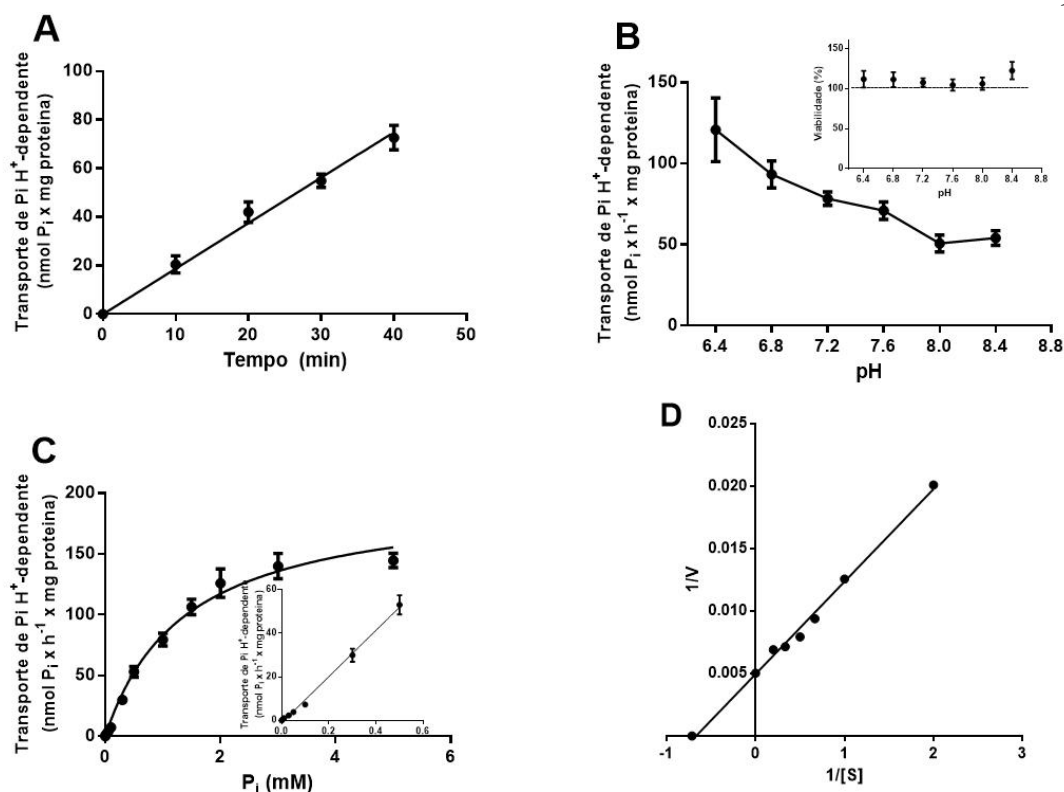


Figura 32: Parâmetros cinéticos do influxo de ^{32}Pi H⁺-dependente em células MDA-MB-231. Células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína/mL) foram incubadas a 37°C em uma mistura de reação como descrito na Figura 31 em vários tempos (A), em várias faixas de pH - entre 6,4 a 9,2 - usando HEPES 10 mM, 15 mM Tris, 15mM MES (B), concentrações crescentes de KH_2PO_4 (0-5 mM) (C) e gráfico de Lineweaver-Burk para concentrações de Pi entre 0,5 e 5mM Pi (D). Nestes intervalos de pH, as células permaneceram viáveis ao longo da experiência (C inset). Os resultados são as médias \pm SE de pelo menos 3 experimentos, com diferentes suspensões de células.

O Pi é um composto carregado negativamente, classificado quimicamente como um ânion. Já foi mostrado que o transporte de Pi Na^+ -independente era um transporte de ânions inespecífico (DELLAIRE e BÉLIVEAU, 1992). Para avaliar essa possibilidade, foram testados sulfato de magnésio (10 mM), cloreto de magnésio (10 mM) e bicarbonato de magnésio (10 mM) no transporte de Pi H⁺-dependente. Nenhum efeito desses ânions foi observado (Figura 33). Além disso, o inibidor clássico de transportadores de ânions, DIDS, não teve efeito significativo no transporte de Pi H⁺-dependente na concentração de 1 mM (Figura 33).

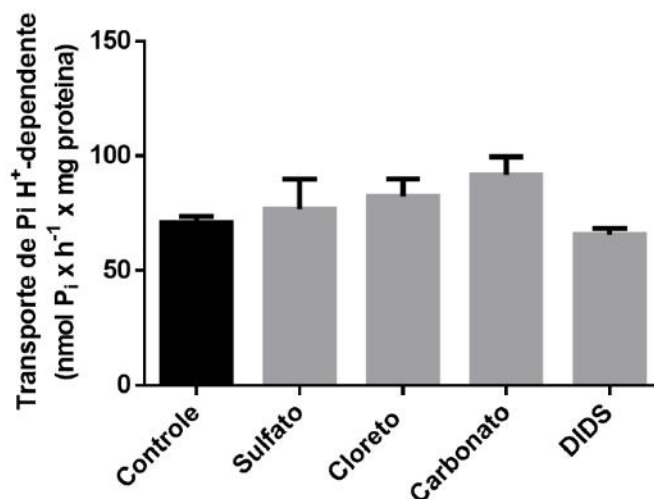


Figura 33: Efeito de ânions no influxo de $^{32}\text{Pi H}^+$ -dependente. Células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína / mL) foram incubadas por 40 min a 37°C em uma mistura de reação como descrito na Figura 31 na presença de ânions ou inibidor indicado abscissa: sulfato de magnésio (10 mM), cloreto de magnésio (10 mM) e bicarbonato de magnésio (10 mM) e DIDS (1 mM). Na presença desses inibidores em suas respectivas concentrações, as células permaneceram viáveis durante todo o experimento. Os resultados são as médias \pm SE de pelo menos 3 experimentos, com diferentes suspensões de células.

A fim de verificar a importância do influxo de íons para o transporte de Pi dependente de H^+ , ensaios foram realizados na presença de diferentes moduladores de transporte de íons (Figura 34).

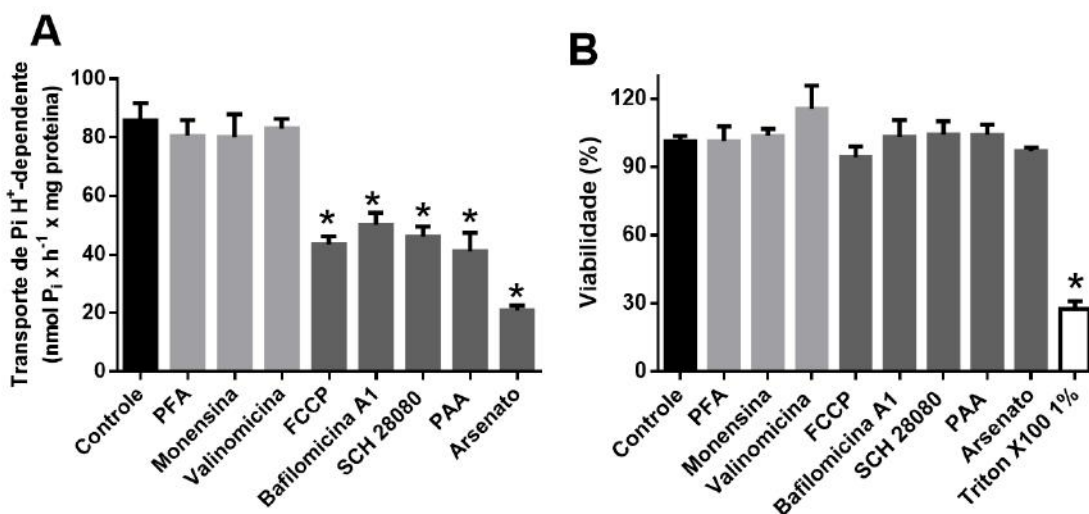


Figura 34: Efeito do influxo de íons na captação de $^{32}\text{Pi H}^+$ -dependente. Células intactas (5×10^4 células / poço = 1,45 mg de proteína/mL) foram incubadas por 40 min a 37°C em uma mistura de reação como descrito na Figura 31 e os inibidores indicados na abscissa: PFA (5 mM), monensina (100 μM), FCCP (10 μM), bafilomicina A1 (100 nM), SCH28080 (100 μM), valinomicina (100 μM), PAA (1 mM) e arsenato (1 mM) (A). Na presença desses inibidores em suas respectivas concentrações, as células permaneceram viáveis ao longo do experimento (B). Os resultados são as médias \pm SE de pelo menos 3 experimentos, com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Os inibidores foram PFA (ácido fosfonofórmico), um inibidor do transportador de Pi Na^+ -dependente; monensina, um ionóforo de Na^+ ; valinomicina, um ionóforo de K^+

e FCCP, um ionóforo H^+ . Além disso, os inibidores da H^+ -ATPase vacuolar, Bafilomicina A1, um inibidor de H^+ , K^+ -ATPase, SCH28080, um inibidor de transporte de Pi, PAA e arsenato, um análogo estrutural de Pi, também foram testados.

Apenas FCCP, Bafilomicina A1 e SCH28080 desregularam os níveis de prótons intracelulares, bem como PAA e arsenato inibiram o transporte de Pi H^+ -dependente (Figura 34 A). Em todas as condições realizadas, a viabilidade das células MDA-MB-231 não foi afetada (Figura 34 B). Estes resultados indicam que o transportador de Pi independente de sódio possivelmente é indiretamente dependente da concentração de H^+ intracelular, provavelmente trata-se de um co-transporte de Pi e H^+ .

Para verificar a hipótese de que o transporte de Pi independente de Na^+ é um transportador de Pi dependente de H^+ , a quantificação óptica do pH intracelular foi inicialmente realizada utilizando células MDA-MB-231, permeabilizadas em valores de pH variando de 5,5 a 8,5. O pH intracelular das células MDA-MB-231 foi medido em vários momentos na presença ou ausência de fosfato inorgânico (1 mM). Os resultados na Figura 35 mostram que a adição de fosfato inorgânico diminuiu o pHi. Nenhum efeito sobre o pHi foi observado na ausência de fosfato inorgânico. Esse resultado fortifica a sugestão de que ao transportar Pi, o H^+ seria transportado junto, acidificando o citoplasma da célula MDA-MB-231.

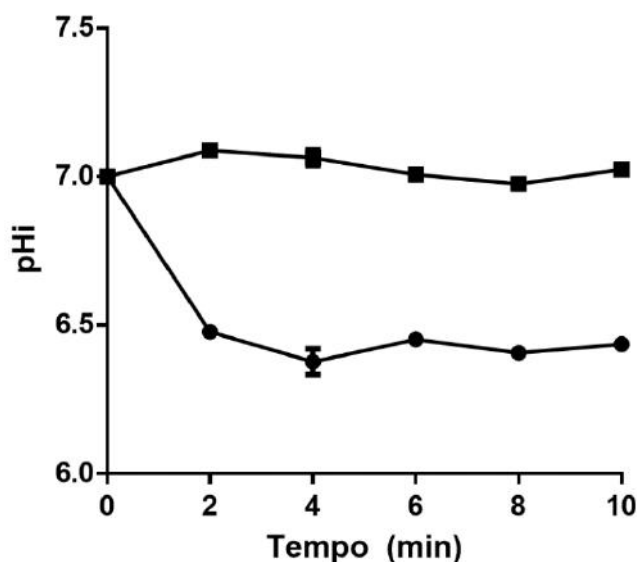


Figura 35: Influência da adição de Pi na mudança do pH intracelular em função do tempo. Células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína/mL) foram lavadas com uma mistura de reação contendo cloreto de colina 116 mM, glicose 5,5 mM, HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 0,8 mM, 1 mM de KH_2PO_4 (círculo fechado) ou água (quadrado fechado) foram adicionados. O pH intracelular (pHi) foi quantificado a um intervalo de 2 minutos por 10 minutos de tempo total por quantificação óptica do pH intracelular. Os resultados são as médias \pm SE de pelo menos 3 experimentos, com diferentes suspensões de células.

4.2.3 Efeito do PAA no transporte de Pi, proliferação celular, adesão e fenótipo de migração

Uma vez caracterizado o transportador de Pi H⁺-dependente em células MDA-MB-231, será agora correlacionada a importância desse transportador de Pi para os processos tumorais, tais como: proliferação, adesão e migração celular. Foi relatado que o ácido fosfonoacético (PAA) é um inibidor potente do transporte de Pi dependente de H⁺ (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014). Na Figura 36 A, mostramos uma diminuição dose-resposta do transporte de Pi H⁺-dependente em relação ao aumento das concentrações de PAA. Com base nisso, 1 mM de PAA foi testado em vários parâmetros relevantes para o comportamento das células tumorais.

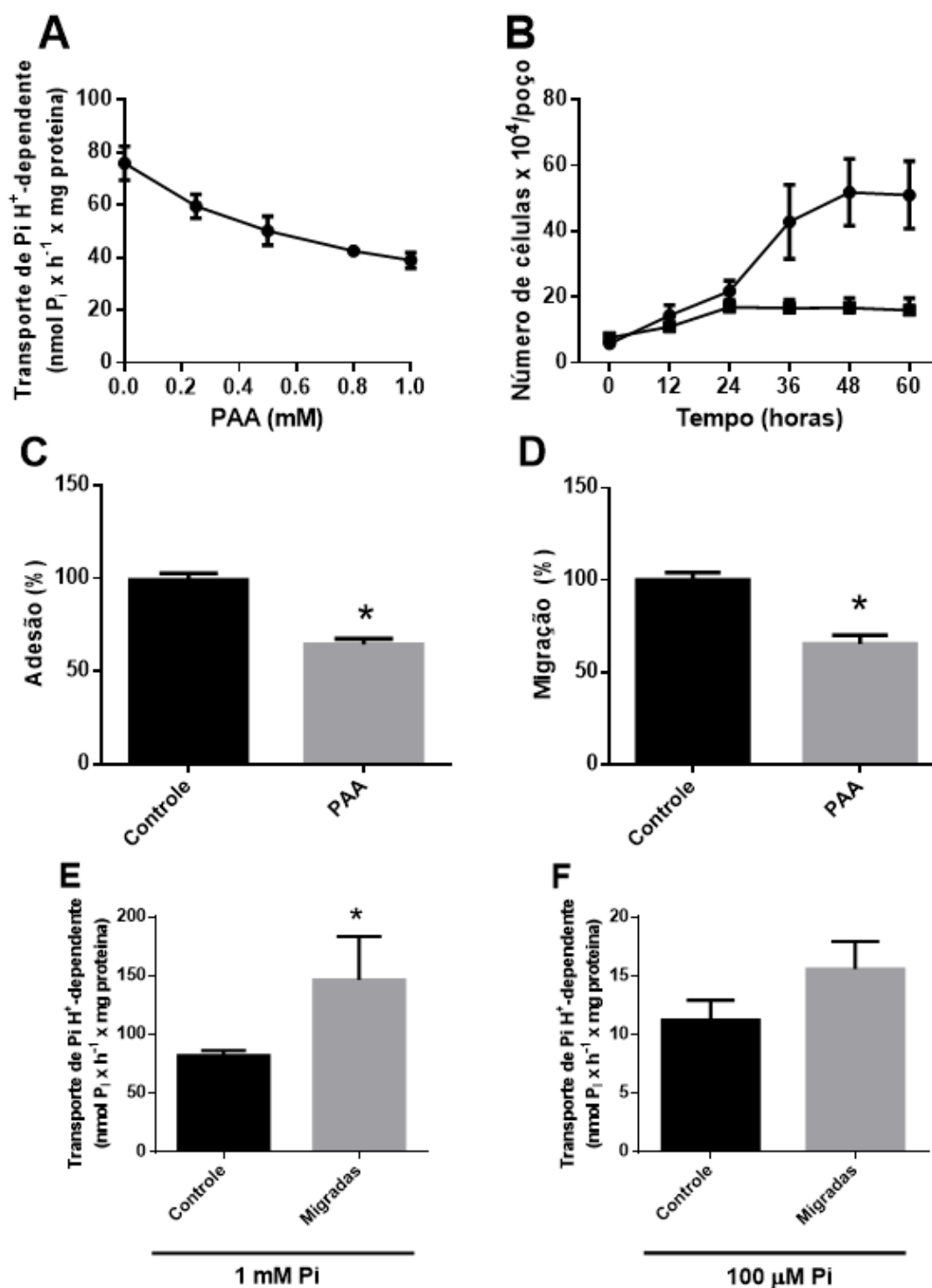


Figura 36: Efeito do PAA no influxo de $^{32}\text{P}_i \text{H}^+$ -dependente, proliferação, adesão e migração celular. As células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína/mL) foram incubadas por 40 min a 37°C em uma mistura de reação como descrito na Figura 31, na presença de concentrações crescentes de PAA, em que as células permaneceram viáveis durante todo o experimento (A). MDA-MB-231 (1×10^4 células/poço) mantidas em 1 mM de PAA foram quantificadas em um intervalo inicial de 6 ou 12h até 60h usando câmera de Neubauer (B). A adesão celular foi feita com células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) pré-tratadas por 40 min na presença ou ausência de PAA (1 mM) (C). A migração celular foi feita com células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) pré-tratadas por 40 min na presença ou ausência de PAA (1 mM) (D). O transporte de Pi foi medido, na mesma condição descrita anteriormente, em células não migradas (controle) ou migradas na presença de Pi 1 mM (E) ou Pi 100 μM (F). Os resultados são as médias \pm SE de pelo menos 3 experimentos, com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas $p < 0,05$ pelo teste-*t* Student.

A proliferação de células MDA-MB-231 foi avaliada ao longo de até 60 h. Descobrimos que a proliferação foi reduzida em aproximadamente 80% na presença de PAA em comparação com os controles (Figura 36 B). O PAA também foi testado em ensaios de adesão e migração. Os resultados na Figura 36, C e D, mostram que 1 mM de PAA reduziu ambos os parâmetros em aproximadamente 40%.

Para confirmar que o transportador de Pi H⁺-dependente contribui para o processo de migração, as células MDA-MB-231 passaram pelo desafio de migração celular pelo método transwell, em que as células migradas foram comparadas com as células não-migradas (em densidades celulares equivalentes) para o ensaio de transporte de Pi H⁺-dependente em 1mM Pi - condição adequada para o transporte de Pi H⁺-dependente. O transporte de Pi H⁺-dependente foi estimulado quase em dobro nas células migradas comparadas com as não-migradas (Figura 36 E). No entanto, em 100 µM Pi - uma condição adequada para o transporte de Pi Na⁺-dependente de alta afinidade; nenhuma diferença foi observada entre as células migradas e não-migradas (Figura 36 F). Esses resultados sugerem que o transporte de Pi H⁺-dependente é importante para o processo de migração, desde que a concentração de Pi seja adequada para esse transportador.

Durante a transição epitélio-mesenquimal, as células epiteliais perdem marcadores epiteliais (E-caderina, ocludina, citoqueratinas, etc.) e começam a expressar marcadores mesenquimais (vimentina, fibronectina) apresentando uma maior capacidade migratória devido ao fenótipo mesenquimal (Figura 7). (POLYAK e WEINBERG, 2009); (YANG e WEINBERG, 2008). Foram analisadas as proteínas marcadoras associadas à transição epitelial-mesenquimal (E-caderina e vimentina) e a capacidade de migração das células MDA-MB-231 cultivadas na presença ou ausência de PAA por imunofluorescência (Figura 37).

Enquanto as células de controle apresentaram baixa expressão de E-caderina (Figura 37 A) e alta expressão de vimentina (Figura 37 F), as células cultivadas na presença de PAA por 24 h apresentaram expressão induzida de E-caderina (Figura 37 B), sugerindo um padrão invertido de expressão de marcadores. A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o PAA aumenta significativamente a expressão da E-caderina (Figura 37 E). Essas observações sugerem fortemente que, quando o transporte de Pi é inibido, as células MDA-MB-231 tendem a reverter das características mesenquimais para epiteliais.

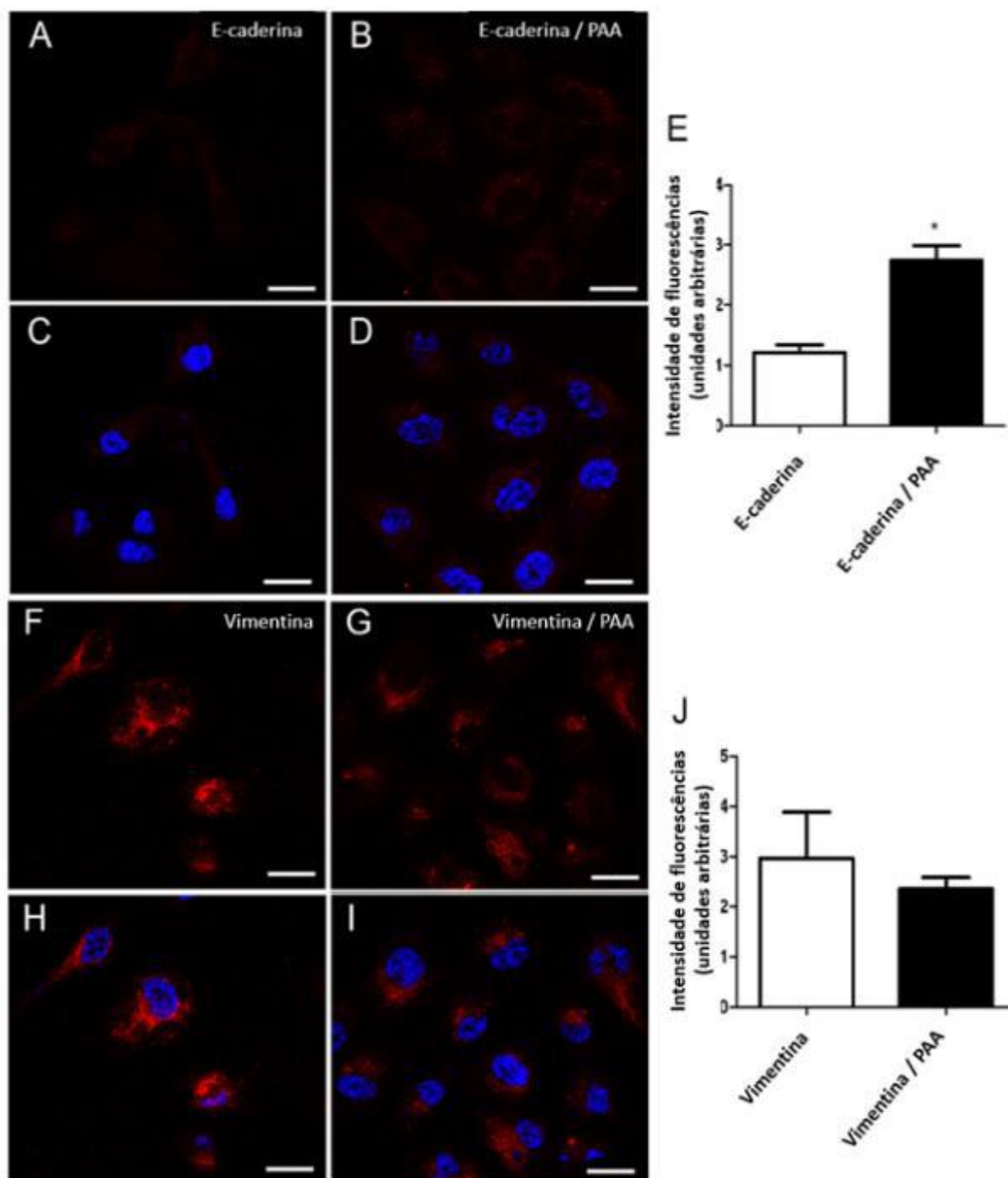


Figura 37: Efeito do PAA na expressão de E-caderina e vimentina. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em lâminas de microscópio (5×10^4 células/poço) e então mantidas na presença ou ausência de PAA 1 mM por 24 h. As células foram fixadas, permeabilizadas e a expressão de E-caderina (A – D) e vimentina (F e I) foi detectada por imunofluorescência. Os núcleos foram revelados por marcação com DAPI (azul). Barras = 20 μ m. A intensidade de fluorescência de células MDA-MB-231, coradas com vermelho, foi quantificada para E-caderina (E) e vimentina (J). * Denota diferença significativa $p < 0,001$ pelo teste-*t* Student.

4.2.4 Influência do elevado Pi extracelular para o transporte de Pi H⁺-dependente e Na⁺-dependente

Em tumores de glândula mamária de camundongos, foi identificada uma alta concentração de Pi no microambiente tumoral (~2mM Pi) em comparação com a glândula mamária normal (aproximadamente 1mM Pi) (ELSER, STERNER, *et al.*, 2000). Como em células de câncer de mama, foi agora mostrado dois transportadores de Pi com afinidades para diferentes faixas de Pi, inclusive foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de Pi extracelular nos transportadores de Pi. As células MDA-MB-231 foram mantidas em diferentes concentrações de Pi (1 ou 2 mM Pi) e na presença de PFA (5 mM) no meio de crescimento por 24 h. Como mostrado na Fig. 8A, a expressão de NaPi-IIb foi avaliada e apresentou uma significativa redução em Pi 2mM, bem como em PFA 5mM (Figura 38 A).

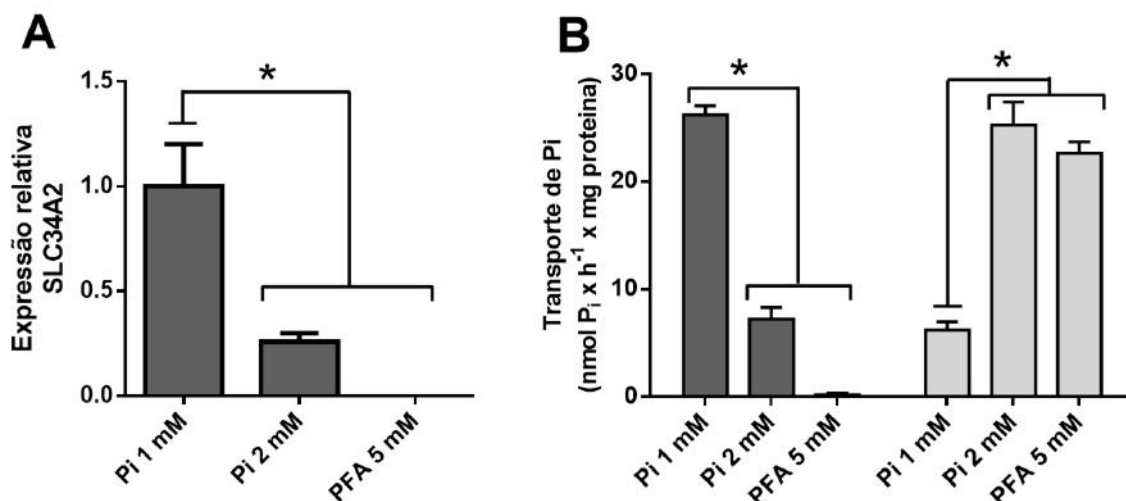


Figura 38: Efeito da alta concentração de fosfato e PFA na expressão e atividade de transporte de Pi. A) A análise de expressão de SLC34A2 foi feita após pré-tratamento por 24 h com Pi 1mM (controle) e Pi 2mM e PFA 5mM. Os dados de expressão gênica foram normalizados para uma referência endógena β -actina (ACTB). B) Células intactas (5×10^4 células/poço = 1,45 mg de proteína/poço) foram incubadas a 37 °C em uma mistura de reação para transporte de Pi H⁺-dependente (cinza claro), contendo colina 116 mM ou NaCl 116 mM para transporte de Pi Na⁺-dependente (cinza escuro), glicose 5,5 mM, 5,4 KCl, HEPES 10 mM, MgCl₂ 0,8 mM, KH₂PO₄ 100 μ M e 2,5 μ Ci/nmol ³²Pi. * Denotam diferenças significativas (p < 0,05) do controle (Pi 1mM), conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Em paralelo, foram realizados experimentos com células MDA-MB-231 nas mesmas condições da Figura 38 A. Após a incubação com diferentes concentrações de Pi por 24 horas, as células foram lavadas em uma solução livre de Pi e 100 μ M de Pi foi adicionado depois disso para analisar o transporte de Pi. O transporte de Pi Na⁺-dependente foi abolido em PFA 5mM e diminuiu significativamente na presença de Pi 2mM (Figura 38 B). No entanto, o transporte de Pi H⁺-dependente em 2 mM ou 5 mM de Pi foi 5 vezes maior do que o transporte de Pi Na⁺-dependente (Figura 38 B). Esses

resultados sugerem o papel dos transportadores de Pi H⁺-dependente como mecanismo compensatório na baixa funcionalidade dos transportadores de Pi Na⁺-dependente.

4.3 PARTE 3: TRANSPORTADOR DE P_i Na⁺-DEPENDENTE: INIBIÇÃO PELO RESVERATROL

Recentemente em células de câncer de mama, foi demonstrado o potencial efeito anti-proliferativo e anti-metastático do resveratrol em células menos migratórias (MCF-7), em células altamente metastáticas (MDA-MB-231) e pela redução dos níveis de marcadores da TEM (RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, PACHECO-VELÁZQUEZ, *et al.*, 2019) (SUN, ZHOU, *et al.*, 2019). Como o Pi e seus transportadores são importantes para os processos tumorais, tais como proliferação, migração e TEM (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018) (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017), foi avaliado se o resveratrol pode exercer alguma regulação nos transportadores de Pi em células de câncer de mama, MDA-MB-231, impactando nos processos metastáticos que requerem uma alta demanda de Pi.

4.3.1 Influência do resveratrol no transporte de Pi em células MDA-MB-231.

A maioria dos trabalhos envolvendo o efeito anti-tumoral do resveratrol trabalha com longa exposição à droga testada (maior que 24 horas) (RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, PACHECO-VELÁZQUEZ, *et al.*, 2019) (SUN, ZHOU, *et al.*, 2019).

Como os transportadores de Pi estão localizados na membrana plasmática (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013), é cabível averiguar se o resveratrol em curto prazo, exerce alguma regulação nos transportadores de Pi.

Foi analisado o nível de transporte de Pi H⁺-dependente (ou sódio-independente) e de transporte de Pi Na⁺-dependente na ausência ou presença do resveratrol (100 μM, Figura 39). O resveratrol foi capaz de inibir apenas o transporte de Pi Na⁺-dependente, aproximadamente 50%; o mesmo não foi observado para o transporte de Pi H⁺-dependente.

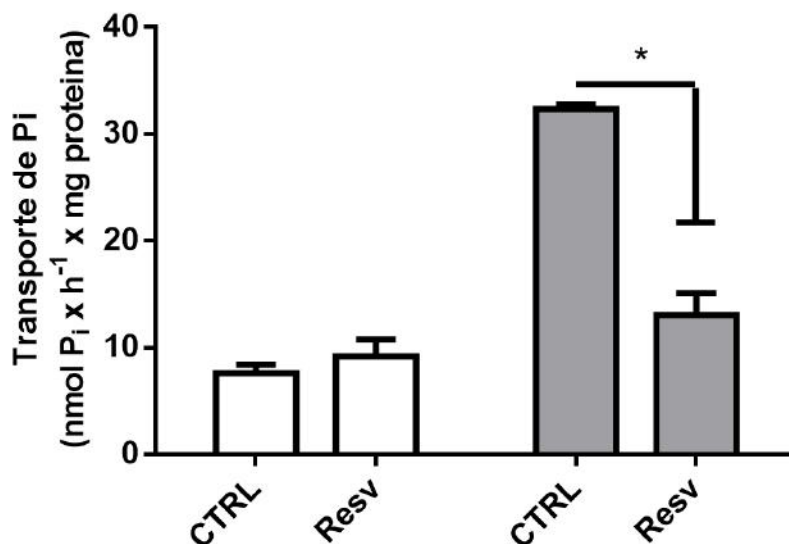


Figura 39: Efeito do resveratrol no transporte de Pi Na⁺-dependente e H⁺-dependente. Células MDA-MB-231 intactas (5×10^4 células / mL = 1,45 mg de proteína / mL) foram incubadas a 37 ° C por 60 minutos na mistura de reação descrita na seção Materiais e Métodos, enquanto uma solução para o transporte de Pi H⁺-dependente (barras brancas) contendo 116 mM de cloreto de colina e uma solução para o transporte de Pi Na⁺-dependente (barras pretas) contendo 116 mM de NaCl sem (CTRL, 1% DMSO) ou com (Resv) 100 μM de resveratrol. Os resultados são apresentados como médias ± SE de pelo menos 3 experimentos com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle, conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

4.3.2 Resveratrol é um inibidor direto do transporte de Pi

Com base nos resultados mostrados na Figura 39, foi focado neste trabalho investigar como o resveratrol inibe o transporte de Pi Na⁺-dependente por 1 h de incubação. Foi investigado que se trata de um inibidor direto ao transportador de Pi Na⁺-dependente.

Crescentes concentrações de resveratrol foram testados no transporte de Pi Na⁺-dependente (0 - 200μM) e um perfil dose-resposta foi observado, IC₅₀ de 16.37 ± 4.72 μM de resveratrol (Figura 40 A). Nessas mesmas condições testadas no transporte de Pi Na⁺-dependente, também foram testadas nos ensaios de viabilidade, no qual nenhuma modulação foi observada (Figura 40 A *inset*). 100μM de resveratrol foi escolhido como concentração fixa para ser testada em outros ensaios experimentais.

O resveratrol foi capaz de inibir 50% (aproximadamente) o transporte de Pi Na⁺-dependente de acordo com o tempo, comparados com a condição ausente de resveratrol (Figura 40 B).

Crescentes concentrações de Pi foram testadas no transporte de Pi Na⁺-dependente na ausência e presença de duas concentrações de resveratrol (12,5 μM e 100

μM). Como esperado, nas três condições houve um perfil cinético Michaelis-Menten e valores de K_m semelhantes foram obtidos (Tabela 7 e Figura 40 C).

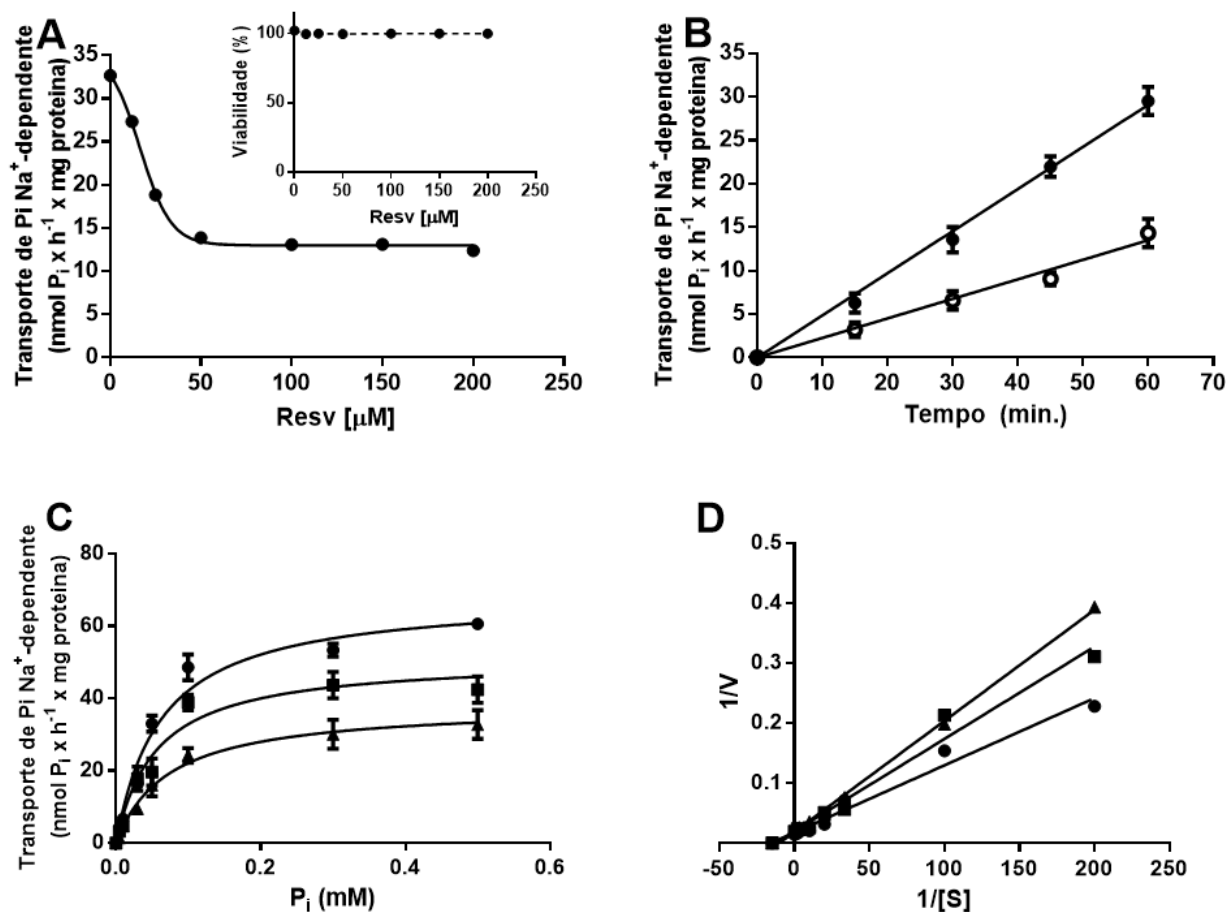


Figura 40: Inibição não-competitiva do transporte de Pi Na^+ -dependente pelo resveratrol. As células intactas (5×10^4 células / poço = $1,45 \text{ mg}$ de proteína / mL) foram incubadas a 37°C por 60 minutos na mistura de reação descrita na seção Materiais e Métodos. (A) A inibição dose-dependente do transporte de Pi Na^+ -dependente em concentrações crescentes de resveratrol é mostrada na abcissa. (B) Curso temporal da atividade de transporte de Pi na presença de resveratrol ($100 \mu\text{M}$, círculos abertos) ou ausência de resveratrol (controle, círculos fechados). (C) Dependência do transporte de Pi em concentrações crescentes de KH_2PO_4 , conforme mostrado na abcissa, na presença de resveratrol ($12,5 \mu\text{M}$, quadrados fechados; $100 \mu\text{M}$, triângulos fechados) ou ausência de resveratrol (controle, círculos fechados). (D) Gráfico Lineweaver-Burk dos dados apresentados no painel C com resveratrol ($12,5 \mu\text{M}$, quadrados fechados, $r^2 = 0,976$; $100 \mu\text{M}$, triângulos fechados, $r^2 = 0,975$) ou ausência de resveratrol (controle, círculos fechados, $r^2 = 0,998$) (D). Em várias concentrações de resveratrol, as células permaneceram viáveis durante todo o experimento (painel A inset). Os resultados são apresentados como as médias \pm SE de pelo menos 3 experiências com diferentes suspensões de células.

No entanto, houve uma redução significativa no valor V_{max} em ambas as concentrações de resveratrol (Tabela 7). Os valores de K_m e V_{max} foram utilizados para realização do gráfico de Lineweaver-Burk, confirmando a redução apenas dos valores de

V_{max} (Figura 40 D). Esses resultados sugerem uma inibição não-competitiva sugerida pelo resveratrol.

Tabela 7: Parâmetros cinéticos do transportador de Pi Na⁺-dependente com resveratrol.

* Denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle, conforme determinado pela

Condição	K_m (μM Pi)	V_{max} ($nmol$ Pi \times h^{-1} \times mg proteína)
Controle	62.33 \pm 7.70	68.39 \pm 2.73
Resveratrol 12,5 μM	60.39 \pm 1.12	51.09 \pm 3.42 *
Resveratrol 100 μM	68.02 \pm 10.57	38.15 \pm 2.57 *

análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

Russo-Abrahão e colaboradores (2018) demonstraram que o transporte de Pi Na⁺-dependente por dependente dos níveis de sódio intracelular, é regulado indiretamente pelas Na⁺-ATPase e Na⁺-K⁺-ATPase, (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). Diante disso, é plausível cogitar que o resveratrol possa inibir umas dessas ATPases citadas e indiretamente inibir o transporte de Pi Na⁺-dependente. Portanto, foi analisada a atividade Na⁺-K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase, na ausência ou presença do resveratrol. Nenhuma modulação foi observada (Figura 41 A e B), descartando essa possibilidade e aproximando-se da noção de que o resveratrol inibe diretamente o transporte de Pi Na⁺-dependente.

Um dos principais mecanismos antitumorais do resveratrol é por ser um clássico e potente antioxidante (KO, SETHI, *et al.*, 2017). Foi relatado a despeito das células de câncer de mama que o resveratrol por 24 horas de incubação pode suprimir a captação de glicose ao inibir os níveis de EROs intracelulares, prejudicando vias de sinalizações adjacentes reguladas pelas EROs envolvidas na disponibilidade desses transportadores de glicose (JUNG, LEE, *et al.*, 2013).

Por natureza, a linhagem celular MDA-MB-231 possui altos níveis de EROs (Figura 11); uma diminuição desses níveis poderia impactar drasticamente a sinalização. Para avaliar essa questão, as células MDA-MB-231 submetidas a 1 hora de incubação com o resveratrol foram ensaiadas para quantificar por 30 minutos a produção de EROs imediatamente após a incubação. Nenhuma modulação foi observada (Figura 41 C), descartando por pelo menos 1 hora, a regulação dos níveis de EROs pelo resveratrol.

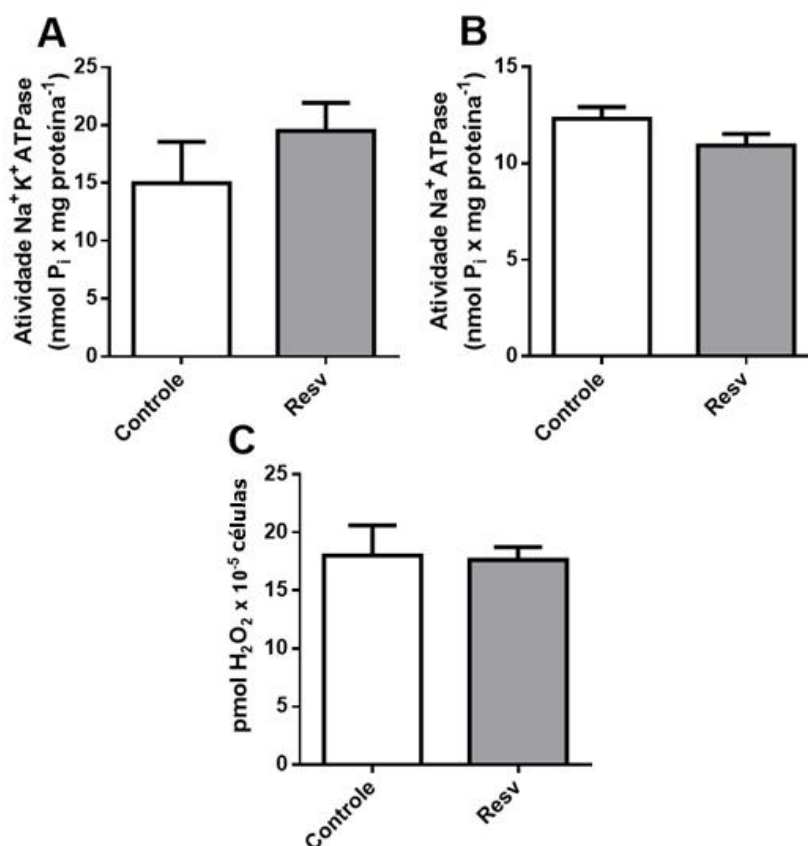


Figura 41: Influência do resveratrol na Na⁺, K⁺-ATPase, Na⁺-ATPase ou na produção de EROs. (A) Na⁺, K⁺ATPase foi medido em uma mistura de reação contendo 20 mM HEPES-Tris, pH 7,2; MgCl₂ 10 mM; NaCl 120 mM; 30 mM KCl; ATP 5 mM e [γ ³²P] ATP (atividade específica de aproximadamente 0,25 μ Ci/nmol ATP) em um volume final de 0,1 mL por 60 minutos a 37°C. (B) Para determinar a atividade da Na⁺-ATP, foi usada uma mistura de reação contendo HEPES-Tris 20 mM, pH 7,0; MgCl₂ 10 mM; 5 mM [γ ³²P] ATP (0,25 μ Ci/nmol ATP); e NaCl 120 mM. (C) MDA-MB-231 foi incubada por 1 hora na ausência ou presença do resveratrol e a produção de H₂O₂ foi analisado por 30 minutos. Os resultados são apresentados como as médias \pm SE de pelo menos 3 experiências com diferentes suspensões de células. Análises estatísticas foram feitas utilizando o teste-*t* Student

4.3.3 Resveratrol é um inibidor irreversível do transporte de Pi, adesão e migração celular

Para avaliar se o resveratrol prejudica a adesão e migração celular ao inibir o transporte de Pi Na⁺-dependente, primeiro, é preciso determinar se o resveratrol foi capaz de inibir o transporte de Pi de forma reversível. As células MDA-MB-231 foram pré-incubadas com solução tampão na ausência (controle) ou na presença de resveratrol 100 μ M. Após repetidas lavagens, o resveratrol adicionado para pré-incubação foi completamente removido e o transporte de Pi Na⁺-dependente permaneceu inibido, no mesmo nível das células para as quais o resveratrol foi adicionado, mostrando que o

resveratrol inibe transporte de Pi Na^+ -dependente de forma irreversível (Figura 42 A). O mesmo efeito também foi observado em ensaios de migração e adesão (Figura 42 B e C).

Após tratamento das células com resveratrol por pelo menos 1 h, observamos que a porcentagem de células aderidas e migradas diminuiu irreversivelmente, sem alterar a viabilidade celular (Figura 42 D). Além disso, o tempo de exposição ao resveratrol nos ensaios de adesão e migração podem chegar até 6 h, podendo ocorrer uma interferência da viabilidade nos resultados da migração e adesão. No entanto, nenhuma diferença foi observada quando o resveratrol foi testado por 12 h na viabilidade celular (Figura 42 D, barra hachurada), descartando a possibilidade de que uma inibição potencial da viabilidade pudesse regular a adesão e migração celular.

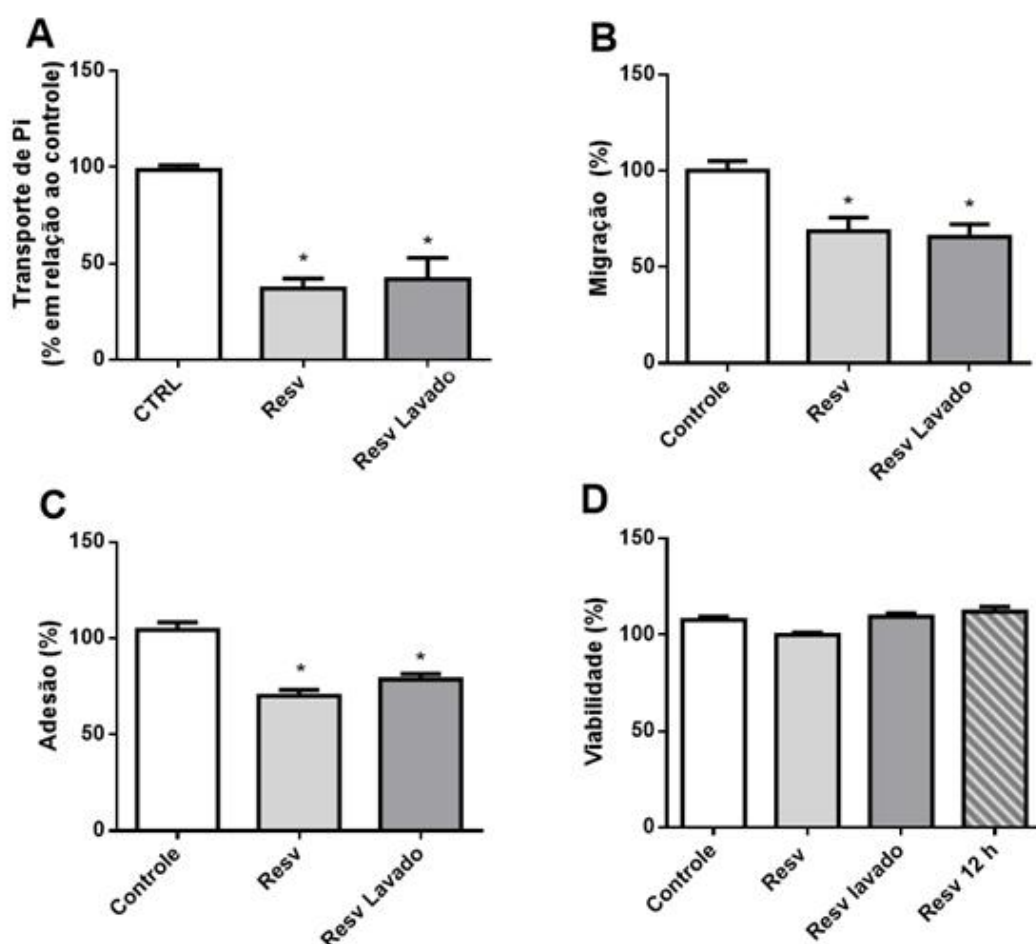


Figura 42: A inibição irreversível do transporte de Pi Na^+ -dependente e seus efeitos tumorais. As células MDA-MB-231 foram pré-incubadas com solução tampão na ausência (CTRL) ou na presença de resveratrol 100 μM (Resv) ou na pré-incubação de resveratrol 100 μM por 1 h, após lavagens repetidas (Resv lavado). O transporte de Pi dependente de Na^+ foi medido por 60 minutos (A), a migração por 6 h (B), a adesão por 3 h (C) e viabilidade celular por 1h e 12 h (D). Os resultados são apresentados como as médias \pm SE de pelo menos 3 experiências com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle (Pi 1mM), conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

4.3.4 A migração e adesão das células MDA-MB-231 foram inibidas pelo resveratrol e revertidas pelo elevado Pi extracelular

Neste trabalho, na Figura 38, foi mostrado que a expressão do NaPi II-b e o transporte de Pi Na⁺-dependente foi fortemente inibido após incubação por 24 horas em Pi 2 mM. No entanto, o transporte de Pi H⁺-dependente foi estimulado nessa condição. Esse efeito em cessar a expressão do transportador de Pi sódio-dependente foi aplicado nos ensaios experimentais para fortificar a sugestão de que a inibição do transportador de Pi Na⁺-dependente pode influenciar na inibição da migração e adesão pelo resveratrol.

Portanto, células MDA-MB-231 foram expostas a Pi 1 mM (controle) e Pi 2 mM por 24 horas e a migração (Figura 43 A), adesão (Figura 43 B), transporte de Pi Na⁺-dependente (Figura 43 C), transporte de Pi H⁺-dependente (Figura 43 D) e a viabilidade celular (Figura 43 E) foi medida na ausência ou na presença de resveratrol 100 µM.

Foi possível observar que o transporte de Pi H⁺-dependente não foi influenciado pelo resveratrol, seja em Pi 1 ou 2 mM extracelular (Figura 43D). Da mesma forma que a inibição do transportador de Pi Na⁺-dependente pelo resveratrol não foi influenciado pela mudança do Pi extracelular (Figura 43 C).

No entanto, a inibição da migração e adesão celular pelo resveratrol foi restaurada em Pi 2 mM, sem alterar a viabilidade celular (Figura 43 A, B e E). Esses resultados sugerem que nas condições em que o transportador de Pi Na⁺-dependente é cessado, a inibição da migração e adesão pelo resveratrol - em curtos períodos de exposição (3 ou 6 h) - também cessa.

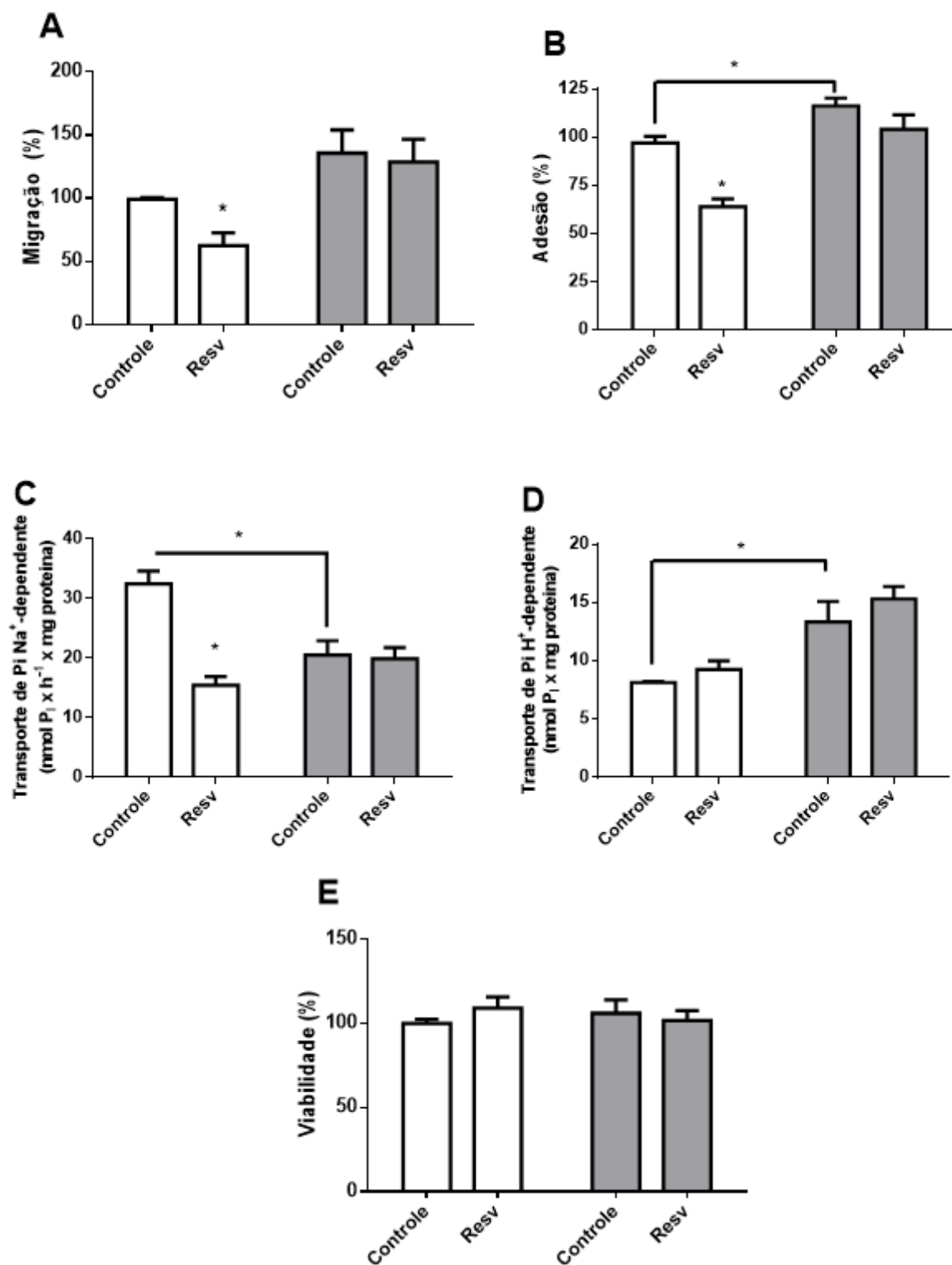


Figura 43: Efeito do resveratrol e Pi na migração, adesão, transporte de Pi e viabilidade. As células MDA-MB-231 foram expostas a Pi 1 mM (controle) e Pi 2 mM por 24 horas e a migração (A), adesão (B), transporte de Pi Na⁺-dependente (C), transporte de Pi H⁺-dependente (D) e a viabilidade celular (E) foi medida na ausência ou na presença de resveratrol 100 μM (Resv) por 60 minutos. Os resultados são apresentados como as médias ± SE de pelo menos 3 experiências com diferentes suspensões de células. * Denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) do controle (Pi 1 mM), conforme determinado pela análise de variância unilateral (ANOVA), usando o teste de comparações múltiplas de Turkey.

4.4 PARTE 4: TRANSDUÇÃO DO SINAL: GERAÇÃO DE H₂O₂ COMO UMA RESPOSTA SUBJACENTE AO ALTO NÍVEL DE PI EXTRACELULAR

Neste trabalho, na Figura 38, foi demonstrado que as células MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento com Pi 2 mM, o transporte de Pi Na⁺-dependente foi inibido; e, de maneira compensatória, o transporte de Pi H⁺-dependente foi estimulado. Portanto, para entender o efeito de altas concentrações de Pi nos transportadores de células de câncer de mama, foi medido o transporte de Pi Na⁺-dependente (Figura 44 A) e o transporte de Pi H⁺-dependente (Figura 44 B) nas seguintes linhagens celulares de mama: uma célula da mama epitelial não tumoral, MCF10-A, uma célula luminal A de câncer de mama, MCF-7 e uma célula de câncer de mama tripla negativa, MDA-MB-231, na presença de concentrações crescentes de Pi (1, 2, 4 e 8 mM). Como esperado, o tratamento com alta dose de Pi inibiu o transporte de Pi dependente de Na⁺ e estimulou o transporte de Pi dependente de H⁺. No entanto, esse fenômeno foi observado apenas no MDA-MB-231, sem efeito nas demais linhagens de células da mama.

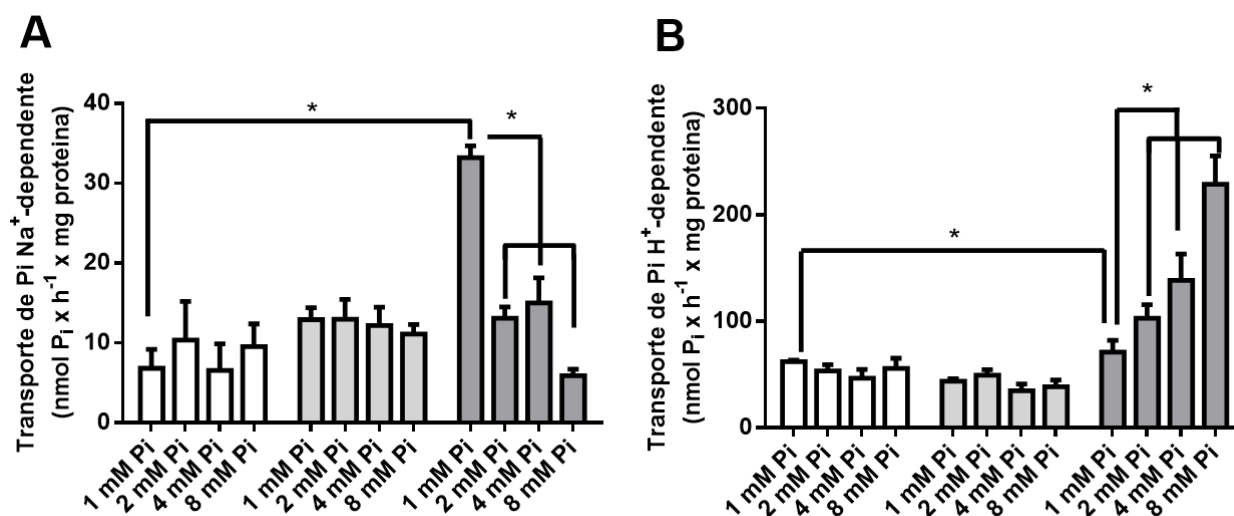


Figura 44: Efeito do alto Pi no transporte de Pi em diferentes linhagens celulares da mama. MCF10-A (barras em branco), MCF-7 (barras em cinza) e MDA-MB-231 (barras em cinza escuro) foram tratadas em várias concentrações de Pi (1, 2, 4 e 8 mM de Pi) durante 24 h. O transporte de Pi Na⁺-dependente (A) ou H⁺-dependente (B) foi realizado por 1 h, conforme descrito na seção de materiais e métodos (M&M). As barras representam a média \pm SE de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Neste trabalho, Pi 1 mM foi usado para representar a concentração sérica de Pi em pacientes saudáveis; Pi 2 mM e Pi 4 mM, para a concentração sérica de Pi em pacientes com câncer (PAPALOUCAS, PAPALOUCAS, *et al.*, 2014). Com o objetivo de entender até que ponto esse efeito ocorre, observamos que o Pi 8 mM foi a melhor

concentração que regulou os níveis de transporte do Pi. Para uma melhor análise, em alguns testes experimentais utilizamos a concentração de Pi 8 mM de Pi como alto Pi e Pi 1 mM como controle.

4.4.1 Efeito do elevado Pi extracelular na produção de H₂O₂

Atualmente, o H₂O₂ é considerado a principal ERO envolvida nos processos de sinalização redox, desempenhando papéis essenciais nas vias de transdução de muitas células cancerígenas (KIM, KIM e BAE, 2016); (HECHT, PESSOA, *et al.*, 2016). Como molécula de sinalização pleiotrópica, os objetivos deste trabalho foram investigar se o H₂O₂ também poderia estar envolvido em eventos celulares desencadeados por alta concentração extracelular de Pi. Assim, a produção de H₂O₂ foi medida em diferentes linhagens celulares de mama (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231), após 24 horas de tratamento com alta concentração de Pi (8 mM). Comparado às outras linhagens celulares, o MDA-MB-231 teve a maior produção de H₂O₂ na concentração de Pi 1 mM e foi o único a mostrar uma estimulação significativa de H₂O₂ nas elevadas concentrações de Pi (2, 4 ou 8 mM) (Figura 45 A e B).

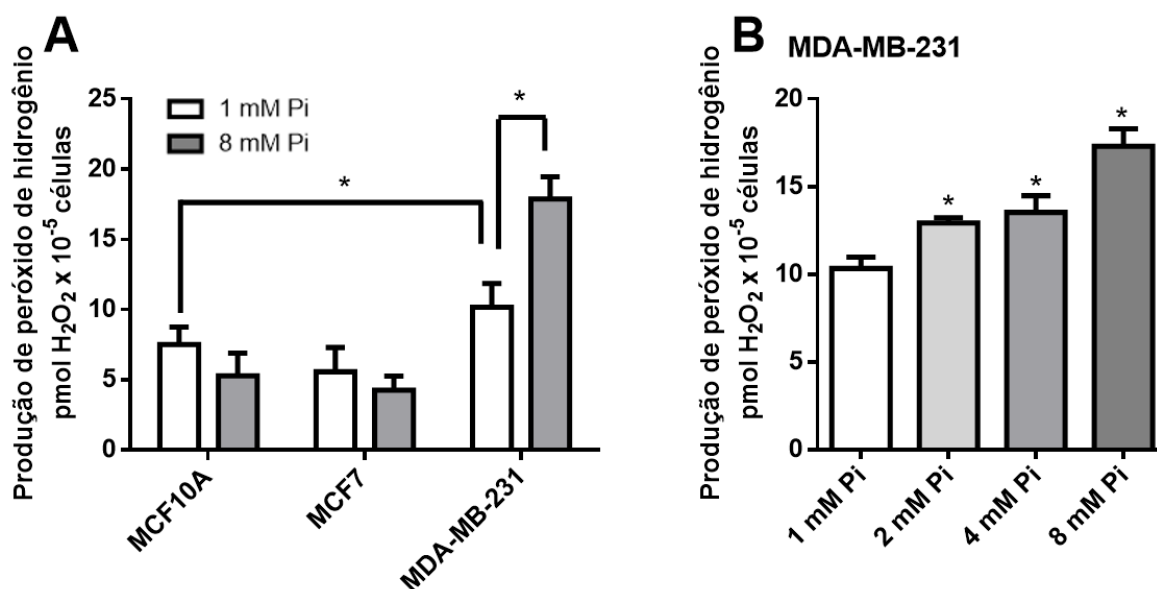


Figura 45: Efeito do elevado Pi na produção de H₂O₂ em diferentes linhagens de mama. Diferentes linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231, foram pré-incubadas em 1 mM Pi (barra branca) e 8 mM Pi (barra cinza) durante 24 h. A produção de H₂O₂ foi mensurada durante 30 min, como descrito na seção de M&M (A). As células MDA-MB-231 foram pré-incubadas em crescentes concentrações de Pi (1, 2, 4 e 8 mM Pi) durante 24 h e a produção de H₂O₂ foi mensurada por 30 min. As barras representam a média ± SE de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * p < 0,05 indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Para demonstrar que o transportador de Pi é necessário para o aumento da produção de H_2O_2 , foi testado o inibidor do transportador de Pi H^+ -dependente (PAA, 1 mM) quando foi adicionado o Pi 1 mM ou Pi 8 mM por 24 h antes de averiguar a produção de H_2O_2 . Foi possível observar um bloqueio total da estimulação da produção de H_2O_2 pelo elevado Pi extracelular (Figura 46), sugerindo que a produção de H_2O_2 , estimulado por Pi, é dependente do transportador de Pi H^+ -dependente.

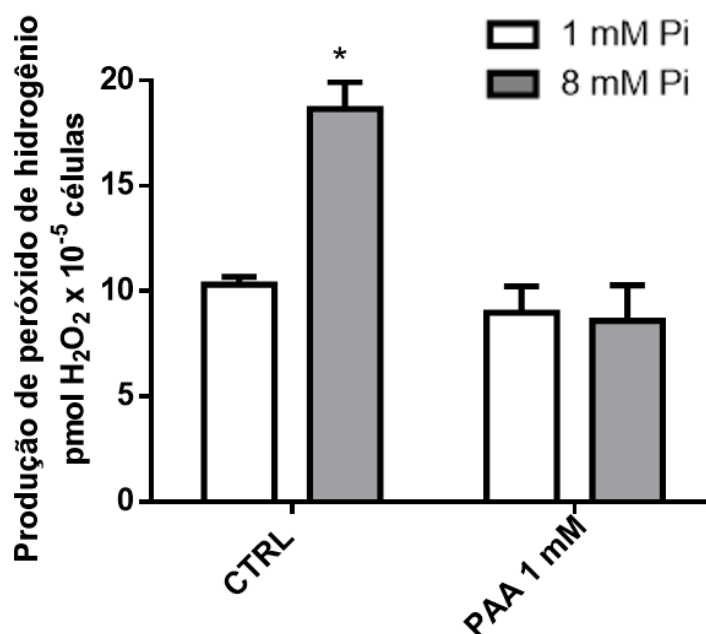


Figura 46: O efeito do elevado Pi na produção de H_2O_2 é dependente do transporte de Pi? As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1 mM Pi (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) por 24 h na ausência (controle), na presença e ausência do PAA (1 mM). O ensaio da produção de H_2O_2 foi realizada durante 30 min como descrito em M&M. Os resultados são médias \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Recentemente foi mostrado por Nguyen e colaboradores (2015) que em células liberadoras de insulina, o aumento do Pi extracelular (5 mM), após 60 minutos, promove o aumento da produção de ERO (NGUYEN, QUAN, *et al.*, 2015). Para garantir que em 24 horas o Pi ainda estaria estimulando a produção de H_2O_2 , células MDA-MB-231 foram incubadas em diferentes tempos com alto Pi (8mM Pi), 1 h (exposição curta) ou 24 horas (exposição longa). A produção de H_2O_2 foi avaliada, mostrando uma estimulação por elevado Pi por 1 h e 50% de estimulação por 24 h (Figura 47).

De modo geral, na Figura 47 mostra que a produção de H_2O_2 aumenta por 1 h ou 24 h de incubação. Antes de averiguar se o H_2O_2 está exercendo efeito nos transportadores de Pi, é preciso identificar qual é a fonte de H_2O_2 e se a fonte na exposição curta ou longa ao alto Pi é a mesma.

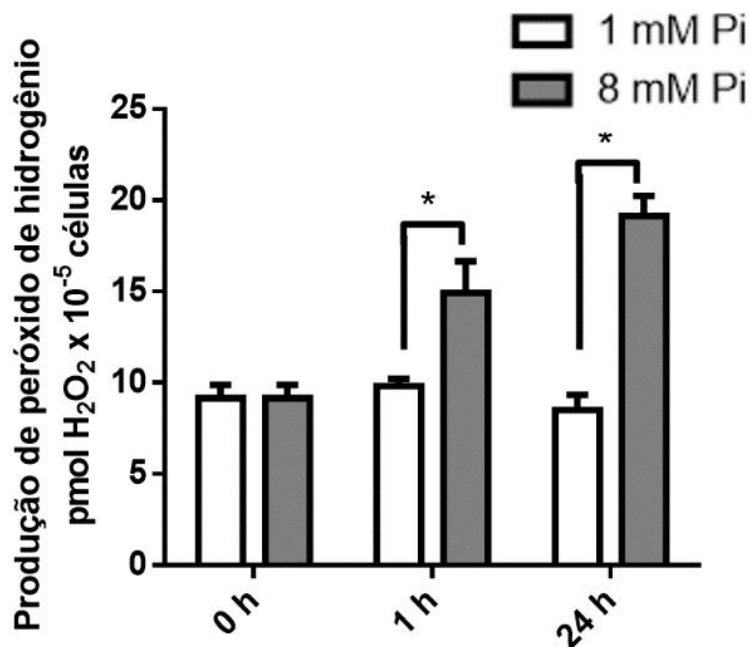


Figura 47: Efeito do alto Pi na produção de H_2O_2 por 1 h ou 24 h. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1 (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) para diferentes tempos de exposição (0 h, 1 h e 24 h) e a produção de H_2O_2 foi realizada num período de 30 minutos, como descrito na seção M&M. Os resultados são médios \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.4.1.1 A fonte da produção de H_2O_2 induzida pela curta exposição ao elevado Pi

A cadeia transportadora de elétrons e a NADPH oxidases transmembrana (NOX) podem ser responsáveis por mais de 50% da produção total de ERO endógena em uma célula (HECHT, PESSOA, *et al.*, 2016). As mitocôndrias podem produzir ERO através do vazamento de elétrons na cadeia respiratória quando são hiperpolarizadas ($\Delta\Psi_m$ alto) (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004). Essa condição resulta na redução parcial do oxigênio para O_2 , que pode ser reduzida espontaneamente a H_2O_2 ou pela ação da superóxido dismutase (SOD) (KIM, KIM e BAE, 2016). Portanto, foi medido em células MDA-MB-231 o $\Delta\Psi_m$ após 1 h ou 24 h de tratamento com elevado Pi (8 mM), através do ensaio MitoProbe JC-1. Os resultados mostraram um aumento de $\Delta\Psi_m$ somente após tratamento de 1h. Curiosamente, para o tratamento crônico, nenhuma modulação foi encontrada (Figura 48 A).

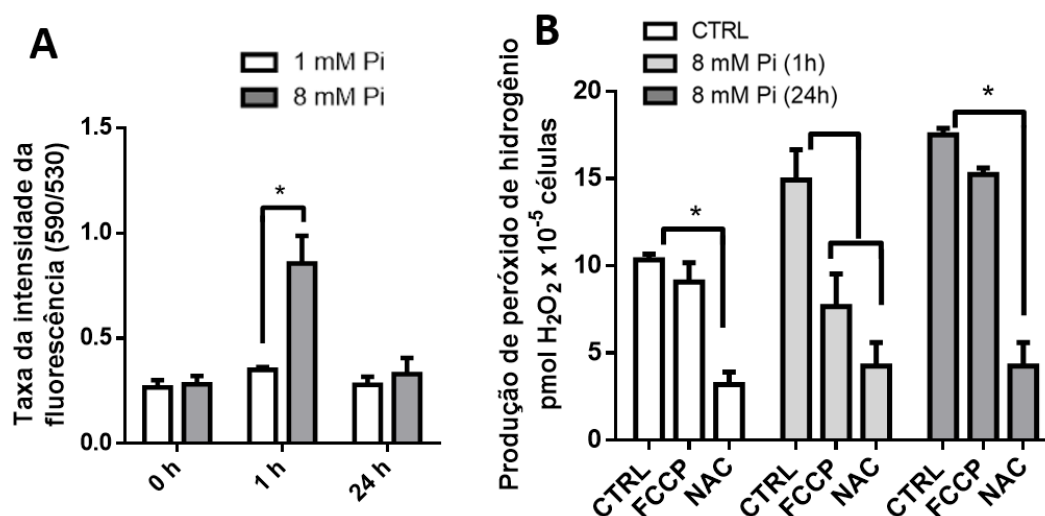


Figura 48: A produção de H₂O₂ é dependente do potencial de membrana mitocondrial? As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1 mM Pi (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) por 1 h ou 24 h. O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi medido com o corante de fluorescência JC-1, como descrito na seção de M&M (A). As células MDA-MB-231 foram tratadas com Pi 1 mM (barras brancas) e Pi 8 mM por 1 h (barras cinza claro) ou Pi 1 mM e Pi 8 mM por 24 h (barras cinza escuro). A produção de H₂O₂ foi avaliada por 30 min na presença de FCCCP (1 μ M) ou NAC (5 mM) (B). As barras representam a média \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Para confirmar que a hiperpolarização da membrana mitocondrial era necessária para a produção observada de H₂O₂ induzida por Pi - em resposta a curta exposição ao Pi (1 h) - pré-tratamos as células com o protonóforo FCCCP, que colapsou o gradiente eletroquímico. A Figura 48 B mostra que a produção de H₂O₂, induzida por Pi em tratamento agudo, foi abolida na presença de FCCCP (1 μ M). Como esperado, o FCCCP não modulou a produção de H₂O₂ sob condição de tratamento crônico. Como controle positivo, utilizamos a N-acetil-cisteína (NAC) eliminadora de ERO total, que mostrou uma redução significativa da produção de H₂O₂, após 1h e 24h de tratamento com elevado Pi (8 mM Pi) (Figura 48 B).

Posteriormente, utilizando as mesmas condições, analisamos o consumo de oxigênio. A Figura 49 A mostra uma diminuição no consumo de oxigênio apenas sob 1 h de tratamento. No entanto, nenhuma modulação foi observada no conteúdo de ATP quando as células foram tratadas com 8 mM de Pi por 1 h ou 24 h (Figura 49 B). Tomados em conjunto os dados da Figura 48 e Figura 49, os resultados indicam que a geração de ERO mitocondrial pode ocorrer sob resposta a curta exposição ao Pi, mas não sob resposta a longa exposição ao elevado Pi.

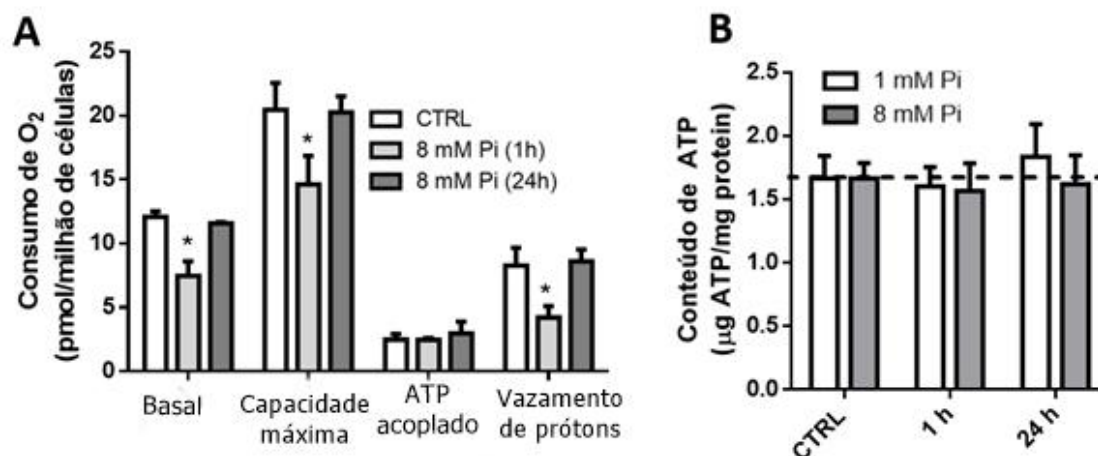


Figura 49: Consumo de O₂ e conteúdo de ATP em elevada concentração de Pi por 1h ou 24 h. As células MDA-MB-231 foram tratadas com Pi 1 mM (barras brancas) e Pi 8 mM por 1 h (barras cinza claro) ou Pi 1 mM e Pi 8 mM por 24 h (barras cinza escuro). O consumo de oxigênio foi realizado em níveis basais, capacidade máxima (1 µM FCCP), ATP acoplado (níveis basais de oxigênio consumo menos valores na presença de 2,6 nM de oligomicina) e vazamento de prótons (2,6 nM de oligomicina) (A). O conteúdo de ATP foi avaliado em células MDA-MB-231, tratadas com 1 mM Pi (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza claro), por 1 h e 24 h, como indicado na abcissa (B). As barras representam a média ± S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * p < 0,05 indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.4.1.2 A fonte da produção de H₂O₂ induzida pela longa exposição ao elevado Pi

Como a mitocôndria parece não ser a responsável pela geração de ERO sob tratamento prolongado (24 h) com alto Pi, foi hipotetizado neste trabalho um possível envolvimento das enzimas NOX na longa exposição ao elevado Pi (24 h, 8 mM Pi) (BEDARD e KRAUSE, 2007); (PARASCANDOLO e LAUKKANEN, 2019). O derivado de triazolo pirimidina, VAS2870 (3-benzil-7-(2-benzoxazolil) tio-1,2,3-triazolo [4,5-d] pirimidina), caracterizado como um inibidor Nox, sem propriedades antioxidantes ou atenuação da xantina atividade de oxidase foi testado (CIFUENTES-PAGANO, MEIJLES e PAGANO, 2014).

Neste trabalho, VAS2870 (10 µM) foi testada na produção de peróxido de hidrogênio em células MDA-MB-231 incubadas por 1 mM Pi (CTRL), 8 mM Pi por 1 h (curta exposição) e 8 mM Pi por 24 h (longa exposição) (Figura 50). Os resultados mostram que 10 µM de VAS2870 não foi capaz de afetar a produção de H₂O₂ induzida por Pi após 1 h de tratamento. No entanto, o VAS2870 anulou a geração de H₂O₂ sob a longa exposição com 8 mM de Pi, aumentando a possibilidade de que a fonte secundária da produção de H₂O₂ induzida por Pi pudesse ser uma fonte via NOX (Figura 50).

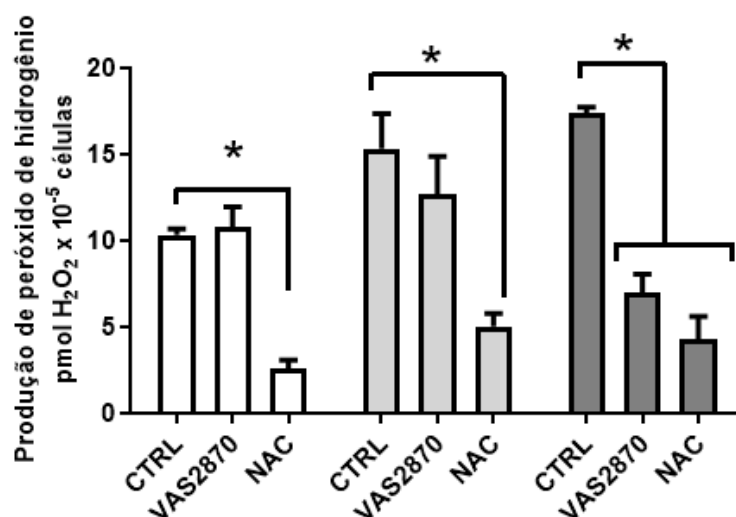


Figura 50: A fonte secundária da produção de H₂O₂ induzida por Pi nas células MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram tratadas com Pi 1 mM (barras brancas), Pi 8 mM por 1 h (barras cinza claro) ou 24 h (barras cinza escuro). A produção de H₂O₂ foi avaliada por 30 min usando Amplex Red na presença de 10 μ M de 2870 e NAC 5 mM. As barras representam a média \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.4.2 Possível regulação dos transportadores de Pi pelo H₂O₂

Na Figura 47, foi mostrado que o elevado Pi extracelular modula a produção de H₂O₂, seja por curta exposição ao Pi (1 h) ou longa exposição ao Pi (24 h). Para averiguar se há uma regulação dos transportadores nesses mesmos tempos de incubação, 8 mM Pi foi adicionado por 1 h ou por 24 h antes de realizar os ensaios de transporte de Pi. Na

Figura 51, foi possível observar que o transporte de Pi Na⁺-dependente foi inibido por 1 h ou por 24 em elevado Pi (Figura 51 A). Ao realizar o mesmo tipo de ensaio no transporte de Pi H⁺-dependente, foi observada uma estimulação em alto Pi extracelular, seja por 1 h ou por 24 h de exposição (Figura 51 B).

Possivelmente o H₂O₂ produzido esteja atuando diretamente nos transportadores. Para avaliar esse possível efeito, concentrações crescentes de H₂O₂ (0-1 μ M) foram adicionadas no meio de reação dos ensaios de transporte de Pi (Figura 52). No ensaio de transporte de Pi Na⁺-dependente, o aumento da concentração de H₂O₂ promoveu uma crescente inibição (Figura 52 A). No caso do transporte de Pi H⁺-

dependente, o aumento da concentração de H_2O_2 foi possível ao observar uma crescente estimulação (Figura 52 B).

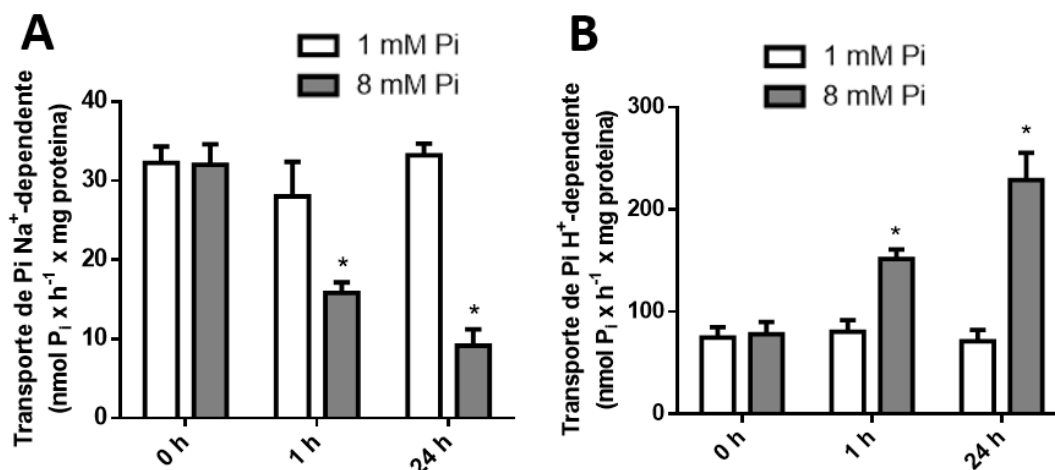


Figura 51: Efeito do alto Pi no transporte Pi Na^+ -dependente ou H^+ -dependente por 1 h ou 24 h. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1 (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) para diferentes tempos de exposição (0 h, 1 h e 24 h). O transporte de Pi Na^+ -dependente (A) ou H^+ -dependente (B) foi realizado por 1 h, como descrito na seção M&M. Os resultados são médios \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

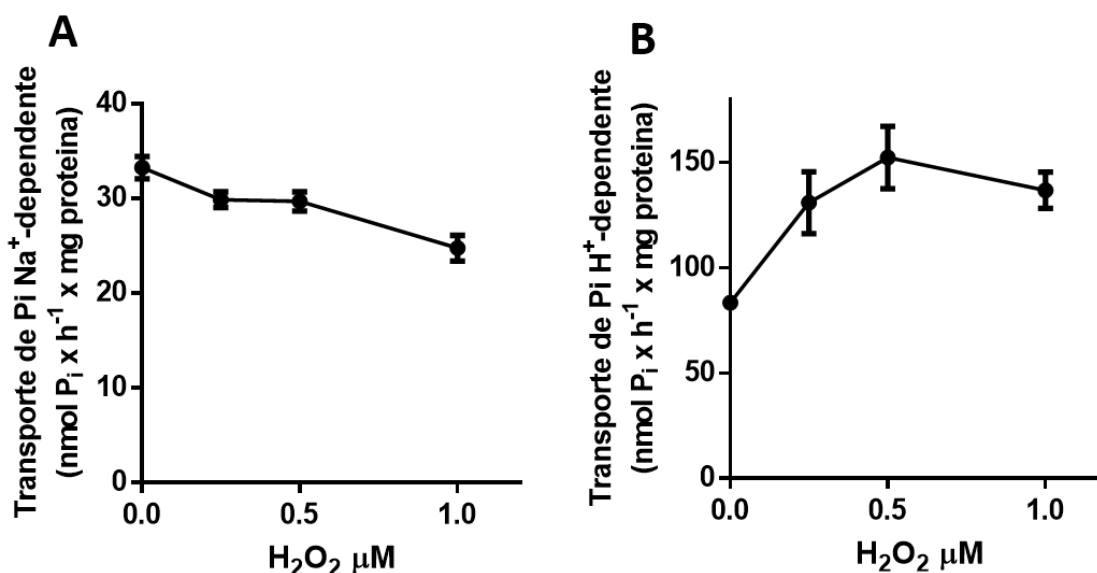


Figura 52: Efeito das concentrações de H_2O_2 no transporte de Pi Na^+ -dependente ou H^+ -dependente. A captação de Pi Na^+ -dependente (A) ou H^+ -dependente (B) foi realizada por 1 h na presença de concentrações aumentadas de H_2O_2 (0-1 μM), adicionadas à mistura de reação, conforme descrito na seção M&M. Os resultados são médios \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes.

Para averiguar se o elevado Pi extracelular estaria regulando os transportadores de Pi através das EROs, o Pi 1 mM ou Pi 8 mM foi incubado nas células MDA-MB-231

por 24 h, na ausência ou presença do NAC (5 mM). Como esperado, a inibição do transporte de Pi Na⁺-dependente foi restaurada aos níveis do controle (Figura 53 A). Enquanto a estimulação do transporte de Pi H⁺-dependente em elevado Pi extracelular foi bloqueada na presença do NAC (Figura 53 B).

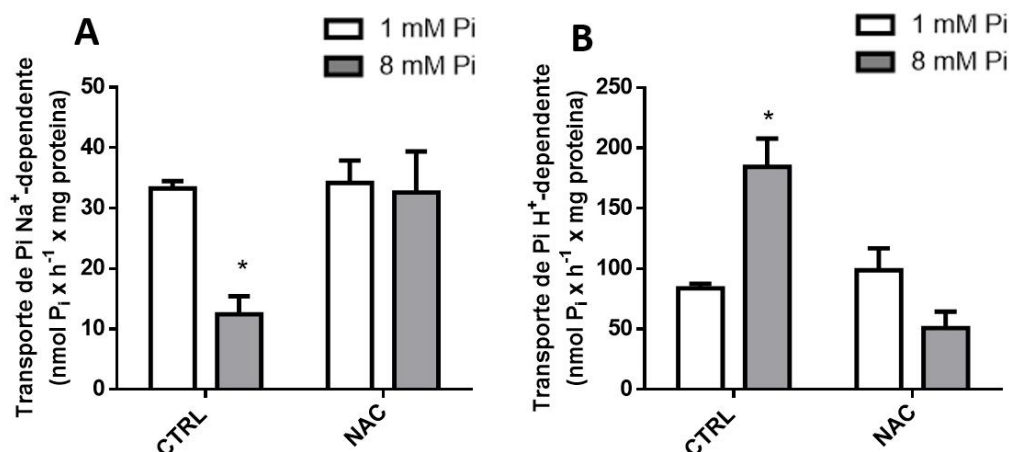


Figura 53: Efeito do NAC no transporte de Pi Na⁺-dependente ou H⁺-dependente. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1mM Pi (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) na ausência (controle) ou na presença de NAC (5 mM) por 24 h. O transporte de Pi Na⁺-dependente (A) e o transporte de Pi H⁺-dependente (B) foram realizados por 1 h conforme descrito na seção M&M. As barras representam a média \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.4.3 Influência do elevado Pi extracelular para o fenótipo migratório

Lin et al. (2014), mostrou aumento da migração celular em células MDA-MB-231 sob altas concentrações de Pi (3 ou 5 mM de Pi) (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015). Utilizando a mesma linhagem celular, foi demonstrado que o transportador de Pi Na⁺-dependente e o transportador de Pi H⁺-dependente estão relacionados à capacidade migratória (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

Aqui, foram avaliadas a migração e a adesão celular em concentrações crescentes de Pi (1, 2, 4 e 8 mM Pi) em diferentes linhagens celulares da mama. Como mostrado na Figura 54, somente células MDA-MB-231 apresentaram adesão e migração celular estimuladas por alto Pi (Figura 54 A e B).

O transportador de Pi H⁺-dependente possui uma baixa afinidade pelo Pi (transporta mais Pi em elevada concentração de Pi), portanto, acredita-se que este seja essencial para a indução da migração e adesão celular quando é pelo alto Pi.

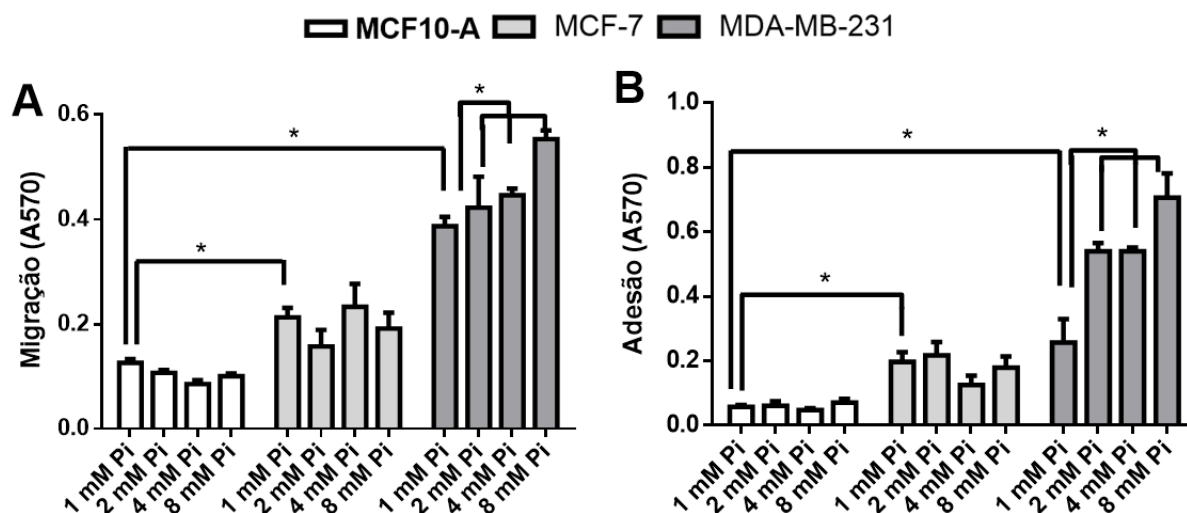


Figura 54: Efeito do elevado Pi na migração e adesão em diferentes linhagens de mama. MCF10-A (barras em branco), MCF-7 (barras em cinza) e MDA-MB-231 (barras em cinza escuro) foram tratadas em várias concentrações de Pi (1, 2, 4 e 8 mM de Pi) durante 24 h. A migração (A) e adesão celular (B) foram feitas durante 24 h, como descrito na seção M&M. O conteúdo de células migradas e adesão são expressos em absorbância (570 nm) do rompido celular corado com cristal violeta. Os resultados são médias \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Portanto, como foi mostrado anteriormente que o transporte de Pi H^+ -dependente é estimulado em alto Pi, ao adicionar inibidores do transporte de Pi PFA e PAA, apenas o PAA foi capaz de bloquear a estimulação do transporte de Pi H^+ -dependente em elevado Pi (Figura 55 A). Este resultado mostra que a estimulação do transporte H^+ -dependente não recebeu influência do transporte de Pi Na^+ -dependente. Pelo fato de o transporte Na^+ -dependente ser inibido em alto Pi, não foi avaliado esse efeito com inibidores.

Feito isso, a migração e adesão celular foram testadas em 1 mM Pi e 8 mM Pi na ausência ou presença de PAA (Figura 55 B e C), em que o PAA foi capaz de abolir a estimulação do elevado Pi, sugerindo que o transportador de Pi H^+ -dependente seja essencial para a estimulação da migração e adesão celular.

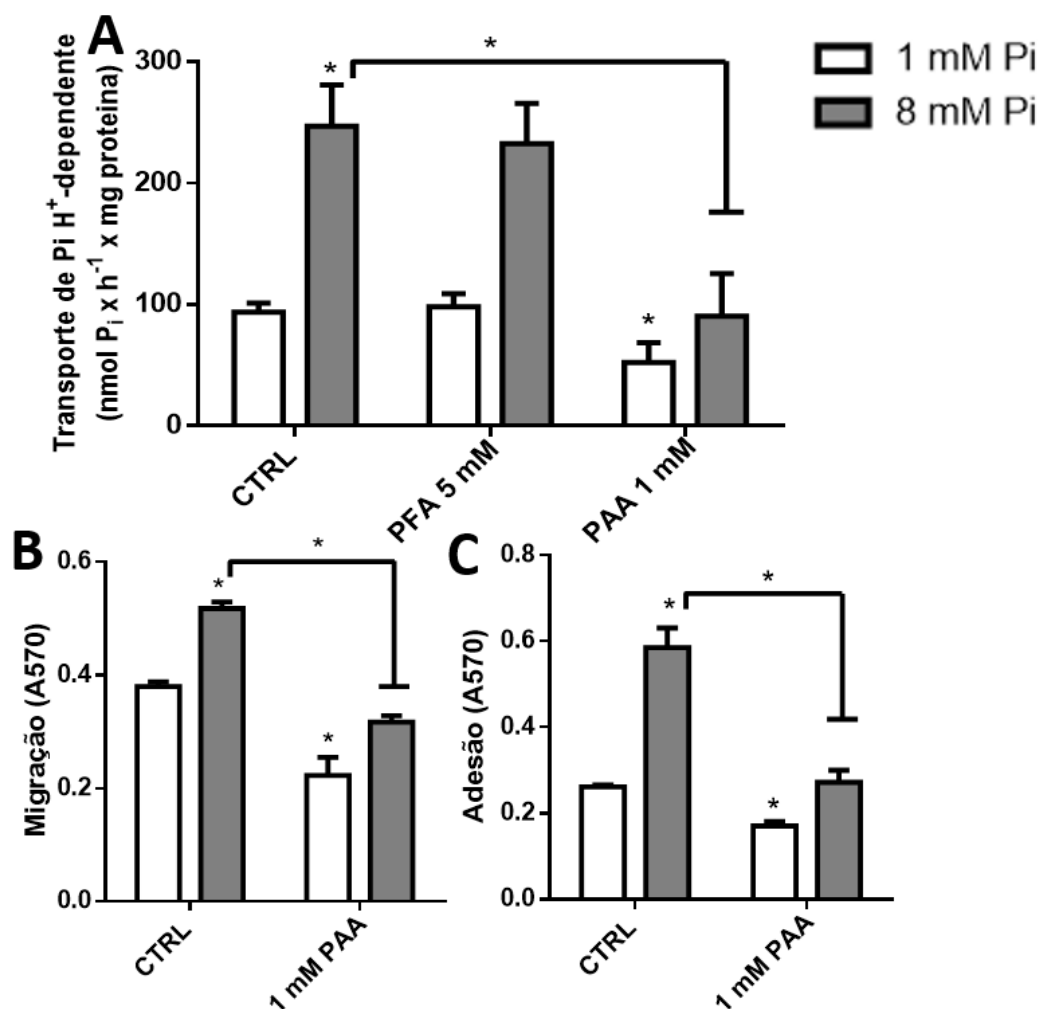


Figura 55: O efeito do elevado Pi na migração e adesão celular é dependente do transporte de Pi. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1 mM Pi (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) por 24 h (controle). Após a incubação, o transporte de Pi H⁺-dependente foi realizado por 1 h na presença do inibidor do transporte Na⁺-dependente, PFA e na presença do inibidor do transporte de Pi H⁺-dependente, PAA (A). Migração (B) e adesão (C) celular foram feitas na presença de 1 ou 8 mM Pi e na ausência ou presença do PAA. Os resultados são médias ± S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * p < 0,05 indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Possivelmente o bloqueio por PAA da migração e adesão em alto Pi seja diminuir a quantidade de Pi intracelular e deixar de fornecer Pi para abastecer as necessidades energéticas de uma célula metastática (ZANOTELLI, GOLDBLATT, *et al.*, 2018); (VAN-HORSSEN, JANSSEN, *et al.*, 2009).

Na Figura 53 demonstrou que o H₂O₂ possivelmente atuaria como um regulador direto do transportadores de Pi e, ao adicionar o NAC, esse efeito é revertido. Além disso, H₂O₂ é um estimulador potente de processos metastáticos e da transição epitélio mesenquimal (CICHON e RADISKY, 2014); (LEE, JU, *et al.*, 2019). Aqui foi realizado um replot dos valores obtidos na Figura 45 B e Figura 55, mostrando uma co-relação entre

a migração (Figura 56 A) e a adesão celular (Figura 56 B) com a produção de H_2O_2 em células MDA-MB-231.

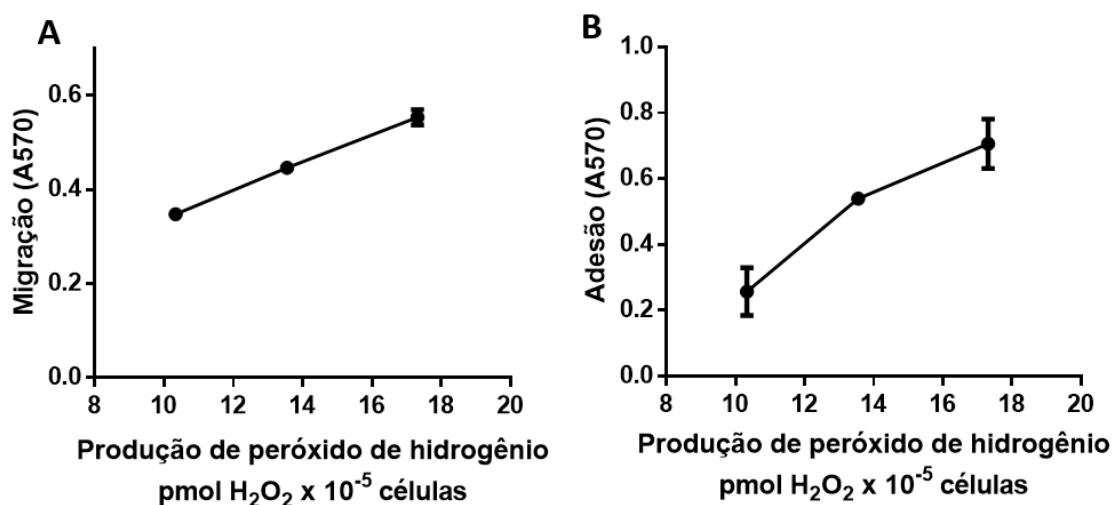


Figura 56: Realocação dos valores de migração e adesão celular em relação a produção de H_2O_2 . Valores obtidos na Figura 45 B e Figura 55 foram para sugerir uma correlação entre migração/adesão com a produção de H_2O_2 na linhagem celular MDA-MB-231.

Para demonstrar o papel do H_2O_2 induzido por Pi para estimulação da migração e adesão, 5 mM de NAC foi adicionada em 1 ou 8 mM Pi por 24 h (Figura 57). Foi possível observar na migração e adesão uma abolição do estímulo do elevado Pi (Figura 57 A e B), demonstrando uma participação do H_2O_2 induzido por Pi para estimulação da migração e adesão celular.

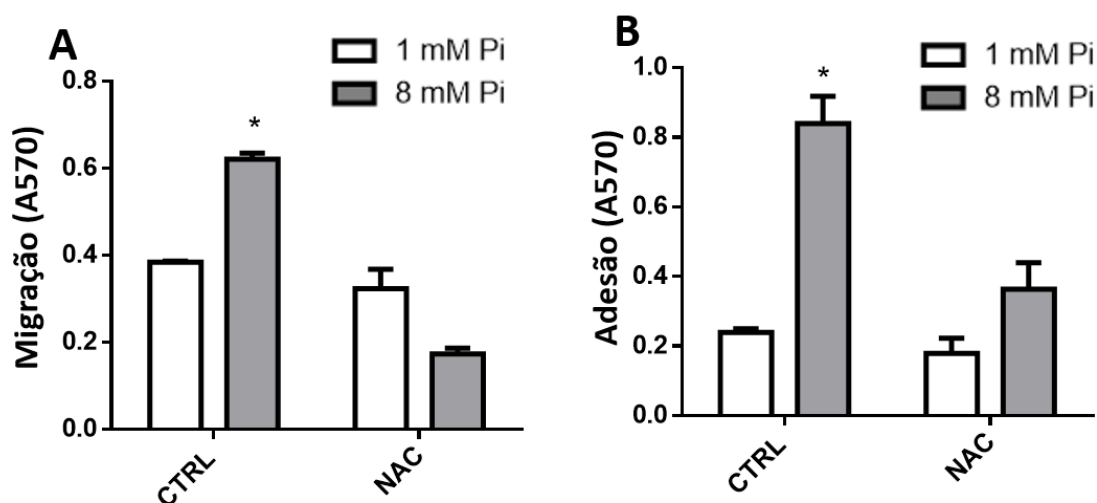


Figura 57: Efeito do NAC na migração e adesão celular induzido por Pi em células MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 1 (barras brancas) ou 8 mM Pi (barras cinza) na ausência (controle) ou na presença de NAC (5 mM) por 24 h. Migração (A) e adesão (B) foram realizadas conforme descrito na seção M&M. As barras representam a média \pm S.E. de pelo menos 3 amostras biológicas independentes. * $p < 0,05$ indica alterações estatisticamente diferentes, avaliadas pela ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

5 DISCUSSÃO

5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Papaloucas *et al.* (2014) mostraram que pacientes com câncer têm o nível sérico de Pi mais alto ($2,52 \pm 0,72$ mmol/L) em comparação com indivíduos saudáveis ($1,09 \pm 0,19$ mmol/L) (PAPALOUCAS, PAPALOUCAS, *et al.*, 2014). Este nível sérico com alto Pi seria necessário devido à hipótese da taxa de crescimento e à progressão tumoral (ELSER, STERNER, *et al.*, 2000).

Recentemente, foi levantada a hipótese por Brown (2019) de que durante a hiperemia inflamatória, a taxa de fluxo sanguíneo e o volume sanguíneo, juntamente com hiperfosfatemia (uma concentração sérica de fosfato superior a 1,45 mM), promovem a tumorigênese, principalmente por causa da HTC (BROWN, 2019).

No câncer de pulmão, a alta ingestão de Pi (dieta fortificada com 1,0% de Pi) levou à progressão do tumor pulmonar pela via reguladora do Akt-mTOR (JIN, XU, *et al.*, 2009). No câncer de pele, uma dieta fortificada com 1,2% de Pi em camundongos mostrou a promoção da tumorigênese através da ativação de uma via de sinalização composta por ras e ERK1/2 (CAMALIER, YOUNG, *et al.*, 2010).

Portanto, para avaliar o efeito do elevado Pi em células de câncer de mama, foi escolhido 1 mM de Pi como controle, devido à concentração base de Pi sérico em pessoas saudáveis e diferentes concentrações de Pi acima da base como condições elevadas de Pi (2, 4 e 8mM). As concentrações de Pi 2 mM Pi e Pi 4 mM foram escolhidas como valores representativos da faixa de Pi sérico em pacientes com câncer: Pi $2,52 \pm 0,72$ mM (PAPALOUCAS, PAPALOUCAS, *et al.*, 2014). Uma maior concentração de Pi (8mM), embora fora da faixa sérica de Pi em pacientes com câncer, mostrou uma maior regulação dos transportadores de Pi e da produção de H₂O₂; por esse motivo foi escolhida em alguns testes para uma análise experimental mais acessível.

Em relação ao modelo biológico aplicado neste trabalho, foram utilizadas células *in vitro* de mama, assim como em outros estudos para demonstrar o papel de uma determinada enzima ou um determinado efeito (BOUDREAU, CASTERLINE, *et al.*, 2012); (BOWEN e LEVISON, 1986); (CAMALIER, YOUNG, *et al.*, 2010) (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014); (DI MARCO, HAUSBERG, *et al.*, 2008); (ITO, MATUKA, *et al.*, 2005); (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018); e (SARMIENTO-SALINAS, DELGADO-MAGALLÓN, *et al.*, 2019). Embora não seja totalmente representativo de um apurado efeito biológico, as linhagens celulares *in vitro* são amplamente utilizadas como indicador para resposta e sensibilidade às drogas e

identificação de novos alvos terapêuticos para posteriores estudos em modelos *in vivos* complexos (DAI, CHENG, *et al.*, 2017).

Para os objetivos deste trabalho, a necessidade de utilizar as linhagens celulares *in vitro* foram por três motivos: 1) Facilidade comparativa entre uma linhagem não tumoral para uma linhagem tumoral; 2) Um melhor direcionamento para associação com o subtipo molecular de uma paciente com câncer de mama e 3) Uma possível correlação entre os potenciais metastáticos entre as linhagens celulares, por exemplo, a linhagem MDA-MB-231 tem um maior potencial metastático que a linhagem MCF-7 (Figura 12), identificando características que fornece um maior potencial metastático à linhagem MDA-MB-231, que seja ausente ou pouco frequente na linhagem MCF-7 (NEVE, CHIN, *et al.*, 2006). Portanto, a linhagem não-tumoral de mama MCF10-A e as linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram utilizadas como modelos para identificar e caracterizar uma ecto-fosfatase, uma possível fonte produtora de Pi, como também para caracterizar os transportadores de Pi.

5.2 PRODUÇÃO DE PI EXTRACELULAR NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA: PARTICIPAÇÃO DAS ECTO-FOSFATASES

Por o Pi ser uma molécula aniônica, sua captação do meio extracelular para o citosol é mediada por transportadores (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013), o que foi recentemente descrito no câncer de mama (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). As ecto-fosfatases também podem participar do processo de obtenção de Pi, pois essas enzimas catalisam a hidrólise de moléculas fosforiladas, liberando Pi livre (ZIMMERMANN, 2000). As moléculas fosforiladas podem ser fosfoproteínas presentes no ambiente extracelular, eventualmente se tornando substratos para a atividade da ecto-fosfatase.

Qual é a necessidade de uma célula cancerosa ter uma ecto-fosfatase? Sabe-se que as células tumorais têm um alto requerimento energético, possivelmente para fornecer energia extra para permitir a proliferação e metástase celular. Portanto, as células dependem de um pool de Pi para suportar tais mecanismos (MORENO-SÁNCHEZ, RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, *et al.*, 2007); (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017); (BROWN e RAZZAQUE, 2018). O Pi desempenha papéis importantes nas reações que envolvem intermediários metabólicos (SAPIO e NAVIGLIO, 2015). Assim, a fim de obter Pi, ecto-fosfatases na membrana plasmática, com seu sítio catalítico voltado para o ambiente extracelular, poderiam desfosforilar moléculas fosforiladas, que é uma etapa inicial e

possivelmente limitante para os transportadores de Pi e, assim, abastecer o Pi relacionado com demanda energética tumoral (SAPIO e NAVIGLIO, 2015). Com base nos resultados mostrados na Figura 26, sugere-se que o aumento da atividade da ecto-fosfatase pode ter correlação com a progressão do câncer de mama. Nesse caso, a liberação de Pi estaria em consonância com uma maior demanda de Pi na célula tumoral mais metastática, MDA-MB-231 (NEVE, CHIN, *et al.*, 2006).

Existe um gene expresso responsável pela atividade ecto-fosfatase ácida? A fosfatase ácida prostática (PAP) é atualmente usada como um alvo na terapia do câncer de próstata (ZIMMERMANN, 2009). Existem duas formas de PAP, secretora e não secretora, com diferentes pontos isoelétricos e pesos moleculares (QUINTERO, ARAUJO, *et al.*, 2017). Recentemente, uma nova variante de PAP que codifica uma proteína transmembrana com atividade de fosfatase extracelular (TM-PAP) foi identificada em vários tecidos, como cérebro, rim, fígado, pulmão, placenta, glândula salivar, baço, tireoide e timo (QUINTERO, ARAUJO, *et al.*, 2017). Neste trabalho, não foi avaliada a expressão desses genes. Uma possível abordagem que contribuiria e continuaria com os resultados obtidos neste trabalho é silenciar o gene para PAPsec e TM-PAP com os respectivos controles e analisar a atividade ecto-fosfatásica, podendo assim apontar que possivelmente o gene para TM-PAP seria responsável pela atividade ecto-fosfatásica.

Por questões metodológicas, a enzima secretada no sobrenadante poderia contribuir parcial ou totalmente para uma atividade ecto-fosfatásica. Não é fortemente sugerida a participação da forma secretada para atividade ecto-fosfatásica pelos seguintes motivos:

1) Em células de câncer de mama (MDA-MB-231), observamos que a atividade da ecto-fosfatase é predominante no ambiente extracelular em comparação à atividade da fosfatase secretada para a hidrólise do p-NPP (Figura 26 A e B).

2) O tartarato, inibidor da fosfatase secretada, não teve efeito sobre a atividade da fosfatase (Figura 27 A e B), corroborando o resultado anterior da Figura 26, que mostrou baixa atividade da fosfatase secretada e afastando-se, inclusive, da noção de que a atividade da fosfatase secretada interfere na atividade da ecto-fosfatase.

3) A célula poderia perder a viabilidade por alguma condição experimental e as fosfatases citosólicas poderiam contribuir para a atividade ecto-fosfatásica, no entanto, as células estavam vivas durante os experimentos, conforme detectado por ensaios de viabilidade.

Neste trabalho, foram mostradas as principais características cinéticas da ecto-fosfatase em células de câncer de mama: atividade linear ao longo do tempo (pelo menos até 60 minutos) com perfil cinético Michaelis-Menten e maior atividade em condições de pH mais ácidas. É plausível especular se o lactato derivado da glicólise contribui para a acidificação da vizinhança celular imediata, aumentando assim a atividade da ecto-fosfatase. A atividade da ecto-fosfatase aqui descrita apresentou um alto valor de K_m (Figura 28 B).

Levamisol, um inibidor da fosfatase alcalina, não teve efeito sobre a atividade da ecto-fosfatase, corroborando os resultados que mostram menor atividade da ecto-fosfatase em condições de pH alcalino e descartando a hipótese de atividade da ecto-fosfatase alcalina. Os inibidores de fosfatase ácida molibdato de amônio e ortovanadato de sódio foram capazes de inibir a atividade da ecto-fosfatase, confirmando a hipótese de que se trata de uma ecto-fosfatase ácida.

Outro fator a ser destacado é que o ortovanadato de sódio, um análogo do fosfato, foi capaz de inibir a atividade da ecto-fosfatase e a proliferação, migração e adesão das células MDA-MB-231. O ortovanadato de sódio é um inibidor geral de tirosina fosfatases conhecido por ter atividade antiproliferativa e antineoplásica, bem como exibe atividades anticâncer em algumas linhas de células cancerosas humanas (DELWAR, AVRAMIDIS, *et al.*, 2012); (TIAN, FAN, *et al.*, 2016). É importante ressaltar que o vanadato pode alterar outros processos mediados por ortofosfato, pois é um potente inibidor das P-ATPases que medeia o transporte de cátions (CUNHA, MEYER-FERNANDES e NOEL, 1992). No entanto, o vanadato não é um bom inibidor dessas enzimas em células intactas porque as reações de redução da oxidação que ocorrem no citoplasma diminuem seu efeito inibitório (CANTLEY e AISEN, 1979); possivelmente, enzimas extracelulares ou com sítios catalíticos voltados para o ambiente extracelular seriam boas candidatas para o ortovanadato de sódio.

Qual seria o substrato para a atividade ecto-fosfatásica no microambiente tumoral? Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) para atividade da ecto-fosfatase foram obtidos usando o substrato fosforilado artificial pNPP, um análogo da fosfotirosina. Os substratos naturais fosforilados fora das células em microambientes tumorais ainda precisam ser elucidados. No entanto, as moléculas fosforiladas que são prováveis candidatas naturais a substratos podem ser fosfoproteínas presentes no microambiente extracelular (CHEN, LU, *et al.*, 2009). O estudo realizado por (CHEN, LU, *et al.*, 2009), por análise de fosfoproteômica, identificou os principais reguladores para adesão e

migração de células cancerosas, entre eles está a fosfotirosina, fosfotreonina e fosfoserina (CHEN, LU, *et al.*, 2009).

Neste trabalho, as células do câncer de mama (MDA-MB-231) foram capazes de hidrolisar três tipos de aminoácidos fosforilados: p-tirosina, p-treonina e p-serina. O ortovanadato de sódio, um inibidor da fosfatase ácida da tirosina, mostrou forte inibição da atividade do ecto-fosfato. O ortovanadato de sódio só foi capaz de inibir a hidrólise de *p*-NPP e p-tirosina. Uma explicação para esse resultado é que o *p*-NPP tem um grupo fosfato ligado ao anel aromático, semelhante à p-tirosina, mas diferente da p-serina e da p-treonina. Isso leva à suposição de que *p*-NPP e p-tirosina são hidrolisados pelo mesmo sítio catalítico. Para esclarecer essa questão, foi demonstrado que apenas uma p-tirosina foi capaz de inibir a hidrólise de p-NPP em concentrações crescentes de p-aminoácidos (Figura 29 B).

Qual é a correlação da ecto-fosfatase com os processos tumorais de mama além das ecto-enzimas já descritas? Os principais resultados do presente trabalho são uma correlação estrita entre a inibição de *p*-NPP e hidrólise de fosfotirosina (Figura 29), bem como a inibição da proliferação, migração e adesão (Figura 30) por ortovanadato de sódio. Portanto, é provável que a desfosforilação de resíduos de tirosina em moléculas fosforiladas no microambiente tumoral possa estar envolvida em processos metastáticos.

Recentemente, foi demonstrado um transportador de Pi Na⁺-dependente (com alta afinidade para Pi) e um transportador de Pi dependente de H⁺ (com baixa afinidade para Pi), ambos participam na obtenção de fosfato para células de tumor de mama (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). Além de NTPDases, NPPs, ecto-5'-nucleotidases e ALP já descritas em câncer de mama (DO CARMO ARAÚJO, ROCHA, *et al.*, 2005); (YANG, LEE, *et al.*, 2002); (NATHANSON e FISHMAN, 1971), a fosfatase ácida deve ser considerada outra enzima importante para a liberação de Pi no microambiente tumoral, possivelmente capturada por transportadores de Pi (Figura 58) para atender à alta demanda de Pi necessária para a proliferação celular, adesão e migração.

As reações de desfosforilação catalisadas por ecto-fosfatases podem estar envolvidas na proliferação de células cancerosas. Observamos que a proliferação, adesão e migração celular foram afetadas na presença do inibidor da ecto-fosfatase ortovanadato de sódio (Figura 30). O ortovanadato de sódio pode inibir a atividade ecto-fosfatásica por meio da inibição de sua capacidade de hidrólise e geração de fosfato inorgânico. O ortovanadato de sódio já foi descrito como um inibidor da proteína tirosina fosfatase (DELWAR, AVRAMIDIS, *et al.*, 2012); (TIAN, FAN, *et al.*, 2016). Em células MDA-MB-231, o ortovanadato de sódio pode agir de forma semelhante contra a atividade ecto-fosfatásica. No entanto, nenhum estudo mostrou o mecanismo molecular subjacente à inibição do ortovanadato de sódio das ecto-fosfatases.

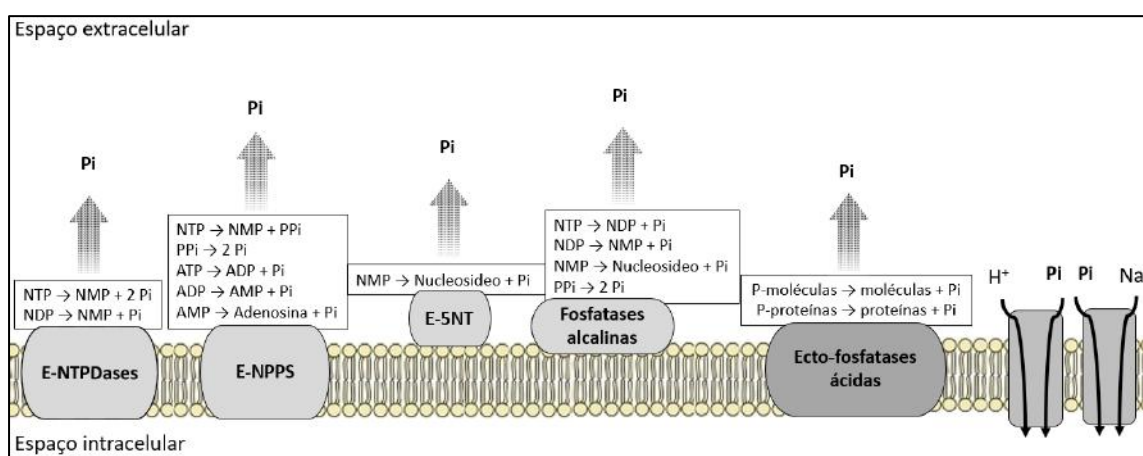


Figura 58 - O papel das ectoenzimas na geração de Pi no microambiente tumoral de câncer de mama. Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) catalisam a desfosforilação de nucleotídeo trifosfato (NTP) e nucleotídeo difosfato (NDP) (DO CARMO ARAÚJO, ROCHA, *et al.*, 2005) (ZIMMERMANN, 2000). A fosfodiesterase/fosfodiesterase (E-NPPs) catalisam a desfosforilação de NTP. Além disso, NPP2 catalisa ATP, ADP, AMP e desfosforilação PPi (YANG, LEE, *et al.*, 2002); (ZIMMERMANN, 2000). A ecto-5-nucleotidase (E-5NT) catalisa a desfosforilação do nucleotídeo monofosfato (NMP) (DO CARMO ARAÚJO, ROCHA, *et al.*, 2005) (ZIMMERMANN, 2000). A fosfatase alcalina catalisa a desfosforilação de NTP, NDP, NMP e PPi (NATHANSON e FISHMAN, 1971) (ZIMMERMANN, 2000). A ecto-fosfatase ácida catalisa a desfosforilação de moléculas fosforiladas (P-moléculas) e proteínas fosforiladas (P-proteínas). O Pi liberado pelas enzimas ecto-nucleotidase e ecto-fosfatase é captado por transportadores de Pi (Na^+ -dependente ou H^+ -dependente) em células de câncer de mama (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

Por enquanto, esses dados sugerem que a adesão e migração celular podem ser dependentes de Pi intracelular. Consequentemente, eles poderiam estar diretamente associados a proteínas que captam Pi, o que é consistente com a observação de que a atividade da ecto-fosfatase é muito maior em células mais metastáticas.

5.3 TRANSPORTADOR DE P_i H^+ -DEPENDENTE: IDENTIFICAÇÃO E UMA CORRELAÇÃO COM A METÁSTASE

Recentemente, foi caracterizado o transportador de P_i Na^+ -dependente de alta afinidade em células MDA-MB-231 (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). No trabalho realizado por (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018), baixas concentrações de P_i (100 μ M) foram usadas para os ensaios de transporte de P_i . Aqui, P_i 1mM foi utilizado em ensaios de transporte de P_i para caracterizar um transportador de P_i H^+ -dependente que responde a altas concentrações de P_i . Com base nos resultados mostrados na Figura 31, sugerimos que o aumento do transporte de P_i H^+ -dependente pode contribuir para uma maior capacidade migratória. Nesta situação, o elevado transporte de P_i estaria de acordo com uma maior demanda por P_i relacionado com a alta demanda do metabolismo energético das células tumorais. Propomos então que existe outro componente cinético responsivo a altas concentrações de P_i em células de câncer de mama, o qual foi analisado em detalhes.

Qual é a diferença desse transportador para o transportador Na^+ -dependente já caracterizado? Os resultados deste trabalho mostraram que a influência do sódio e do potássio pode ser descartada com base em experimentos nos quais valinomicina, monensina e PFA foram usados (Figura 34 A). Além disso, o transporte de P_i H^+ -dependente foi linear por até 40 min (Figura 32 A) e exibiu uma cinética de Michaelis-Menten exibindo baixa afinidade para fosfato inorgânico (Figura 32 C e D). O resultado, comparado com a Tabela 4, pode afirmar que se trata de um transportador de baixa afinidade. Presumivelmente, este transporte de P_i de baixa afinidade torna-se operativo quando os níveis de P_i no microambiente tumoral aumentam para 2 mM, contribuindo assim para absorver o excesso de P_i quando o transportador de P_i Na^+ -dependente está saturado, com $K_m = 0,08$ mM P_i e $V_{max} = 71,67 \pm 3$ nmol \times h⁻¹ \times (mg de proteína)⁻¹ (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

Candeal e colaboradores (2014) caracterizaram um transporte de P_i dependente de H^+ em células intestinais humanas (Caco2BBE) (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014) e observaram que o transporte de P_i foi influenciado por ânions, sugerindo que o P_i poderia ser absorvido junto com outros ânions. Em nosso estudo, nenhum efeito foi observado quando ânions e um inibidor do transportador de ânions (DIDS) foram testados no transporte de P_i H^+ -dependente em MDA-MB-231 (Figura 33). Esses resultados sugerem que a absorção de P_i pelas células do câncer de mama não é envolvida com um transportador de ânions.

O pH extracelular pode ser acidificado pela secreção de lactato e H^+ promovido pelo transportador de monocarboxilato 4 (MCT) em células cancerosas. Isso pode ser relevante para nossas observações no sentido de que um maior transporte de Pi ocorreu na faixa de pH ácido, sugerindo que o transportador putativo é dependente de H^+ ou que tem maior afinidade para Pi em sua forma protonada (H_3PO_4). Resultados semelhantes foram encontrados por Ito e colaboradores (2005) que estudaram um transportador de Pi dependente de H^+ envolvido na captação de Pi durante a reabsorção óssea em células semelhantes a osteoclastos (ITO, MATUKA, *et al.*, 2005). Para demonstrar a ocorrência de um transportador de Pi próton-dependente, o pH intracelular foi quantificado na presença de fosfato. Os resultados da Figura 35 mostraram que de fato houve uma redução no pH intracelular após a adição de fosfato inorgânico. Esses resultados indicaram que, após a adição de fosfato, prótons presentes no ambiente extracelular podem ser transportados juntamente com o fosfato inorgânico por um co-transportador de Pi dependente de H^+ , contribuindo para a acidificação do ambiente intracelular.

A bafilomicina A1 - um inibidor de uma H^+ -ATPase vacuolar que pode estar localizada na membrana plasmática (responsável pelo bombeamento de H^+ para o ambiente extracelular) ou na membrana de vacúolo (bombeamento de H^+ para o lúmen vacuolar) - foi capaz de inibir o transporte de Pi H^+ -dependente (Figura 34 A). Além disso, o transporte de Pi H^+ -dependente foi inibido por FCCP (ionóforo de H^+) e SCH28080 (inibidor de H^+ , K^+ -ATPase) (Figura 34 A). Coletivamente, esses resultados indicam um papel para a H^+ -ATPase vacuolar e uma H^+ , K^+ -ATPase na regulação do mecanismo de transporte Pi e H^+ (Figura 59).

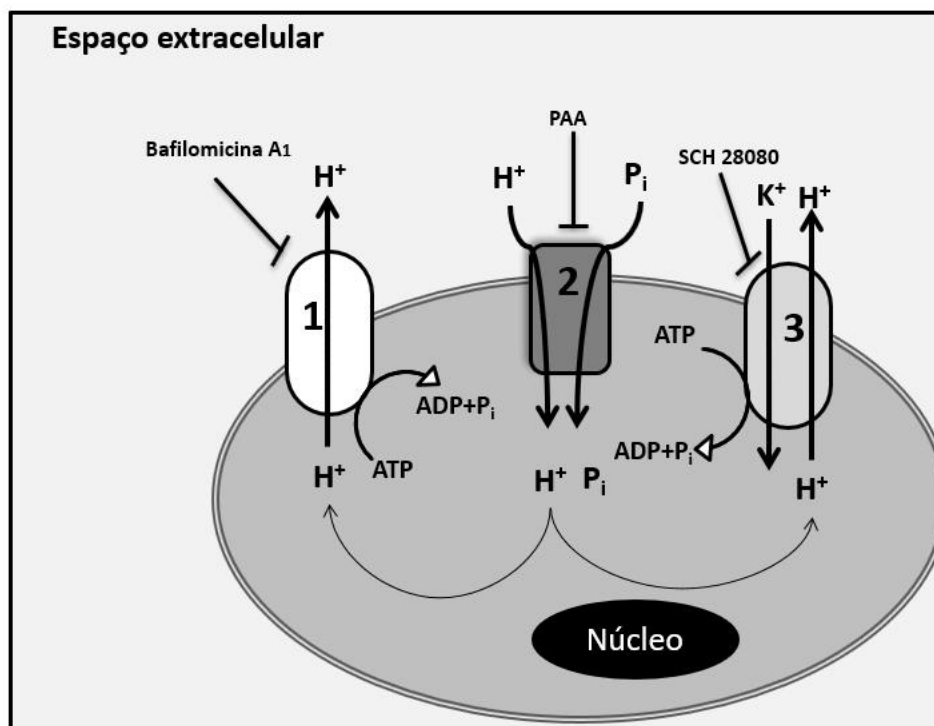


Figura 59 - Mecanismo proposto para o transportador de Pi H^+ -dependente em MDA-MB-231. H^+ , K^+ -ATPase, sensível a SCH28080 na membrana plasmática e H^+ -ATPase, sensível a bafilomicina A1 na membrana plasmática acopladas ao transportador de Pi dependente H^+ .

Existe um inibidor para o transportador de Pi H^+ -dependente como existe para o transportador de Pi Na^+ -dependente? Russo-Abrahão e colaboradores (2018) mostraram que o PFA inibe o transporte de Pi Na^+ -dependente (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). No transporte de Pi H^+ -dependente, nenhum efeito da presença do PFA foi observado (Figura 34). No entanto, ao procurar outro inibidor do transporte de Pi pertencente à mesma classe de PFA (ácidos fosfoenolcarboxílicos), foi mostrado que o PAA foi capaz de inibir o transporte de Pi H^+ -dependente (Figura 34). Uma possível explicação mecanicista para este resultado é que o PFA se ligou ao fósforo e seus três íons de sódio. Isso aumentaria sua afinidade para o transportador Pi dependente de sódio ligado aos três íons de sódio Pi (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013). Por outro lado, o PAA é um composto que possui fósforo ligado ao oxigênio e uma hidroxila em suas extremidades; na ausência de sódio e, sendo estruturalmente semelhante ao fosfato inorgânico, esta molécula pode ser capaz de inibir competitivamente o transporte de Pi H^+ -dependente.

Qual é a relação do transportador de Pi H^+ -dependente para os processos tumorais? O Pi desempenha um papel crítico em vários tipos de células, participando do metabolismo energético e da síntese de ácidos nucleicos (SAPIO e NAVIGLIO, 2015). Nas células tumorais, o fosfato é necessário para suas taxas de crescimento rápidas, de

acordo com a HTC (ELSER, STERNER, *et al.*, 2000). Foi demonstrado que Pi 3 e 5mM foram capazes de estimular a migração de células MDA-MB-231 em comparação com células normais cultivadas Pi 1mM (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015). Embora o PAA tenha sido relatado por afetar a síntese de DNA e causar parada do ciclo celular, além de ter atividade antiviral, também é descrito como um inibidor específico dos transportadores de Pi (FOSTER, HERNANDO e BIBER, 2013) (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014) (ITO, MATUKA, *et al.*, 2005). Portanto, testamos o PAA em células MDA-MB-231 que possuem uma capacidade migratória maior do que outras linhagens. O PAA foi capaz de promover uma redução significativa na proliferação celular (após 24 h), migração e adesão (Figura 36) nessas células sem afetar sua viabilidade, indicando que o transportador de Pi H⁺-dependente pode ser uma marca registrada das células cancerosas.

A cascata de migração e invasão metastática pode ser regulada por um programa de várias etapas, denominado transição epitelial-mesenquimal (TEM) em que permite às células epiteliais transformadas adquirirem características mesenquimais, incluindo motilidade e invasividade (YANG e WEINBERG, 2008). As células epiteliais perdem marcadores epiteliais (E-caderina, ocludina, citoqueratinas, etc.) e começam a expressar marcadores mesenquimais (vimentina, fibronectina) apresentando uma maior capacidade migratória devido ao fenótipo mesenquimal (POLYAK e WEINBERG, 2009). Conforme evidenciado com resultados de imunofluorescência, as células MDA-MB-231 tendem a reverter sua morfologia e característica mesenquimal para o estado epitelial quando o transporte de Pi H⁺-dependente é inibido na presença de PAA (Figura 37), fortalecendo consistentemente a redução observada da capacidade migratória (Figura 36).

Qual é a função biológica do transportador de Pi no microambiente tumoral?

O Pi extracelular em humanos é mantido em uma faixa relativamente estreita, entre 0,7 e 1,55 mM (CAMALIER, YOUNG, *et al.*, 2010). No entanto, no microambiente tumoral de camundongos da glândula mamária foi identificada uma alta concentração de Pi (aproximadamente 2 mM) (BOBKO, EUBANK, *et al.*, 2017). Observamos uma expressão diminuída de NaPi-IIIb e transporte de Pi Na⁺-dependente na presença de Pi 2mM ou PFA 5mM concomitante com um aumento no transporte de Pi H⁺-dependente (Figura 38). Esse resultado sugeriu a ocorrência de um mecanismo compensatório para o transporte do Pi nas situações em que o transporte do Pi Na⁺-dependente estava comprometido.

A natureza funcional e molecular do transportador de Pi H^+ -dependente pode representar uma vantagem biológica para tumores no sentido de dotar células com a incorporação de Pi extra, mesmo naquelas condições em que o transporte de Pi dependente de sódio é saturado por um alto Pi extracelular (aprox. 2 mM). O excesso de Pi pode ser capaz de compensar as características bioquímicas energeticamente requeridas das células tumorais. Sugere-se que as células tumorais dissociadas (metastáticas) são capazes de ajustar seu perfil bioquímico em função de mudanças no microambiente, conforme indicado pelos resultados mostrados nas Figura 36 E e F. Além disso, a ocorrência de um transportador de Pi H^+ -dependente em células tumorais pode representar uma adaptação seletiva positiva ao baixo pH em sua vizinhança devido à secreção de lactato, ou seja, o transportador favoreceria a captação de Pi mesmo em condições de alta acidez.

Em meio à escassez de estudos que buscam caracterizar o transporte de Pi H^+ -dependente e sua participação detalhada nos mecanismos celulares, este trabalho descreveu e identificou pela primeira vez um transportador de Pi H^+ -dependente e como ele poderia participar de vários processos vitais de progressão do tumor de mama.

Existe um gene descrito para o transportador de Pi H^+ -dependente? Novos estudos devem ser direcionados para a caracterização estrutural do portador Pi H^+ -dependente. No entanto, uma complicação adicional é a falta de informação sobre o gene que codifica o transportador, uma vez que ainda não foi anotado. Quando eventualmente isso estiver disponível, pode ser possível confirmar nossa hipótese realizando um trabalho com a molécula recombinante que permitiria a análise sistemática e precisa dos parâmetros aqui discutidos. Da mesma forma, o conhecimento derivado da sequência do gene também pode permitir estudos de interferência específicos do transporte de Pi H^+ -dependente usando, por exemplo, CRISPR ou a tecnologia de *short hairspin*.

5.4 TRANSPORTADOR DE $\text{P}_i \text{ N}_A^+$ -DEPENDENTE: INIBIÇÃO PELO RESVERATROL

Os compostos naturais recentemente atraíram atenção significativa da comunidade científica por seus potentes efeitos contra doenças causadas por inflamação, incluindo câncer (KO, SETHI, *et al.*, 2017). Uma quantidade significativa de pesquisas, incluindo estudos pré-clínicos, clínicos e epidemiológicos, indicou que o consumo dietético de polifenóis, encontrados em níveis elevados em cereais, leguminosas, vegetais

e frutas, pode prevenir a evolução de uma série de doenças, incluindo câncer (KO, SETHI, *et al.*, 2017).

O resveratrol, um estilbeno natural e um polifenol não flavonóide, é um fitoestrogênio que possui propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, cardioprotetoras e anticâncer (KO, SETHI, *et al.*, 2017). Neste trabalho, o resveratrol inibiu o transporte de Pi Na⁺-dependente, não mostrando nenhum efeito no transporte de Pi H⁺dependente (Figura 39). As células cancerígenas apresentaram demandas elevadas de fósforo associadas à síntese proteica e à proliferação acelerada, como explica a "hipótese da taxa de crescimento" (ELSER, STERNER, *et al.*, 2000). Assim, o resveratrol tem sido descrito como um inibidor da migração celular e associado à diminuição dos níveis de ATP, enzima glicídica e transporte de glicose (SUN, ZHOU, *et al.*, 2019); (GOMEZ, ZANCAN, *et al.*, 2013); (JUNG, LEE, *et al.*, 2013). No presente trabalho, foi mostrado que o resveratrol atua reduzindo a captação de fósforo. Ao utilizar esses resultados iniciais, foi focado especificamente no efeito do resveratrol no transporte de Pi Na⁺dependente em células MDA-MB-231.

O resveratrol é um inibidor direto do transportador de Pi Na⁺-dependente?

Anteriormente, o transporte de Pi Na⁺-dependente foi caracterizado como transporte Pi de alta afinidade (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). A dependência da absorção de Pi em diferentes concentrações de Pi levou a um perfil cinético Michaelis-Menten e valores de K_m semelhantes em todas as condições, no entanto, uma redução significativa do V_{max} em ambas as concentrações de resveratrol (Figura 40 e Tabela 7) sugeriu inibição não competitiva por resveratrol. Além disso, a inibição do transporte de Pi Na⁺-dependente pelo resveratrol foi dose-dependente com IC₅₀ de 16,37 ± 4,72 μM (Figura 40 A).

Alguns estudos têm demonstrado que o resveratrol afeta as células cancerígenas inibindo diretamente os alvos proteicos (GOMEZ, ZANCAN, *et al.*, 2013); (PARK, JEONG, *et al.*, 2016). O resveratrol pode diminuir a viabilidade celular do câncer de mama e o metabolismo da glicose inibindo 6-fosfofructo-1-quinase e induz a autofagia diretamente através da inibição do mTOR proteicos (GOMEZ, ZANCAN, *et al.*, 2013); (PARK, JEONG, *et al.*, 2016). Aqui, mostramos, pela primeira vez, o efeito inibidor não competitivo do resveratrol no transporte de Pi Na⁺-dependente em células cancerígenas de mama.

O resveratrol exerce um efeito antitumoral regulando vários alvos em células cancerosas (KO, SETHI, *et al.*, 2017). É plausível questionar se o resveratrol inibe enzimas

que regulam gradiente de Na^+ , e posteriormente, afeta o transporte de Pi Na^+ -dependente. Recentemente foi mostrado que o resveratrol é capaz de recuperar totalmente a atividade Na^+ e K^+ -ATPase no tecido baço de ratos diabéticos depois que a hiperglicemia alterou a homeostase energética deste tecido reduzindo os níveis de atividade enzimática (KOLLING, KOLLING, *et al.*, 2019). Neste trabalho, nenhuma inibição foi observada quando a atividade Na^+ , K^+ -ATPase ou Na^+ -ATPase (Figura 41) foi medida na presença de resveratrol, sugerindo um efeito direto do resveratrol no transporte de Pi Na^+ -dependente.

Já foi descrito o efeito inibidor do resveratrol na synthase ATP de F1 e sua contribuição, aumentando as relações AMP:ATP an/ou ADP/ATP na célula, na qual compromete a função Na^+/K^+ ATPase devido à falta de ATP (GLEDHILL, MONTGOMERY, *et al.*, 2007). Além disso, o esgotamento energético estimula a AMPK e inibe diversos canais de íons e transportadores, incluindo Na^+/K^+ ATPase (FLORIAN e MICHAEL, 2014). Assim, é possível que a estimulação da AMPK promova a desregulamentação do gradiente de sódio e possa inibir o transporte de Pi dependente de Na^+ em células MDA-MB-231 (FLORIAN e MICHAEL, 2014).

A inibição da adesão e migração celular pelo resveratrol é relacionado com a inibição do transportador de Pi Na^+ -dependente? Recentemente, o tratamento com resveratrol apresentou uma inibição da migração celular, diminuindo a sinalização de MMP-2, MMP-9, P-PI3K, P-AKT, Smad2, Smad3, P-Smad2, P-Smad3, Vimentina, Snail1 e Slug (SUN, ZHOU, *et al.*, 2019). Devido às suas altas necessidades energéticas, as células metastáticas precisam de mais Pi e a inibição do transporte de Pi leva ao dano da migração e adesão (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). Para avaliar se o resveratrol prejudica a adesão celular e a migração inibindo o transporte Pi Na^+ -dependente, primeiro precisou determinar se o resveratrol era capaz de inibir o transporte de Pi de forma reversível. Foi observado que o transporte de Pi Na^+ -dependente permaneceu inibido, mesmo após as lavagens; perfil observado também para a migração e adesão celular (Figura 42).

Anteriormente neste trabalho, mostrou-se uma diminuição da expressão NaPi-IIB e do transporte Pi dependente de Na^+ na presença de Pi 2mM com um aumento do transporte Pi dependente de H^+ em células MDA-MB-231. Aqui, na presença de 1 mM extracelular Pi , observamos uma potencial inibição na migração e adesão por resveratrol; no entanto, nenhum efeito do resveratrol foi observado em 2 mM Pi . Possivelmente, na alta concentração de Pi (2 mM Pi), a expressão do transportador Pi

Na⁺-dependente já estaria prejudicada por mecanismo compensatório; o transporte Pi H⁺-dependente (insensível ao resveratrol) seria estimulado, nesta condição, sem afetar a viabilidade celular. Por essa razão, a migração e a adesão celular seriam insensíveis ao resveratrol a 2 mM Pi (Figura 43).

Um grupo, buscando avaliar o papel do resveratrol em situações de resistência ao quimioterápico paclitaxel com o uso de células MDA-MB-231, mostrou que o tratamento com resveratrol reduziu a proliferação celular, a formação de colônias e aumentou a senescência e a apoptose nas células resistentes (SPROUSE e HERBERT, 2014). Neste trabalho, ampliamos o conhecimento que o Pi extracelular pode interferir na resposta antitumoral do resveratrol; e, possivelmente, seja pela sua ação do transporte de Pi Na⁺-dependente. Estes resultados podem impactar em novas práticas do tratamento do câncer de mama, mostrando que o resveratrol atuando como adjuvante na quimioterapia, pode ser interferido pela elevada concentração de Pi extracelular.

Uma vez que o resveratrol pode regular diferentes propriedades celulares, incluindo a absorção de glicose e outras vias metabólicas, a inibição do transporte Pi dependente de sódio pode ser também outro alvo antimetastático para resveratrol. Estabeleceu-se um efeito antimetastático do resveratrol; além disso, o comprometimento do processo metastático pelo *knockdown* NaPi-IIb no câncer de pulmão e pele também foi demonstrado (JIN, XU, *et al.*, 2009); (HONG, MINAISTEHRANI, *et al.*, 2013). É possível que o *knockdown* do NaPi-IIb combinado com a adição de resveratrol teria o mesmo efeito observado na Figura 43, portanto a correlação seria evidente para determinar o mecanismo de ação.

5.5 TRANSDUÇÃO DO SINAL: GERAÇÃO DE H₂O₂ COMO UMA RESPOSTA SUBJACENTE AO ALTO NÍVEL DE PI EXTRACELULAR

Foi demonstrado por diversos estudos que o elevado Pi extracelular induz uma produção de ERO em diferentes tipos de células: osteossarcoma de rato (células MR-106), células secretoras de insulina (INS-IE), células endoteliais humanas (EAhy926) e células endoteliais bovina (BAEC) (HORI, KINOSHITA, *et al.*, 2015); (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004); (QUAN, DAS, *et al.*, 2013); (DI MARCO, HAUSBERG, *et al.*, 2008); (SHUTO, TAKETANI, *et al.*, 2009) respectivamente. Aqui, mostramos pela primeira vez que o Pi medeia a produção de ERO em células com câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) (Figura 45).

Quais são as fontes produtoras de EROs? Embora trabalhos anteriores tenham demonstrado que a produção de ERO induzida por Pi era considerada uma fonte

mitocondrial ou NOXs. Neste trabalho, foi sugerido a fonte de ERO de uma maneira diferente, com o aumento do Pi intracelular duas fontes de H₂O₂ são recorrentes, só que são determinadas pelo tempo de exposição ao elevado Pi. Aqui, foi determinado exposição curta (1h) e exposição longa (24h). Em uma exposição curta, Pi hiperpolariza a membrana interna mitocondrial, aumenta a liberação de H₂O₂ mitocondrial e inibe o consumo de O₂ do complexo IV (Figura 48 e Figura 49).

A hiperpolarização é possivelmente mediada pelo co-transportador Pi com H⁺ (ou em troca de OH⁻), que em elevada concentração de Pi transporta Pi e H⁺ em grande quantidade, portanto, diminui o ΔpH rapidamente. A mudança abrupta do ΔpH aumenta o ΔΨ_m (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004); (QUAN, DAS, *et al.*, 2013) (Figura 48).

O aumento de ΔΨ_m desestabiliza o direcionamento correto dos elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CET) e, por conseguinte, promove o vazamento de elétrons na CTE - coerente com a produção de superóxido e H₂O₂ por redução espontânea ou pela ação da SOD (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004).

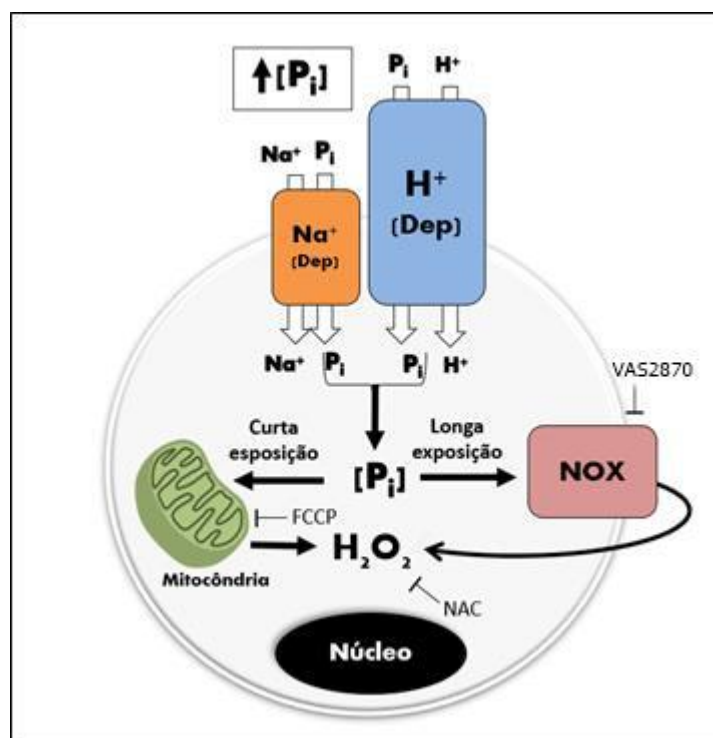


Figura 60: Representação da produção de peróxido de hidrogênio induzido por Pi em MDA-MB-231. O transporte de Pi Na⁺-dependente ou H⁺-dependente Pi (maior proporção devido a sua característica cinética em transportar mais Pi em alta concentração de Pi) promove o aumento do Pi intracelular. Em uma curta exposição ao Pi, o Pi hiperpolariza e aumenta a liberação de H₂O₂ mitocondrial sensível ao FCCP. A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) sensível à DPI produz H₂O₂ como uma longa exposição ao Pi.

Esse rápido efeito no potencial elétrico mitocondrial explicaria que a longa exposição ao elevado Pi não ocorreria, pois, os prótons em excesso na matriz mitocondrial retornariam ao espaço intermembranas; o ΔpH e o $\Delta\Psi\text{m}$ retornariam ao estado basal, porém, adaptados ao elevado Pi extracelular (Figura 47 A)

Como não foi observada qualquer regulação no conteúdo de ATP em elevado Pi ou nenhuma modulação do consumo de O_2 acoplado a síntese de ATP (Figura 49), acredita-se que esse efeito tenha um papel na sinalização celular, principalmente devido à difusibilidade do H_2O_2 através da membrana plasmática.

Acredita-se que a principal fonte de produção de H_2O_2 em curta exposição é via mitocondrial pelos seguintes motivos:

1) A hiperpolarização do potencial elétrico da membrana mitocondrial ocorreu apenas por 1 h e não 24 horas (Figura 48 A), mesmo porque o efeito é rápido e reversível, de acordo com (OLIVEIRA e KOWALTOWSKI, 2004); (NGUYEN, QUAN, *et al.*, 2015) e (QUAN, DAS, *et al.*, 2013).

2) A produção de H_2O_2 induzida por Pi por 1 h foi bloqueada com FCCP, que colapsou o gradiente eletroquímico mitocondrial, no qual não foi possível observar por 24 h (Figura 48 B).

3) O consumo de oxigênio foi prejudicado apenas pela curta exposição ao Pi (mas não longa) (Figura 49 A), mostrando que a funcionalidade do ETC foi possivelmente afetada pela hiperpolarização mediada pelo Pi. Todas essas razões também levaram a acreditar que a produção de H_2O_2 por longa exposição ao Pi não é uma fonte mitocondrial.

Shuto *et al.* (2009) mostraram que a sobrecarga de Pi nas células endoteliais da aorta bovina promoveu um aumento na produção de ERO por meio de uma NADPH oxidase, observando a diminuição da produção de ERO por DPI, um inibidor de Flavo proteínas, inclusive a NOX (SHUTO, TAKETANI, *et al.*, 2009). Aqui, usamos um inibidor específico de NOX, VAS2870 (CIFUENTES-PAGANO, MEIJLES e PAGANO, 2014). O VAS2870 só foi capaz de inibir a produção de H_2O_2 apenas em longa exposição por Pi (não em curta exposição) em células MDA-MB-231 (Figura 50), sugerindo NOX como a principal fonte de H_2O_2 em 24 horas com alto Pi (8 mM Pi); embora sejam necessários mais estudos para comprovar a participação do NOX e seu possível mecanismo de ativação pelo Pi alto.

Quais são as NOXs expressas em células de câncer de mama? Em relação a diferentes tipos de NOXs, Boudreau e colaboradores (2012) mostraram que em células MDA-MB-231 expressam altos níveis de NOX 4 e NOX 5 (BOUDREAU,

CASTERLINE, *et al.*, 2012). Como já esclarecido, a NOX 4 não possui subunidade regulatória como a NOX 5, que pode ser regulada por exemplo pela PKC.

Como a NOX poderia ser ativada pelo Pi apenas em longa exposição? Existem relatos que as isorformas da NOX sofrem uma ativação por fosforilação da subunidade p47^{phox} mediada pela PKC (KURODA, NAKAGAWA, *et al.*, 2005); (COSENTINO-GOMES, ROCCO-MACHADO e MEYER-FERNANDES, 2012). Possivelmente o mecanismo de ativação da NOX pelo elevado Pi seria pelo envolvimento da PKC. Em células endoteliais bovinas, foi demonstrado que a sobrecarga de Pi pode induzir a produção de ERO via NADPH oxidase pela ativação de uma PKC convencional (SHUTO, TAKETANI, *et al.*, 2009). No entanto, neste trabalho não foi demonstrada a participação da PKC em alto Pi extracelular. Mas acredita-se que essa enzima possa ser regulada nessa condição, pois, na estrutura da PKC, dois pares de dedos de zinco são encontrados no domínio regulatório. Dessa forma, as moléculas oxidantes como por exemplos as EROs, destroem a conformação do dedo de zinco e a autoinibição é aliviada, resultando em uma forma de PKC que é cataliticamente ativa mesmo na ausência de Ca²⁺ ou fosfolipídios (COSENTINO-GOMES, ROCCO-MACHADO e MEYER-FERNANDES, 2012).

Como o elevado Pi regularia os transportadores de Pi? O Pi entra nas células por meio de transportadores de Pi por transportadores de Pi Na⁺-dependentes ou H⁺-dependentes. Recentemente, dois transportadores de Pi com um mecanismo diferente e afinidade de substrato foram caracterizados: o transporte de Pi Na⁺-dependente tem uma alta afinidade para Pi (transporta mais em baixas concentrações, K_m = 0,08 mM Pi) e o transporte de Pi H⁺-dependente tem uma baixa afinidade para Pi (transporta mais em altas concentrações, K_m = 1,4 mM Pi) (RUSSO-ABRÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

Acredita-se que, inicialmente, os dois transportadores de Pi contribuem para o pool intracelular de Pi. No entanto, com base no comportamento cinético, o transportador dependente de H⁺ exerceria uma contribuição mais significativa para o pool intracelular de Pi em altas concentrações de Pi extracelular (Figura 60).

Um transporte de Pi Na⁺-dependente diminuído foi observado em Pi extracelular alto (2 e 8 mM) e, como mecanismo compensatório, o transporte de Pi dependente de H⁺ foi estimulado. Efeito semelhante foi observado na caracterização bioquímica do transporte de Pi em células intestinais, Caco2BBE, quando foram cultivadas em Pi 1 mM (condição controle) e Pi 4 mM, o que mimetiza a alta concentração de Pi no lúmen intestinal. Embora todas as condições tenham apresentado uma absorção de Pi Na⁺-

independente, o crescimento de Caco2BBE em Pi alto (4 mM) tem um transporte aumentado de transporte de Pi Na^+ -independente com valor de $K_m = 0,155 \pm 0,025$ mM Pi em comparação com as condições de controle (1 mM) com valor de $K_m = 0,071 \pm 0,020$ mM Pi (CANDEAL, CALDAS, *et al.*, 2014).

Devido à capacidade de Pi de induzir a produção de H_2O_2 , seja em 1h ou 24h, também mostramos que Pi alto inibe o transporte de Pi Na^+ -dependente e estimula o transporte de Pi H^+ -dependente (Figura 51). Observamos o mesmo perfil de modulação induzido por Pi por H_2O_2 adicionado em condições de controle ao transporte de Pi Na^+ -dependente ou H^+ -dependente (Figura 52), que foram revertidos por um limpador de EROs, NAC (Figura 53). Uma explicação para a regulação dos transportadores de Pi pelo elevado Pi é que os transportadores de Pi teriam uma sensibilidade direta para o H_2O_2 (Figura 61). Além disso, outras vias de sinalização reguladas por H_2O_2 poderiam atuar como um regulador intermediário para transportadores de Pi.

Células de câncer que apresentam estresse oxidativo metabólico persistente em comparação com células saudáveis geralmente compreendem uma mistura de lesões de DNA e ativação de oncogenes, promovendo uma alteração na expressão de várias proteínas (GURER-ORHAN, INCE, *et al.*, 2018). Além disso, o H_2O_2 oxida reversivelmente os grupos tiol da cisteína, como a fosfatase homólogo da tensina (PTEN), a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) e a proteína fosfatase 2, que causam perda de atividade e consequentemente promovem a ativação da via de proliferação PI3K / Akt / mTOR (D'AUTREAUX e TOLEDANO, 2007).

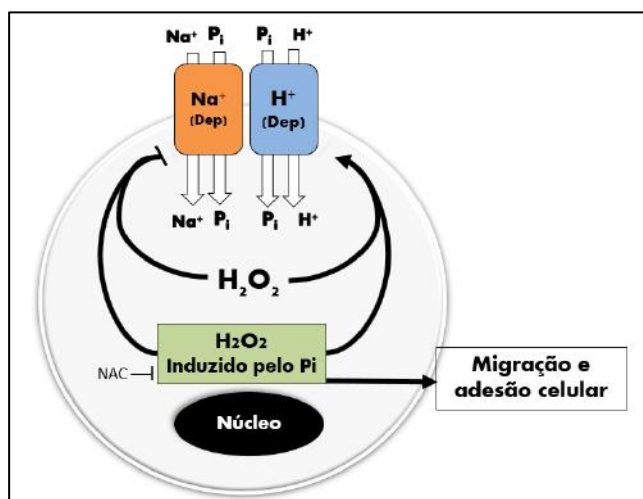


Figura 61: Representação da modulação dos transportadores Pi pelo H_2O_2 em células MDA-MB-231. Modulação dos transportadores de Pi pela resposta da produção de peróxido de hidrogênio induzida por Pi (sensível a NAC): H_2O_2 inibe o transportador de Pi Na^+ -dependente e o H_2O_2 estimula o transportador de Pi H^+ -dependente e estimula a migração e adesão celular.

Alguns estudos relatam que o transporte de Pi Na^+ -dependente pode ser regulado por vias de sinalização relacionados a hiperfosfatemia. Na membrana renal de borda em forma de escova de ratos, foi observado que o hormônio da paratireóide (PTH) em dieta rica em Pi ativou uma PKC. Essa proteína promoveu a internalização e o subsequente encaminhamento lisossomal do transportador de Pi Na^+ -dependente (NaPi-IIb) (JACUILLET e UNWIN, 2019). Parece que um PKC estaria envolvido nesta cascata reguladora endocítica (via PTH1R-PKC-NHERF-1) (Figura 16) (JACUILLET e UNWIN, 2019). Devido a poucos estudos sobre o transporte de Pi H^+ -dependente, nenhuma via de sinalização regulatória foi demonstrada.

No entanto, apenas um transportador Pi (dependente de H^+) possivelmente seria regulado por H_2O_2 e, conseqüentemente, regularia intrinsecamente outro transportador Pi (dependente de Na^+). Bowen e Levison (1986) mostraram em células tumorais de ascite de Ehrlich que estimulação do transporte de Pi Na^+ -independente por H^+ (baixo pH) inibe o transporte de Pi Na^+ -dependente, possivelmente pela interação de H^+ intracelular com um sítio intracelular do transportador de Pi Na^+ -dependente (Figura 25) (BOWEN e LEVISON, 1986).

Por que o elevado Pi extracelular só ocorre na linhagem MDA-MB-231? Neste trabalho, foi mostrada uma inibição única do transporte de Pi Na^+ -dependente e um estímulo de transporte de Pi H^+ -dependente em elevado Pi (24h) na célula de câncer de mama triplo-negativo, MDA-MB-231 (Figura 44), quando comparada as outras linhagens de células de mama: MCF10-A (linhagem celular de mama não tumoral) e MCF-7 (Luminal A). A migração e adesão celular também foram estimuladas apenas nas células MDA-MB-231, com aumento do Pi extracelular (Figura 54).

Nenhuma correlação com receptores hormonais (RE, RP e HER2) foi proposta neste trabalho. No entanto, nos últimos anos, mostramos que a célula MDA-MB-231 tem um maior nível de transporte de Pi Na^+ -dependente e H^+ -dependente em comparação com outras células de câncer de mama (T47-D e MCF-7) (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018). Aqui, em 1 mM Pi (condições de controle), também mostramos na Figura 44 em comparação com MCF10-A, um transporte de Pi aumentado (dependente de Na^+ e dependente de H^+) na célula MDA-MB-231. Acreditamos que este seja um fator de pré-disposição para elevar o nível de Pi intracelular e promover uma produção de H_2O_2 induzida por Pi, o que não acontece com outras linhagens celulares de mama (MCF10-A e MCF-7) (Figura 45).

A migração e adesão estimuladas pelo elevado P_i dependem do H_2O_2 ou do transporte de P_i ? De acordo com Talmadge e Fidler (2010), a metástase geralmente ocorre em uma sequência de etapas, como crescimento tumoral, angiogênese, migração e invasão tumoral na circulação sanguínea para formação de um tumor secundário em outro tecido do corpo humano (Figura 6) (TALMADGE e FIDLER, 2010). As células de câncer precisam gastar energia para aderir e migrar efetivamente através da arquitetura complexa da matriz extracelular, geralmente através da desfosforilação de ATP em ADP, quando um monômero de actina se liga a um filamento de actina realizando a polarização do filamento (ZANOTELLI, GOLDBLATT, *et al.*, 2018).

Recentemente, foi mostrado que a célula MDA-MB-231 tem um maior nível de transporte de P_i , seja Na^+ -dependente ou H^+ -dependente em comparação com outras células de câncer de mama. Além disso, o P_i extracelular alto (3 e 5 mM) atua como um estimulador migratório no pulmão (A549) e nas células do câncer de mama (MDA-MB-231) (LIN, MCKINNON, *et al.*, 2015). Portanto, acredita-se que a célula tumoral necessite de mais P_i para suprir as necessidades energéticas dispendiosas na migração e adesão celular. De fato, o transporte de P_i desempenha um papel fundamental na estimulação da migração e adesão em alto P_i extracelular (RUSSO-ABRAÃO, LACERDA-ABREU, *et al.*, 2018).

Estudos demonstraram que níveis elevados de H_2O_2 gerados por células metastáticas de adenocarcinoma mamário promovem uma regulação dos marcadores de TEM, no qual H_2O_2 diminui a marcação de E-caderina, aumenta a marcação de fibronectina e vimetina (CICHON e RADISKY, 2014); (LEE, JU, *et al.*, 2019). Aqui, mostramos que o P_i foi capaz de induzir a produção de H_2O_2 de maneira dose-dependente, como também foi capaz de induzir a migração e adesão celular (Figura 45 e Figura 54). Ao realizar a realocação dos valores de migração e adesão em relação a concentração de H_2O_2 induzida por P_i , é possível observar uma correlação entre a migração e adesão celular com a produção de H_2O_2 (Figura 56). A migração e adesão celular, estimulada pelo P_i extracelular, foi abolida pelo potente antioxidante NAC; sugere fortemente que o elevado P_i possa contribuir para a migração e adesão celular por estimular a produção de H_2O_2 , um potente estimulador de processos metastáticos (Figura 61) (CICHON e RADISKY, 2014); (LEE, JU, *et al.*, 2019).

Portanto, este trabalho revela pela primeira vez o papel do H_2O_2 em resposta ao P_i extracelular alto como estimulador de processos metastáticos exclusivos do TNBC, implicando em novas abordagens de diagnóstico e possível uso de antioxidantes para

novas terapias com TNCB. Além disso, pacientes com câncer pode apresentar um quadro clínico de hiperfosfatemia. Foi mostrado neste trabalho que o resveratrol, NAC ou PAA podem prevenir a progressão tumoral, o que pode ser utilizado como modelo para novos fármacos antitumorais para pacientes que se encontra nesse quadro.

6 CONCLUSÃO

Para as células obterem Pi, ecto-enzimas na membrana plasmática, com seu sítio catalítico voltado para o ambiente extracelular, podem hidrolisar moléculas fosforiladas; e esta é uma etapa inicial e possivelmente limitante para a absorção de Pi por transportadores importante para fornecer Pi intracelular para a proliferação, adesão e migração celular, que são processos importantes na progressão do tumor.

A captação do Pi é possível devido à translocação mediada por transportadores através das membranas celulares. Em câncer de mama, o Pi entra nas células por meio dos cotransportadores Na^+/Pi ou H^+/Pi . Em condições de Pi alto, o transporte de Pi dependente de H^+ foi cinco vezes maior do que o transporte de Pi dependente de Na^+ , refletindo assim um transporte de Pi de baixa afinidade. A ocorrência de um transportador de Pi H^+ -dependente em células tumorais pode dotá-las de um caminho alternativo para a captação de Pi em situações em que o transporte de Pi Na^+ -dependente está saturado dentro do microambiente tumoral, regulando assim os processos tumorais energeticamente expansivos.

Além disso, o elevado Pi promove uma resistência do efeito inibitório da migração e adesão pelo resveratrol, um composto natural polifenol não-flavonoide presente em frutos vermelhos. O resveratrol foi capaz de inibir apenas o transporte de Pi Na^+ -dependente ao passo que nenhum efeito foi observado no transporte de Pi H^+ -dependente.

O elevado Pi extracelular induz a produção de H_2O_2 , seja em exposição curta ou longa. Na curta exposição, o Pi hiperpolariza a membrana mitocondrial, prejudicando o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons com o aumento da liberação de H_2O_2 . Após exposição prolongada ao Pi, uma fonte de H_2O_2 inibida pelo DPI, possivelmente uma NADPH oxidase, contribuiria para a produção de H_2O_2 . Além disso, o subtipo molecular triplo-negativo tem uma capacidade metastática aprimorada, provavelmente devido à alta concentração de Pi; e a produção de H_2O_2 induzida por Pi pode atuar como uma resposta de sinalização ao Pi para promover melhor migração e adesão celular. H_2O_2 também pode inibir o transportador de Pi Na^+ -dependente e estimular o transportador de Pi H^+ -dependente de baixa afinidade, capturando mais Pi extracelular, principalmente para suprir as necessidades energéticas exigidas pelos processos metastáticos ativados por Pi.

Referências

ACS. American Cancer Society. **Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020**, 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>>. Acesso em: 2 Julho 2020.

ADAMS, C. S. et al. Matrix Regulation of Skeletal Cell Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20316-29322, 2001.

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.

AMOEDO, D. et al. Cell Cycle and Energy Metabolism in Tumor Cells: Strategies for Drug Therapy. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 15–25, 2011.

AMOEDO, D. et al. Mitochondria: are mitochondria accessory to metastasis? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 51, p. 53-57, 2014.

AUBREY, B. J. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? **Cell death and differentiation**, v. 25, n. 1, p. 104-113, 2018.

AZZAROLO, A. M.; RITCHIE, G.; QUAMME, G. A. Some characteristics of sodium-independent phosphate transport across renal basolateral membranes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1064, n. 2, p. 229-234, 1991.

BAQI, Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: Recent developments in drug discovery. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 21-33, 2015.

BARDIA, A. et al. Sacituzumab govitecan-hziy in refractory metastatic triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 8, p. 741-751, 2019.

BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **SRN Oncology**, v. 2012, p. 137289, 2012.

BECK, L. et al. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31363-31374, 2009.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

BLAND, ; COPELAND, E. M. **A mama: Tratamento compreensivo das doenças benignas e malignas.** [S.l.]: Editora Manole LTDA, 1994.

BOBKO, A. A. et al. Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41223, 2017.

BOUDREAU, H. E. et al. Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 7, p. 1489-1499, 2012.

BOWEN, J. W.; LEVISON, C. Phosphate transport in Ehrlich ascites tumor cells: inhibition by H⁺. **Journal of cellular physiology**, v. 128, n. 1, p. 55-60, 1986.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BREWER, T. F. et al. Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 765-790, 2015.

BRISKEN, C.; SCABIA, V. Progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer. **Journal of molecular endocrinology**, v. 20, p. 0091.R1, 2020.

BROWN, R. B. Potential interaction of inflammatory hyperemia and hyperphosphatemia in tumorigenesis. **Future Oncology**, v. 15, n. 34, p. 3909-3916, 2019.

BROWN, R. B.; RAZZAQUE, M. S. Phosphate toxicity and tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1869, n. 2, p. 303-309, 2018.

BUHEGGER, K. et al. Reprimo as a modulator of cell migration and invasion in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. **Biological Research**, v. 49, n. 1, p. 1-5, 2016.

BURCKHARDT, B. C.; BURCKHARDT, G. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 146, p. 95-158, 2003.

BURDALL, S. E. et al. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast cancer research**, v. 5, n. 2, p. 89-95, 2003.

CALVO, M. S.; MOSHFEGH, A. J.; TUCKER, K. L. Assessing the health impact of phosphorus in the food supply: issues and considerations., v. 5, n. 1, p. 104-113, 2014.

CAMALIER, C. E. et al. Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 3, p. 350-370, 2010.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, 2012.

CANDEAL, E. et al. Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 307, n. 12, p. 1113-1122, 2014.

CANTLEY, L. C.; AISEN, J. The fate of cytoplasmic vanadium— Implications on (NA,K)-ATPase Inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 6, p. 1781–1784, 1979.

CARLSON, B. M. The Urinary System. **The Human Body**, p. 357-372, 2019. ISSN 10.1016/b978-0-12-804254-0.00013-2.

CARUSO-NEVES, C. et al. Ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry Molecular Biology**, v. 119, p. 807–811, 1988.

CHEANG, M. C. et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. **The oncologist**, v. 20, n. 5, p. 474-482, 2015.

CHEN, D. R. et al. SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. **Anticancer Research**, v. 30, p. 4135-4140, 2010.

CHEN, Y. et al. Combined integrin phosphoproteomic analyses and small interfering RNA-based functional screening identify key regulators for cancer cell adhesion and migration. **Cancer Research**, v. 69, p. 3713–3720, 2009.

CHRISTOV, M.; JÜPPNER, H. Phosphate homeostasis disorders. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 685-706, 2018.

CICHON, M. A.; RADISKY, D. C. ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF-κB-dependent activation of Snail. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2827-2838, 2014.

CIFUENTES-PAGANO, E.; MEIJLES, D.; PAGANO, P. J. The quest for selective nox inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, p. 2741–2754, 2014.

COLLINS, L. C. et al. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. **Cancer**, v. 103, n. 9, p. 1778-1784, 2005.

COOPER, S. A. P. **On the anatomy of the breast (1840)**. [S.l.]: jdc jefferson, v. 1, 2005.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; MEYER-FERNANDES, J. R. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 10697-10721, 2012.

CREIGHTON, C. J. et al. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 114, p. 287-299, 2009.

CUNHA, V. M.; MEYER-FERNANDES, J. R.; NOEL, F. A (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase from *Schistosoma mansoni* is coupled to an active transport of calcium. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 167-174, 1992.

DAI, X. et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131-3141, 2017.

D'AUTREAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 813-824, 2007.

DAVIS, G. R. et al. Absorption of phosphate in the jejunum of patients with chronic renal failure before and after correction of vitamin D deficiency. **Gastroenterology**, v. 85, n. 4, p. 908-916, 1983.

DE ALMEIDA-AMARAL, E. E. et al. *Leishmania amazonensis*: PKC-like protein kinase modulates the (Na⁺+K⁺)ATPase activity. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 419-426, 2007.

DE OLIVEIRA, M. F.; AMOÊDO, N. D.; RUMJANEK, F. D. Energy and Redox Homeostasis in Tumor Cells. **International Journal of Cell Biology**, v. 593838, p. 1-15, 2012.

DEL RIO, L. A. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free Radicals Biology Medicine**, v. 13, p. 557-580, 1992.

DELLAIRE, L.; BÉLIVEAU, R. Phosphate transport by capillaries of the blood-brain barrier. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22323-22327, 1992.

DELWAR, Z. M. et al. Cytotoxic effect of menadione and sodium orthovanadate in combination on human glioma cells. **Investigational New Drugs**, v. 30, p. 1302-1310, 2012.

DEMERS, L. M. et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1489-1494, 1995.

DI MARCO, G. S. et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro.. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 294, n. 6, p. 1381-1387, 2008.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOLET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 568-576, 2011.

DO CARMO ARAÚJO, M. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimistry Biophyscal Acta**, v. 1740, n. 3, p. 421-426, 2005.

DUTRA, P. M. et al. A novel ecto-phosphatase activity of *Herpetomonas muscarum muscarum* inhibited by platelet-activating factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 1, p. 164–169, 1998.

DUTRA, V. D. et al. Desequilíbrios hidroeletrólíticos na sala de emergência. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 5, p. 410-419, 2012.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: Marcadores tumorais (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 377-388, 2001.

ELLIS, H.; MAHADEVAN, V. Anatomy and physiology of the breast. **Basic Science**, p. 11, 2013.

ELSER, J. J. et al. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. **Ecology Letters**, v. 2, p. 540-550, 2000.

ERBAS, B. et al. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review.. **Breast Cancer Res Treat**, v. 97, n. 2, p. 135-144, 2006.

FAN, J. et al. Reduction in MnSOD promotes the migration and invasion of squamous carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 5, p. 1639-1650, 2019.

FIGUEROA-MAGALHÃES, M. C. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast**, Edinburgh, v. 23, n. 2, p. 128-136, 2014.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, J. W. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375–392, 1925.

FLORIAN, L.; MICHAEL, F. Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). **Channels**, v. 8, n. 1, p. 20-28, 2014.

FONG, C. S. et al. Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 386-399, 2008.

FOSTER, C. C.; PITRODA, S. P.; WEICHSELBAUM, R. R. Definition, Biology, and History of Oligometastatic and Oligoprogressive Disease. **Cancer journal**, Sudbury, v. 26, n. 2, p. 96-99, 2020.

FOSTER, I. C.; HERNANDO, N.; BIBER, J. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2-3, p. 386-395, 2013.

FREITAS-MEQUISA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R. Ecto-nucleotidases e Ecto-fosfatases de parasitas de *Leishmania* e *Trypanosoma*. In: _____ **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma Subcellular Biochemistry**. [S.l.]: [s.n.], v. 74, 2014. Cap. 10, p. 217-252.

GE, G. et al. Enhanced SLC34A2 in breast cancer stem cell-like cells induces chemotherapeutic resistance to doxorubicin via SLC34A2-Bmi1-ABCC5 signaling. **Tumour Biology**, v. 37, n. 4, p. 5049-5062, 2015.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Research**, v. 12, p. 264-265, 1952.

GIRISH, C. H. et al. A review on breast cancer. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 47-54, 2014.

GLEDHILL, J. R. et al. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 34, p. 13632-13637, 2007.

GOMEZ, L. S. et al. Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. **Biochimie**, v. 95, p. 1336-1343, 2013.

GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 6, p. 709-717, 2003.

GOYAL, R.; JIALAL, I. **Hyperphosphatemia**. [S.l.]: StatPearls. Acesso realizado em 06/07/2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551586/>, 2020.

GURER-ORHAN, H. et al. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. **Current Medical Chemical**, v. 25, n. 33, p. 4084-4101, 2018.

HA, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 411-416, 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-678, 2011.

HAYES, A. et al. Wear of articular cartilage: the effect of crystals. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, v. 207, n. 1, p. 41-58, 1993.

HECHT, F. et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumour Biology**, v. 37, n. 4, p. 4281-4291, 2016.

HERGUETA-REDONDO, M. et al. “New” molecular taxonomy in breast cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, n. 12, p. 777-785, 2008.

HIMASNSHU, J.; MICHAEL, F. Molecular Oncology of Breast Cancer. In: KIRBY, I., et al. **The Breast**. 5. ed. [S.l.]: [s.n.], 2018. Cap. 22, p. 282-307.

HOFMAN, N.; THEES, M.; KINNE, R. Phosphate Transport by Isolated Renal Brush Border Vesicles. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 162, p. 147-156, 1976.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 215, 2011.

HONG, S. et al. Knockdown of the sodium-dependent phosphate co-transporter 2b (NPT2b) suppresses lung tumorigenesis. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77121, 2013.

HONRADO, E. et al. Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations. **Oncogene**, v. 206, n. 25, p. 5837-5845, 2006.

HORI, M. et al. Phosphate enhances Fgf23 expression through reactive oxygen species in UMR-106 cells. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 2, p. 132-139, 2015.

HOWLADER, N. et al. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States.. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention.**, v. 27, n. 6, p. 619-626, 2018.

HSIAO, C. L. et al. The Association of Matrix Metalloproteinase-1 Promoter Polymorphisms with Breast Cancer. **In vivo**, Athens, v. 32, n. 3, p. 487-491, 2018.

HUBER, K. et al. Phosphate transport in the duodenum and jejunum of goats and its adaptation by dietary phosphate and calcium. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 283, n. 2, p. 296-302, 2002.

IHEAGWARA, O. S. et al. Phosphorus, phosphorous, and phosphate. **Hemodialysis International**, v. 17, n. 4, p. 479-482, 2013.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**, 2015. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/diretrizes-para-deteccao-precoce-do-cancer-de-mama-no-brasil>>. Acesso em: 2 Julho 2020.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas da mortalidade**, 2020. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>. Acesso em: 2 Julho 2020.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil**, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acesso em: 02 Agosto 2021.

IQBAL, J. Ectonucleotidases: Potential target in drug discovery and development. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 866-869, 2019.

ITO, M. et al. Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast-like cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 288, n. 4, p. 921-931, 2005.

JACQUILLET, G.; UNWIN, R. J. Physiological regulation of phosphate by vitamin D, parathyroid hormone (PTH) and phosphate (Pi). **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 471, n. 1, p. 83-98, 2019.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.

JARZAB, B. et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. **Cancer Research**, v. 65, n. 4, p. 1587-1598, 2005.

JIANG, L. et al. Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma. **Hum. Genet**, v. 129, n. 2, p. 189-197, 2010.

JIANG, Z. et al. The effects and mechanisms of SLC34A2 on tumorigenicity in human non-small cell lung cancer stem cells. **Tumour Biology**, v. 37, n. 8, p. 10383-10392, 2016.

JIN, H. et al. High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters Akt signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, p. 59-68, 2009.

JONES, G.; THOMPSON, B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes & development**, v. 23, n. 5, p. 537-548, 2009.

JUNG, K.-H. et al. Resveratrol Suppresses Cancer Cell Glucose Uptake by Targeting Reactive Oxygen Species-Mediated Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, p. 2161–2167, 2013.

KESTENBAUM, B. et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 16, n. 2, p. 520-528, 2005.

KIM, J.; KIM, K. J.; BAE, J.-S. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, p. e269, 2016.

KO, J.-H. et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2589, 2017.

KOLLING, J. et al. Resveratrol and resveratrol-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex recovered the changes of creatine kinase and Na⁺, K⁺-ATPase activities found in the spleen from streptozotocin-induced diabetic rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, p. e20181330, 2019.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, p. 472-482, 2008.

KURODA, J. et al. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. **Genes Cells**, v. 10, p. 1139-1151, 2005.

LACERDA-ABREU, M. A. et al. Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. **Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer**, v. 1870, n. 2, p. 291-298, 2018.

LACERDA-ABREU, M. A. et al. H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1865, n. 9, p. 2180-2188, 2019.

LANG, J. E. et al. Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy. **Journal of surgical oncology**, v. 111, n. 1, p. 81-90, 2015.

LANZER, P. et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. **European heart journal**, v. 35, n. 23, p. 1515-1525, 2014.

LASFARGUES, E. Y.; OZZELLO, L. Cultivation of human breast carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 21, p. 1131-1147, 1958.

LE BOURHIS, X.; ROMON, R.; HONDERMARCK, H. Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical ramifications. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 1, p. 17-24, 2009.

LEBIEDZINSKA, M. et al. Oxidative stress-dependent p66Shc phosphorylation in skin fibroblasts of children with mitochondrial disorders. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 7, p. 952-960, 1997.

LEE, G. J.; MARKS, J. Intestinal phosphate transport: a therapeutic target in chronic kidney disease and beyond? **Pediatric nephrology**, v. 30, n. 3, p. 363-371, 2015.

LEE, S. Y. et al. Reactive oxygen species induce epithelial mesenchymal transition, glycolytic switch, and mitochondrial repression through the Dlx 2/Snail signaling pathways in MCF 7 cells.. **Molecular medicine reports**, v. 20, n. 3, p. 2339-2349, 2019.

LEE, S. Y.; MULLER, C. E. Nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 (NPP1) and its inhibitors. **Medical chemical communication**, v. 8, n. 5, p. 823-840, 2017.

LEVINE, A. S. et al. The oxidative DNA damage response: A review of research undertaken with Tsinghua and Xiangya students at the University of Pittsburgh. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 10, p. 1077-1080, 2017.

LI, Y. et al. Epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ER α -negative breast cancer. **Mol Cancer**, v. 12, n. 9, 2013.

LIN, Y. et al. Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXC2) regulated osteopontin expression. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 9, p. 926-934, 2015.

LINZELL, J. L. The silver staining of myoepithelial cells, particularly in the mammary gland, and their relation to the ejection of milk. **Journal of anatomy**, v. 86, n. 1, p. 49-57, 1952.

LIU, L. L. et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. **PLoS One**, v. 10, p. E01, 2015.

LU, L. et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 3, p. R56, 2011.

LUONGO, F. et al. PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1076, 2019.

MAUGHAN, K. L. Treatment of Breast Cancer. **American Academy of Family Physicians**, v. 81, n. 11, p. 1339-1346, 2010.

MAYCOTTE, P. et al. Mitochondrial dynamics and cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 39, n. 5, p. 1-16, 2017.

MICHIGAMI, T. Skeletal mineralization: mechanisms and diseases. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 24, n. 4, p. 213-219, 2019.

MILLER, D. G.; EDWARDS, R. H.; MILLER, A. D. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 1, p. 78-82, 1994.

MILLER, V. M.; DUCKLES, S. P. Vascular actions of estrogens: functional implications. **Pharmacological Reviews**, v. 60, p. 210-241, 2008.

MOOG, F.; GLAZIER, H. S. Phosphate absorption and alkaline phosphatase activity in the small intestine of the adult mouse and of the chick embryo and hatched chick. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 42, n. 2, p. 321-336, 1972.

MORENO-SÁNCHEZ, R. et al. Energy metabolism in tumor cells. **FEBS Journal**, v. 274, n. 6, p. 1393-1418, 2007.

MOSS, D. W.; RAYMOND, F. D.; WILE, D. B. Clinical and biological aspects of acid phosphatase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 32, n. 4, p. 431-467, 1995.

MUNIYAN, S. et al. Human prostatic acid phosphatase: Structure, function and regulation. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 5, p. 10438-10464, 2013.

MUNIYAN, S. et al. Human prostatic acid phosphatase: Structure, function and regulation. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, n. 5, p. 10438-10464., 2013.

MUSCHER-BANSE, A. S.; BREVES, G. Mechanisms and regulation of epithelial phosphate transport in ruminants: approaches in comparative physiology. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 471, n. 1, p. 185-191, 2018.

NATHANSON, L.; FISHMAN, W. H. New observations on the Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients. **Cancer**, v. 27, n. 6, p. 1388-1397, 1971.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network. **Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast cancer treatment**, 2019. Disponível em: <<http://www.nccn.org>>. Acesso em: 2 Julho 2020.

NEVE, R. M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 515-527, 2006.

NGUYEN, T. T. et al. Mitochondrial oxidative stress mediates high-phosphate-induced secretory defects and apoptosis in insulin-secreting cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 11, p. 933-941, 2015.

NOCITI, R. P. et al. O papel do fator de crescimento endotelial (VEGF) na formação e progressão de neoplasias mamárias de cadela. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 39, n. 3, p. 341-346, 2015.

NOURAZARIAN, R.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 12, p. 4745-4751, 2014.

OLIVEIRA, G. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Phosphate Increases Mitochondrial Reactive Oxygen Species Release. **Free Radical Research**, v. 38, n. 10, p. 1113-1118, 2004.

OLIVEIRA, R. B.; MOYSÉS, R. M. A. FGF-23: estado da arte. **Brasilian Journal of Nephrology**, v. 32, n. 3, p. 323-331, 2010.

OVED, S.; YARDEN, Y. Signal transduction: molecular ticket to enter cells. **Nature**, v. 416, n. 6877, p. 133-136, 2002.

OWENS, M. B.; HILL, A. D.; HOPKINS, A. M. Ductal barriers in mammary epithelium. **Tissue barriers**, v. 1, n. 4, p. e25933., 2013.

OWUSU-ANSAH, E. et al. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. **Nat. Genet.**, v. 40, p. 356-361, 2008.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast Development and Anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, p. 91-95, 2011.

PAPALOUCAS, C. D. et al. Measurement of blood phosphorus: a quick and inexpensive method for detection of the existence of cancer in the body. Too good to be true, or forgotten knowledge of the past? **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 1, p. 24-25, 2014.

PARASCANDOLO, A.; LAUKKANEN, M. O. Carcinogenesis and Reactive Oxygen Species Signaling: Interaction of the NADPH Oxidase NOX1-5 and Superoxide Dismutase 1-3 Signal Transduction Pathways. **Antioxidants & redox signaling**, v. 30, n. 3, p. 443-486, 2019.

PARK, D. et al. Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21772, 2016.

PATTON, S.; JENSEN, R. G. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. **Progress in the chemistry of fats and other lipids**, p. 14(4), 163–277, 1975.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nature Review on Cancer**, v. 7, p. 415-428, 2007.

PETIT, V. et al. Optimization of tumor xenograft dissociation for the profiling of cell surface markers and nutrient transporters. **Lab. Investig.**, v. 93, n. 5, p. 611-621, 2013.

POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265-276, 2009.

PUECH, C.; PREVOT, N.; PEREK, N. Gefitinib inhibits sodium phosphate co-transporter III isoform 1 in a model of human malignant glioma. **Anticancer Research**, v. 34, p. 6527-6536, 2014.

QUAN, X. et al. Mitochondrial phosphate transport during nutrient stimulation of INS-1E insulinoma cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 281, n. 1-2, p. 198-209, 2013.

QUINTERO, I. B. et al. Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. **Cancer Research**, v. 67, n. 14, p. 6549-6554, 2017.

RADISKY, D. C. et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 123-127, 2005.

RANGEL, L. B. et al. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. **Oncogene**, v. 22, n. 46, p. 7225-7232, 2013.

RASHIDA, M.; IQBAL, J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto- nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. **Medicinal Research Reviews** , v. 34, n. 4, p. 703-743, 2014.

REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 5, p. 1415–1430, 2000.

RETSKY, M. et al. Breast cancer and the black swan. **Ecancermedicalsecience**, v. 14, p. 1050, 2020.

RIBEIRO, R. I. M. et al. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** , v. 44, n. 2, p. 115-121, 2008.

RICHER, J. K. et al. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 5209-5218, 2002.

ROCCO-MACHADO, N.; COSENTINO-GOMES, D.; MEYER-FERNANDES, J. R. Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase Activity by Hydrogen Peroxide Generated through Heme in *L. amazonensis*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129604, 2015.

RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S. et al. Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 370, p. 65-70, 2019.

ROTHSTEIN , A.; MEIER , R. C.; SCHARF, T. G. Relationship of cell surface to metabolism. IX. Digestion of phosphorylated compounds by enzymes located on surface of intestinal cell. **American Journal of Physiology**, v. 173, n. 1, p. 41-46, 1953.

ROY, D.; LIEHR, J. G. Estrogen, DNA damage and mutations. **Mutation Research**, v. 424, p. 107-115, 1999.

RUSSO-ABRAÃO, T. et al. Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191270, 2018.

SALAUN, C. et al. Identification of a novel transport-independent function of PiT1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p. 34408-34418, 2010.

SANDERS, M. E. et al. Continued observation of the natural history of low-grade ductal carcinoma in situ reaffirms proclivity for local recurrence even after more than 30 years of follow-up.. **Mod Pathol.**, v. 28, n. 5, p. 662-669, 2015.

SANTOS, A. L. et al. Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, n. 2, p. 191–198, 2002.

SAPIO, L. et al. Inorganic Phosphate Prevents Erk1/2 and Stat3 Activation and Improves Sensitivity to Doxorubicin of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 15910-15928, 2015.

SAPIO, L.; NAVIGLIO, S. Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: A Janus Bifrons? **World journal of clinical oncology**, v. 6, n. 6, p. 198-201, 2015.

SARMIENTO-SALINAS, F. L. et al. Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment. **Frontiers in oncology**, v. 9, n. 480, p. 1-13, 2019.

SAVITSKY, P. A.; FINKEL, T. Redox regulation of Cdc25C.. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 20535-20540, 2002.

SCHETINGER, M. R. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.

SCHMID, P. et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2108-2121, 2018.

SELIANOV, V. A. et al. The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 43, p. 29292-29300, 2008.

SENDENSKY, M. M.; MORGAN, P. G. Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. **Experimental gerontology**, v. 41, n. 3, p. 237-245, 2006.

SEOANE, J.; GOMIS, R. R. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 12, p. a22277, 2017.

SHANMUGAMA, M. K. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40, p. 35-47, 2016.

SHIRAZI-BEECHEY, S. P. et al. Epithelial phosphate transport in ruminants, mechanisms and regulation. **Kidney international**, 49(4), 992–996. **Kidney international**, v. 49, n. 4, p. 992–996, 1996.

SHUTO, E. et al. Dietary Phosphorus Acutely Impairs Endothelial Function. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 7, p. 1504-1512, 2009.

SHUTO, E. et al. Dietary Phosphorus Acutely Impairs Endothelial Function., v. 20, n. 7, p. 1504-1512, 2009.

SHVARTSUR, A.; BONAVIDA, B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. **Genes & cancer**, v. 6, n. 4, p. 84-105, 2015.

SILVER, D. P. et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. **Journal Clinical of Oncology**, v. 28, n. 7, p. 1145-1153, 2010.

SINHA, D. et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40, p. 209-232, 2016.

SOARES, I. C. et al. In silico analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 20, n. 2, p. 165-172, 2012.

SOLOMON, D. H. et al. Characterisation of inorganic phosphate transport in bovine articular chondrocytes. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 20, n. 1-4, p. 99-108, 2007.

SOTGIA, F. et al. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburg effect" in positive lymph node tissue. **Cell cycle**, v. 11, n. 7, p. 1445-1454, 2012.

SPROUSE, A. A.; HERBERT, B.-S. Resveratrol Augments Paclitaxel Treatment in MDA-MB-231 and Paclitaxel-resistant MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **Anticancer research**, v. 34, p. 5363-5374, 2014.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 39, p. 5346-5358, 2010.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 10, n. 6, p. 415-433, 2000.

SUN, Y. et al. Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. **Molecules**, v. 24, p. 1131, 2019.

TAKEDA, E. et al. Molecular mechanisms of mammalian inorganic phosphate homeostasis. **Advances in enzyme regulation**, v. 40, p. 285-302, 2000.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

TATSUMI, S. et al. Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p. 1692-1699, 1998.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638-649, 2003.

THOMAS, J. A. et al. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. **Biochemistry**, v. 18, p. 2210–2218, 1979.

TIAN, X. et al. Sodium orthovanadate induces the apoptosis of SH-SY5Y cells by inhibiting PIWIL2. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 1, p. 874–880, 2016.

TORRIANI, A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by Escherichia coli. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 38, p. 460-469, 1960.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 335-344, 2003.

VAN-HORSSSEN, R. et al. Modulation of cell motility by spatial repositioning of enzymatic ATP/ADP Exchange capacity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 1620-1627, 2009.

VANNIER-SANTOS, M. A. et al. Leishmanial protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. **European Journal of Cell Biology**, v. 67, p. 112–119, 1995.

VIEIRA, S. C. E. A. **Oncologia Básica, 1ª edição**. [S.l.]: Fundação Quixote, 2012.

VILA-BELLOSTA, R. et al. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 5, p. 1030-1036, 2007.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. 185-198, 2015.

VOTYAKOVA, T. V.; REYNOLDS, I. J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 138–144, 2004.

WAGNER, C. A. et al. The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 466, n. 1, p. 139-153, 2014.

WANG, Y. et al. The effects and mechanisms of SLC34A2 in tumorigenesis and progression of human non-small cell lung cancer. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 22-52, 2015.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, p. 309-314, 1956.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **The Journal of General Physiology**, v. 8, p. 519-530, 1927.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory**, 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 02 Julho 2020.

WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NADPH Oxidase Inhibitors: New Antihypertensive Agents? **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 9-16, 2007.

WOJTCZAK, L. et al. Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics. Further arguments for the role of Ca(2+) in the mechanism of the crabtree effect. **Eur J Biochem**, v. 263, p. 495-501, 1999.

YAMASHITA, T. et al. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 31, p. 28265-28270, 2002.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental cell**, v. 14, n. 6, p. 818-829, 2008.

YANG, S. Y. et al. Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, n. 7, p. 603–608, 2002.

YANG, Y. et al. Gefitinib enhances sensitivity of endometrial cancer cells to progestin therapy via dual-specificity phosphatase 1. **Oncotarget**, v. 8, n. 70, p. 11536-115369, 2017.

YUE, W. et al. Estrogen receptordependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. **Steroids**, v. 78, p. 161-170, 2013.

ZANOTELLI, M. R. et al. Regulation of ATP utilization during metastatic cell migration by collagen architecture. **Molecular Biology of the Cell**, 1(1):1-9, 2018., v. 1, n. 1, p. 1-9, 2018.

ZHANG , J. et al. NADPH oxidase activation played a critical role in the oxidative stress process in stable coronary artery disease. **American journal of translational research**, v. 8, n. 12, p. 5199-5210, 2016.

ZHOU, D.; SHAO, L.; SPIT, D. R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. **Advances in cancer research**, n. 122, p. 1-67, 2014.

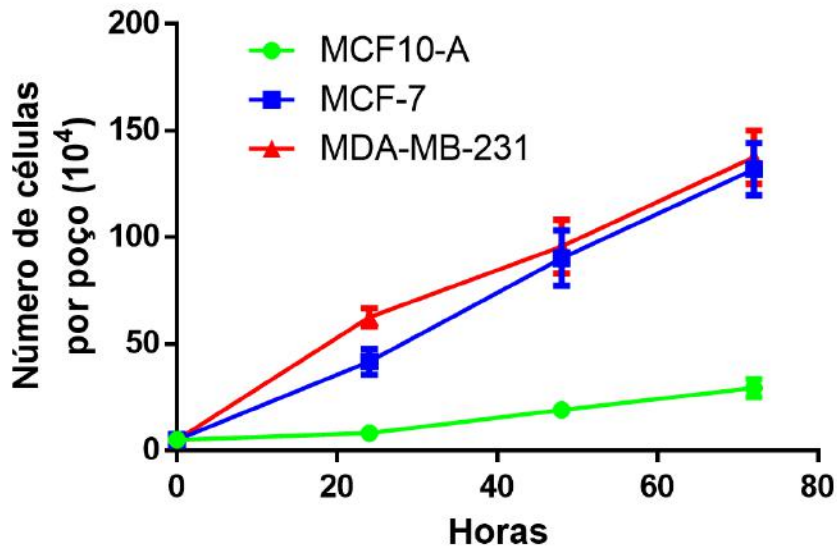
ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4-5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Prostatic acid phosphatase, a neglected ectonucleotidase. **Purinergic Signalling**, v. 5, n. 3, p. 273–275, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1

Curva de crescimento das células MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231.



Células 1×10^4 por poço foram adicionadas em placas de 24 poços. Número de células foram avaliadas usando câmera de Neubauer a cada 24 horas no período de 0-72 horas em meio DMEM/F12 ou IMDM, a 37°C na estufa de 5% de CO_2 . Após o tempo de cada condição, células foram lavadas com PBS e tripsinizadas com $150 \mu\text{L}$, incubadas a 37°C na estufa de 5% de CO_2 .

ANEXO 2

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

1. Russo-Abrahão, T., Lacerda-Abreu, M. A., Gomes, T., Cosentino-Gomes, D., Carvalho-de-Araújo, A. D., Rodrigues, M. F., Oliveira, A., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PloS one*, 13(2), e0191270.
2. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Monteiro, R. Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1870(2), 291–298.
3. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Cosentino-Gomes, D., Nascimento, M., Carvalho-Kelly, L. F., Gomes, T., Rodrigues, M. F., König, S., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2019). H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(9), 2180–2188.
4. Lacerda-Abreu, M.A. Meyer-Fernandes, J.R.(2019) Release of Inorganic Phosphate into the Tumor Environment: Possible Roles of EctoNucleotidases and Ecto-Phosphatases. *Nov Appro in Can Study*. 3(4). NACS.000568.2019.
5. Lacerda-Abreu MA, Meyer-Fernandes JR (2020) Possible roles of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and clinical significance in metastasis human cancer. *Hematol Med Oncol* 5: DOI: 10.15761/HMO.1000200.
6. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Leite Tenório Aguiar, R., Monteiro, R. Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2021). Ectophosphatase activity in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cell biology international*, 45(2), 411–421.
7. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., & Meyer-Fernandes, J. R. (2020). The Roles of Sodium-Independent Inorganic Phosphate Transporters in Inorganic Phosphate Homeostasis and in Cancer and Other Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9298.
8. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., & Meyer-Fernandes, J. R. (2021). Resveratrol is an inhibitor of sodium-dependent inorganic phosphate transport in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell biology international*, 10.1002/cbin.11616. Advance online publication.

RESEARCH ARTICLE

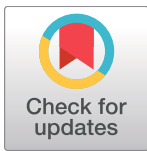
Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231

Thais Russo-Abrahão^{1,2}✉, Marco Antônio Lacerda-Abreu^{1,2}✉, Tainá Gomes¹, Daniela Cosentino-Gomes^{1,2}, Ayra Diandra Carvalho-de-Araújo^{1,2}, Mariana Figueiredo Rodrigues¹, Ana Carolina Leal de Oliveira¹, Franklin David Rumjanek¹, Robson de Queiroz Monteiro¹, José Roberto Meyer-Fernandes^{1,2}*

1 Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* meyer@bioqmed.ufrj.br



OPEN ACCESS

Citation: Russo-Abrahão T, Lacerda-Abreu MA, Gomes T, Cosentino-Gomes D, Carvalho-de-Araújo AD, Rodrigues MF, et al. (2018) Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PLoS ONE* 13(2): e0191270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270>

Editor: Gautam Chaudhuri, Meharry Medical College, UNITED STATES

Received: July 24, 2017

Accepted: January 2, 2018

Published: February 7, 2018

Copyright: © 2018 Russo-Abrahão et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data and figure files are available from the figshare database (DOI: [10.6084/m9.figshare.5711380](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5711380)).

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - <http://cnpq.br/> - 401134/2014-8 to TR-A; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) - <http://www.faperj.br/> - e-26/201.300/2014 to JRM-F; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Abstract

Background

Recent studies demonstrate that interstitial inorganic phosphate is significantly elevated in the breast cancer microenvironment as compared to normal tissue. In addition it has been shown that breast cancer cells express high levels of the NaP_i-IIb carrier (SLC34A2), suggesting that this carrier may play a role in breast cancer progression. However, the biochemical behavior of inorganic phosphate (P_i) transporter in this cancer type remains elusive.

Methods

In this work, we characterize the kinetic parameters of P_i transport in the aggressive human breast cancer cell line, MDA-MB-231, and correlated P_i transport with cell migration and adhesion.

Results

We determined the influence of sodium concentration, pH, metabolic inhibitors, as well as the affinity for inorganic phosphate in P_i transport. We observed that the inorganic phosphate is dependent on sodium transport (K_{0,5} value = 21.98 mM for NaCl). Furthermore, the transport is modulated by different pH values and increasing concentrations of P_i, following the Michaelis-Menten kinetics (K_{0,5} = 0.08 mM P_i). PFA, monensin, furosemide and ouabain inhibited P_i transport, cell migration and adhesion.

Conclusions

Taken together, these results showed that the uptake of P_i in MDA-MB-231 cells is modulated by sodium and by regulatory mechanisms of intracellular sodium gradient.

Nivel Superior (CAPES) - 23038.002352/2017-24 to JRM-F. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FBS, foetal bovine serum; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, PFA, phosphonoformic acid.

General Significance: Pi transport might be regarded as a potential target for therapy against tumor progression.

Introduction

Phosphorus is an essential element found in all forms of life. In mammals, it is obtained from the diet in the anionic form of Pi (H_2PO_4^- or HPO_4^{2-}) through absorption in the small intestine [1]. Inorganic phosphate (Pi) plays a critical role in several cellular processes such as energy metabolism, either in the form of ATP by the energy transfer mechanism, or in its free form as substrates for intermediates of metabolic pathways. As a constituent of ATP, Pi also participates in the mechanisms of phosphorylation and dephosphorylation of intermediates of cellular signaling events. Pi is a fundamental component of phospholipids and nucleotides of DNA and RNA [2]. To satisfy the phosphorus requirements of a healthy mammal, the extracellular Pi is maintained under a relatively narrow range of concentration, between 0.8 and 1.5 mM [1]. Under physiological conditions, Pi is an anionic molecule and, therefore, its diffusion through the membrane lipid bilayer is hindered, requiring thus a protein transport system for translocation from the extracellular to the intracellular medium [3]. In mammals, several inorganic phosphate transporters have been described and can be classified into three different protein families denoted NaPi-I, NaPi-II and NaPi-III. NaPi-I (NPT1) is predominantly expressed in the border membrane of the proximal tubular brush, and functions as an intrinsic Pi transport modulator, [4]. NaPi-II (SLC34) is a sodium-dependent phosphate transporter that carries the phosphate in its monovalent form. It is further classified in the following subfamilies: NaPi-IIa (SLC34A1), NaPi-IIb (SLC34A2), and NaPi-IIc (SLC34A3); NaPi-IIb is found in breast cells [1,5,6,7,8]. The type III, NaPi-III (SLC20) transporters family, comprises proteins responsible for a sodium-dependent phosphate transport in its monovalent form. NaPi-III is divided in two subfamilies: PiT-1 (SLC20A1) and PiT-2 (SLC20A2) [1,4,5,6].

Genome-wide analysis strongly suggests that mutations affect both branches of the regulatory pathways that contribute, simultaneously or not, towards tumorigenesis, namely oncogenes and tumor suppressor genes. These may determine the gain of function of genes dictating growth control and cell survival and inactivate genes that in normal cells promote apoptosis [9]. Given the high degree of interactivity of the network involving cellular signaling pathways and the accumulating evidence assigning to metabolic enzymes the dual role of transcription factors [10], it is not surprising that the cell proliferation and invasiveness typical of cancer cells are intimately connected to metabolic reprogramming and hence a distinct bioenergetic phenotype [11]. The “growth rate hypothesis” was described in cancer cells and it was demonstrated that tumors have elevated phosphorus demands associated with protein synthesis and accelerated proliferation [12]. According to this theory, high phosphorus is required for the rapid growth of tumor, thus having a role in tumorigenesis and tumor progression. Recently, it was observed that the Pi concentration in the tumor microenvironment of breast tumors is significantly elevated as compared to normal mammary glands. In addition, authors documented increased Pi concentrations in highly metastatic tumor xenografts as compared to non-metastatic tumors [13].

There are three important receptors involved with classification of breast cancer: the receptors for the estrogen (ER) and progesterone (PR) hormones or epidermal growth factor receptors (HER-2) [14,15]. According to the classification based on the expression patterns of receptors in breast cancer, there are four molecular subtypes were found: luminal A, luminal B, HER2 and triple-negative overexpression [16]. The MDA-MB-231 cell line (classified in the

triple-negative molecular subtype) is a cellular model with a high metastatic capacity and, therefore, is considered a more aggressive strain compared to MCF-7 (ER+, PR+ and HER is classified as a tumorigenic, but non-metastatic cell line) [17,18].

MDA-MB-231 cells exhibit increased migratory capacity upon increasing Pi concentrations in the growth medium. There are two solute carrier families of Pi transport in mammals: SLC20 and SLC34 and both protein families transport Pi using the electrochemical gradient for Na⁺ [19]. It has been previously described that NaPi-IIb (SLC34A2) is up-regulated in ovarian carcinomas and benign tumors compared to normal ovary tissues [20]. Another study showed that the upregulated expression of SLC34A2 in hepatocellular carcinoma cell lines, and the knockdown of this Pi transporter decrease cell proliferation, migration and invasion as well as the epithelial–mesenchymal transition [21]. In lung cancer cells, SLC34A2 was also necessary for proliferation and tumorigenesis [22]. Overexpression of the NaPi-IIb transporter has been described in breast cancer tumors as opposed to normal tissues and has been proposed as a novel diagnostic marker and a therapeutic target [23]. Thus, the aim of this study was to characterize the Pi transport kinetics in the MDA-MB-231 breast cancer cell line by investigating whether such biochemical features may suggest interference tactics using inhibitors that could impact upon migration and invasive capacity.

Materials and methods

Materials

Reagents were bought from E. Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Radioactive inorganic phosphate (³²P_i) used was from Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). In this work, we used distilled water through a Milli-Q system of resins to prepare all solutions (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Cell culture

MDA-MB-231, T47D and MCF-7 cells were grown at 37°C in Iscoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM—LCG Biotechnology, Brazil) supplemented with sodium bicarbonate, 10% of foetal bovine serum (FBS) (Cripion Biotechnology, Brazil), 100 U/mL penicillin and streptomycin (Thermo Fisher, Brazil). 67NR and 4T1 cell lines, which originated from a spontaneous mammary carcinoma arising in a BALB/c mouse [24], were purchased from Karmanos Cancer Institute (Detroit, MI, USA). Cells were maintained in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with L-GlutaMax, 10 mM sodium carbonate, HEPES Buffer and 10% FBS and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. For the experiments, cells were harvested from the culture medium, washed two times with buffer comprising of 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂ and 50 mM HEPES (pH 7.2). Hank's EDTA solution was used to isolated cells from dishes. Cell number was estimated by counting in a Neubauer chamber. The protein concentration was measured with the Bradford methodology [25].

Pi transport assay in MDA-MB-231

Living MDA-MB-231 cells (10⁴ cells) were incubated at 37°C for 1 hour in a reaction mixture (0.5 mL) containing 116 mM NaCl or choline chloride, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 50 mM HEPES (pH 7.2), 0.8 mM MgCl₂, 0.1 mM KH₂PO₄ and 2.5 μCi/nmol ³²P_i [26]. The reaction was stopped with 0.5 ml of an ice-cold PBS buffer (pH 7.2). Cells were washed with the same cold buffer at 4°C and disrupted with 0.25 mL Hank's solution (5.37 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 136.8 mM NaCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 5.03 mM D-glucose, 4.16 mM sodium

bicarbonate, 6.35 mM EDTA, pH 7.2) and 0.25 ml 0.1% SDS. These lysed cells with the internalized Pi were moved to a filter paper and, then, to a scintillation liquid. Blank values of uptake were obtained as previously described [26].

It was used 0 to 0.5 mM of Pi to measure the substrate affinity ($K_{0.5}$) and maximum rate (V_{max}) of the P_i transporter. Bafilomycin A_1 (100 nM), a vacuolar ATPase inhibitor, and valinomycin (100 μ M), the K^+ ionophore, were also tested. Monensin (100 μ M), a Na^+ ionophore, furosemide (1 mM), a Na^+ -ATPase inhibitor and ouabain (1 mM), a Na^+, K^+ -inhibitor, were tested. The H^+, K^+ -ATPase inhibitor, SCH28080 (100 μ M) and the P_i transport inhibitor, phosphonoformic acid (PFA—5 mM) were also tested. Vehicles: DMSO 1% (bafilomycin A_1 , valinomycin, furosemide and SCH28080), ethanol 1% (monensin), water (ouabain and PFA); controls were performed using these vehicles. At 1% of these vehicles, the values for $^{32}P_i$ uptake obtained were the same obtained with water. The viability of MDA-MB-231 was verified according to the manufacturer's instructions of CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, EUA).

Real-time PCR analysis

Total RNA was purified from MDA-MB-231 cells using TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) as described by manufacturer's manual. After treatment of RNA with DNase I, a first-strand synthesis kit (Invitrogen) was used to generate full-length cDNA from 1 μ g of total RNA. qPCR was carried in StepONE Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA), using a FastStart Master SYBR Green I Kit (from Roche, Mannheim, Germany). The primers for amplification are shown in Table 1. Gene expression data were normalized to an endogenous reference β -actin (ACTB) as previously described [27], and according to the manufacturer's instructions.

Migration assay

Tumor cell migration was assayed in a 48-well Boyden chamber (Neuro Probe Microchemotaxis System, Gaithersburg, MD) using 12- μ m polycarbonate filters, as previously described [28]. 28 μ l of IMDM containing 2.5% FBS was added at the bottom of the chamber as the chemoattractant. At the upper part, 5×10^4 cells/well, pretreated with ouabain, furosemide, monensin or phosphonoformic acid (PFA) for 1h, was added in 50 μ L of medium in the absence of FBS. Controls were performed by pretreating the cells, for 1 h, in the specific drug diluents: 1% DMSO or 1% ethanol in 50 μ L of medium in the absence of FBS., After migration for 1.5h, filters were removed from the chambers, fixed and stained with Panoptic kit (Interlab, São Paulo, Brazil). Tumor cells that had migrated through the membrane were counted in a LX400 light microscopy under a 100 x objective (Labomed Inc, Los Angeles, CA) on at least five random fields. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate.

Table 1. Primers sequences.

Sequence name	Sense primer (5'– 3')	Antisense primer (5'– 3')
NaPi 1	CGTATGTCTTCTCTGGTTTCGTTCTG	CGTAAACTACCAGTGGAAATAGCCC
NaPi-IIa	GTGGCCTCCTTCAACATCCAT	CTGTAAGGAGTCTGGGTGGC
NaPi-IIb	CCCAGCTTATAGTGGAGAGCTTC	GCACCAAATCTTGACAAGACTCTTG
NaPi-IIc	GAATTTAGAGGGCTTTCAGCG	GAGTCCAAGTGCACGATGAGG
ACTB	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.t001>

Adhesion assay

96-well tissue culture plates were performed pre-coated with 32 µg/mL ECM gel (from mouse sarcoma) diluted in phosphate buffered saline (PBS), 100 µL per well for overnight in 4°C and non-specific binding sites in the wells were blocked with 1 mg/mL BSA diluted in PBS for 2 h at room temperature. Cells grown at 80% confluency in IMDM with 10% FBS were pretreated with the phosphate transport inhibitors for 1h, then the cells were trypsinized, suspended in serum-free medium at the concentration of 2×10^4 cells/mL and applied 100 µL for each well incubated under routine condition as above for 3h. After incubation, non-adherent cells were removed by carefully washing twice with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min. Cleaned with PBS two times, stained with 100 µL 0.5% crystal violet for 5 min, washed two times and lysed with 100 µL ethanol of 1% acetic acid solution read at A570. Results were expressed 100% as control [29].

Statistical analysis

All experiments were performed, at least, three times in triplicate. The experiments were represented with values of mean ± SE. We used nonlinear regression analysis of the data to the Michaelis–Menten equation ($K_{0.5}$ and V_{max} values). Significant differences: $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results

Pi transport in different lineages of breast cancer cells

In an initial approach, we assayed the Pi transport in three different human breast cancer cell lines. When we compared them, the most aggressive, MDA-MB-231, had the higher Pi transport activity (Fig 1A). In addition, we employed two isogenic murine breast cancer cells: 67NR, is a low-aggressive, nonmetastatic, cell line and 4T1, is a highly aggressive, metastatic, cell line [24]. As seen in the human cell lines, 4T1 cells presented higher $^{32}\text{P}_i$ transport than 67NR (Fig 1B). Based on these initial results, we opted to concentrate our study specifically on the MDA-MB-231-line. We next analyzed the gene expression pattern of Pi transporters. As shown in Fig 2, MDA-MB-231 cells exhibited the highest NaPi-IIb gene expression levels when compared to the other NaPi transporters (Fig 2).

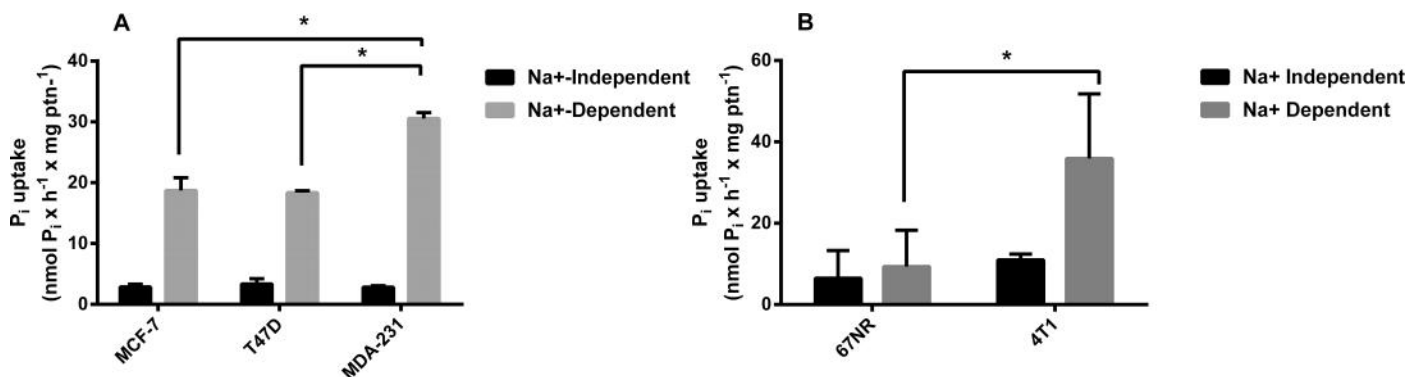


Fig 1. Comparative indices of $^{32}\text{P}_i$ influx in breast cancer cell lines. Intact MCF-7, T47-D or MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells/mL = 1.45 mg protein/mL) (A) and 67NR and 4T1 (B) were incubated for 1 h at 37°C in a reaction mixture containing 116 mM NaCl or 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 10 mM HEPES, 0.8 mM MgCl₂, 0.1 mM KH₂PO₄ and 2.5 µCi / nmol $^{32}\text{P}_i$. The results are the means ± SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions. Asterisks mark significant differences ($p \leq 0.05$) from MDA-MB-231, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey’s multiple comparisons test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g001>

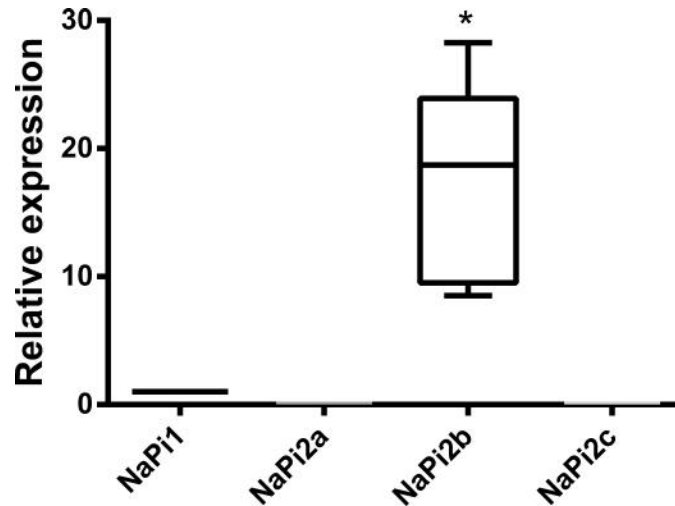


Fig 2. Gene expression analysis of Pi transporters in MDA-MB-231 cells. Total RNA was purified from MDA-MB-231 and, after treatment of RNA with DNase I, a full-length cDNA was generated from RNA. qPCR was carried. Gene expression data were normalized to an endogenous reference β -actin (ACTB). The results are the means \pm SE of 7 experiments, with different cell suspensions. Asterisks mark significant differences ($p \leq 0.05$) from NaPi1, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g002>

Pi uptake and kinetic parameters

The Pi uptake in MDA-MB-231 was evaluated at different times (0 to 60 minutes) and these cells showed a linear uptake for up to 60 minutes (Fig 3A). We did not measure longer times of incorporation because it could lead to saturation. Then, all experiments were carried out at 60 minutes.

NaPi-II (SLC34) is a member of the sodium-dependent P_i transporter family and transports the monovalent form of P_i . Fig 3B shows the influence of NaCl on the Pi transport activity of MDA-MB-231 line. The kinetic parameters of this activity were: $K_{0.5} = 14.11 \pm 2.838$ mM and $V_{max} = 39.72 \pm 1.26$ nmol \times h⁻¹ \times mg protein⁻¹.

To evaluate the affinity of the transport for P_i , we performed the Pi uptake in the P_i concentration range of 5–500 μ M (Fig 3C). The transporter followed a Michaelis-Menten kinetic and the parameter values were calculated, presenting an apparent $K_{0.5} = 84.9 \pm 10.4$ μ M and a $V_{max} = 71.67 \pm 3$ nmol \times h⁻¹ \times mg protein⁻¹.

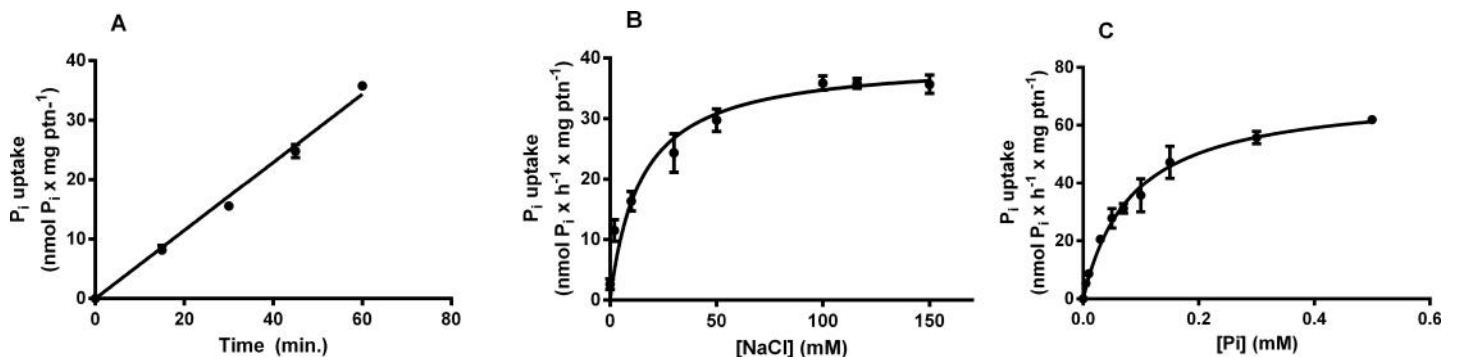


Fig 3. Time course, NaCl dependence and Pi dependence of MDA-MB-231 ³²Pi influx. Intact cells (5×10^4 cells/mL = 1.45 mg protein/mL) were incubated at 37°C in a reaction mixture containing 116 mM NaCl or 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 10 mM HEPES, 0.8 mM MgCl₂, 0.1 mM KH₂PO₄ and 2.5 μ Ci/nmol ³²Pi at various times (A), several NaCl concentrations (0–150 mM) (B) or various concentrations of KH₂PO₄ (0–0.5 mM) (C). The results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g003>

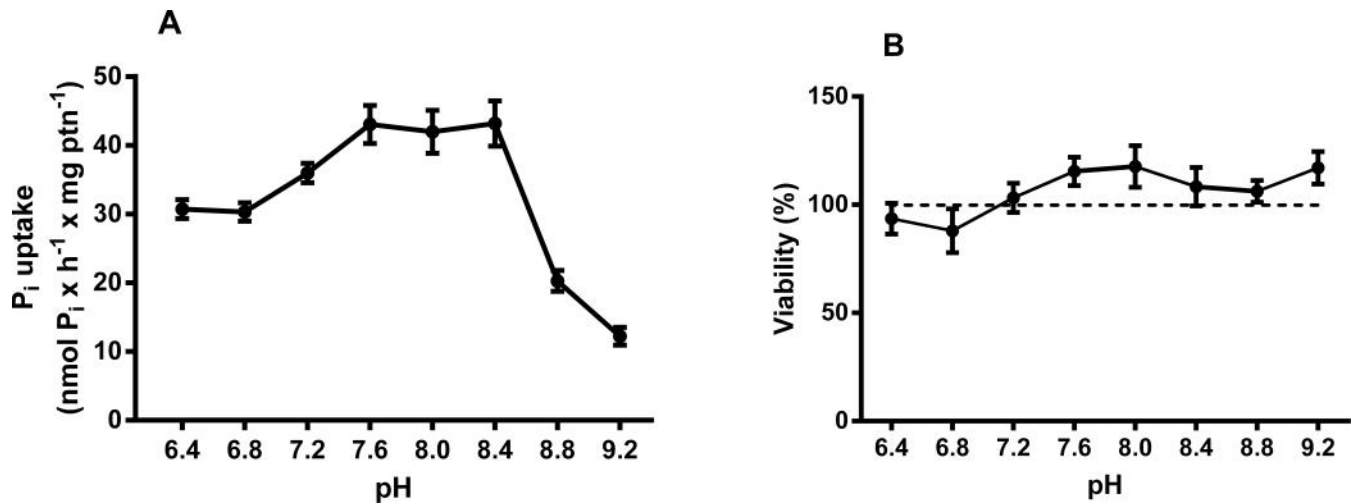


Fig 4. Effect of pH on NaCl-dependent ³²Pi transport in MDA-MB-231. Intact cells (5 x 10⁴ cells/mL = 1.45 mg protein/mL) were incubated for 1 h at 37°C in a reaction mixture containing 116 mM NaCl or 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 0.8 mM MgCl₂, 0.1 mM KH₂PO₄, 2.5 μCi/nmol ³²Pi and 10 mM HEPES, 15 mM Tris, 15 mM MES with pH ranging from 6.4 to 9.2 (A). In these pH ranges, the cells remained viable throughout the experiment according CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (B). These results are the means ± SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g004>

pH values ranging from 6.4 to 9.2 were tested, and the transport was higher at pH 7.3–7.7, as shown in Fig 4A. Fig 4B shows the cell viability during the pH experiments. Thus, all the following experiments were performed at pH 7.2, the same as the mean pH of the cell culture medium.

In order to evaluate the inhibition mechanism of Pi transport, we tested some inhibitors: bafilomycin A₁ (100 nM), SCH28080 (100 μM), valinomycin (100 μM), ouabain (1 mM), Furosemide (1 mM), monensin (100 μM) and PFA (5 mM) (Table 2). With the purpose of verifying the influence of H⁺ gradient on the Pi uptake, we tested the vacuolar H⁺ATPase inhibitor bafilomycin A₁ and SCH28080, a H⁺,K⁺-ATPase inhibitor, that were not able to inhibit the

Table 2. Effect of different agents on Pi transport of MDA-MB-231.

Condition	Activity (nmol P _i x h ⁻¹ x mg ptn ⁻¹)	Viability (% of control)
CTRL	34.61 ± 4.80	100
Bafilomycin A ₁ (100 nM)	31.57 ± 4.78	87
SCH28080 (100 μM)	34.60 ± 6.99	99
Valinomycin (100 μM)	33.70 ± 8.66	116
Ouabain (1 mM)	17.60 ± 3.67*	116
Furosemide (1 mM)	14.20 ± 3.49*	112
Monensin (100 μM)	20.70 ± 5.04*	104
PFA (5 mM)	7.65 ± 1.34*	103
Triton X 100 (1%)	-	28

Reactions were performed at 37°C in a medium (final volume: 0.5 mL) containing 116 mM NaCl or choline chloride (to calculate the Na⁺-dependent P_i transport), 5.4 mM KCl, 5.5 mM D-glucose, 0.8 mM MgCl₂, 50 mM Hepes, pH 7.2, 0.1 mM KH₂PO₄, 2.5 μCi/nmol ³²Pi and 5 x 10⁴ cells/mL (1.45 mg protein/mL) in the absence or presence of other additions, as shown in the table. The results shown are representative of at least three independent experiments. *Denotes significant differences (p < 0.05) after comparison with the control (no addition).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.t002>

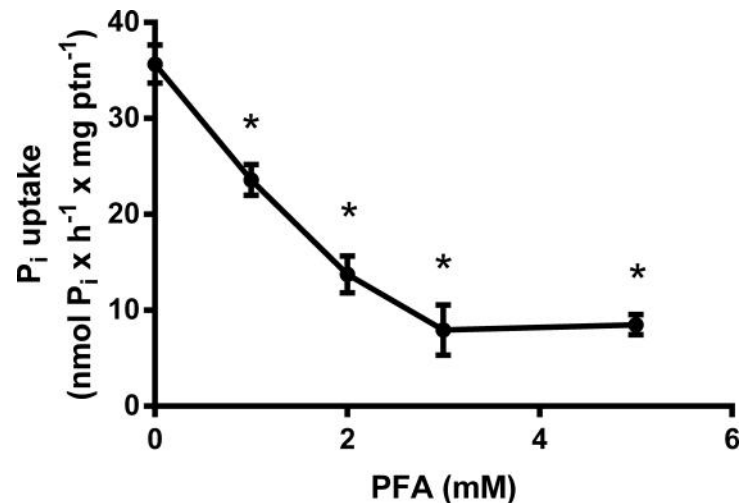


Fig 5. Effect of PFA on NaCl-dependent $^{32}\text{P}_i$ transport in MDA-MB-231. Intact cells (5×10^4 cells/mL = 1.45 mg protein/mL) were incubated for 1 h at 37°C in a reaction mixture containing 116 mM NaCl or 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 0.1 mM KH_2PO_4 , 2.5 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ $^{32}\text{P}_i$ and 10 mM HEPES, in the presence of increasing concentrations of PFA. In these PFA concentrations, the cells remained viable throughout the experiment. The results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions. Asterisks mark significant differences ($p \leq 0.05$) from control, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g005>

P_i transport in this cell, as well as valinomycin, a K^+ ionophore. Only furosemide, ouabain, monensin and PFA inhibited the P_i transport. Taken together, these data suggest the importance of Na^+ gradient to P_i transport, possibly by the involvement of an Na^+, K^+ -ATPase and/or Na^+ -ATPase. The influence of PFA in P_i transport was also verified. Increasing concentrations of this inhibitor were tested and Fig 5 shows the dose-response to PFA. These inhibitors do not affect the viability of MDA-MB-231 (Table 2).

Cell migration and adhesion

In order to evaluate the possible impact of P_i transport inhibition on tumor cell properties, we further tested the effect of furosemide, ouabain, monensin and PFA on cell migration and adhesion. All inhibitors were able to inhibit the migration and adhesion of MDA-MB-231 cells (Fig 6). P_i transport inhibitors decreased cell adhesion by approximately 50%. In the case of migration, the inhibition was also significant, especially in the presence of furosemide, ouabain and PFA. These results indicate that P_i uptake is important for pro-tumoral processes such as cell motility, migration and adhesion. None of the inhibitors affected cell viability (Table 2).

Discussion

Inorganic phosphate (P_i) has been recently proposed as a key component of the “growth rate hypothesis”, in which tumors exhibit high phosphorus concentration due to the requirement of a high amount of ribosomes necessary to produce proteins that support the accelerated proliferation of cancer cells [12]. Consistent with the GRH, it was reported that some tumors have higher phosphorous and RNA content than normal tissue, and that phosphorous in RNA have an important contribution to the total biomass of phosphorous in malignant rather than normal tissues [12]. More recently, it was also demonstrated that interstitial inorganic phosphate, which is elevated in tumor microenvironment, could be a new marker of tumor progression [13]. In this study, the authors propose that measurement of interstitial inorganic phosphate

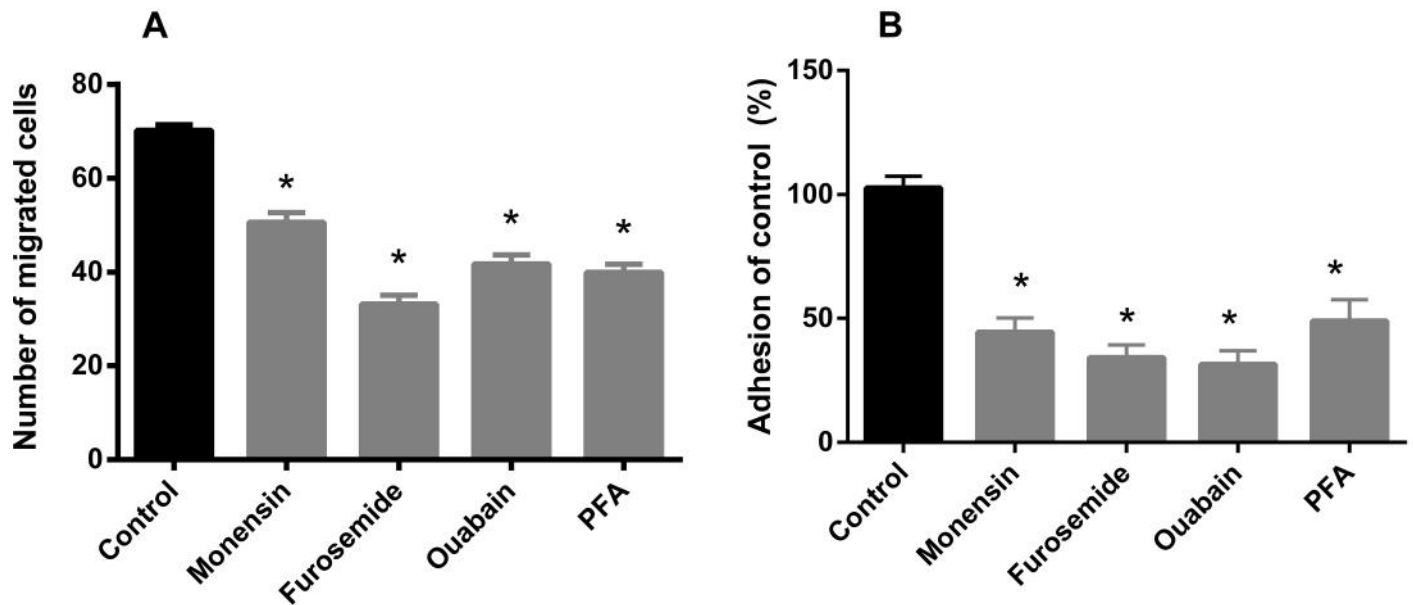


Fig 6. Effect of inhibitors on cell migration (A) and cell adhesion (B) in MDA-MB-231. Intact cells (5×10^5 cells/mL) were incubated for 1 h at 37°C in a Boyden Chamber Assay™ migration (A) or in a adhesion chamber (B) in the presence or absence (control) of inhibitors indicated in the abscissa: ouabain (1 mM), furosemide (1 mM), Monensin (100 μM) and PFA (5 mM). In the presence of these inhibitors at their respective concentrations, the cells remained viable throughout the experiment. The results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions. Asterisks mark significant differences ($p \leq 0.05$) from control, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g006>

would be more sensitive and specific for tumor detection, as compared to blood Pi concentration measurements [13].

In this work we evaluated the biochemical behavior of Pi transport in an aggressive breast cancer cell line, MDA-MB-231 in an attempt to understand the importance of Pi to cancer cells. Initially, we compared the Pi transport of MCF-7, T47D and MDA-MB-231 cells. The high level of Pi transport observed in MDA-MB-231 cell line may reflect aspects of the metabolism associated to the energy demands linked to its metastatic phenotype. Conceivably, the extra Pi incorporated by MDA-MB-231 cells could be utilized as a substrate in ATP biosynthesis, thus enabling cells to sustain their typical proliferation and migration patterns. Indeed, the increased expression of Pi transporters in MDA-MB-231 cells is compatible with such a view [18,30]. Other parameters have been reported that stress the distinct metabolic identities of these cell lines. For example, MCF-7, T47D and MDA-MB-231 cells differ in lactate secretion, 2-NBDG uptake, expression of LDH and sensitivity to histone deacetylase inhibitors [31]. As a matter of fact these differences should not be surprising in view of the diverse phylogenies of MCF-7, T47D and MDA-MB-231 cell lines. Regarding the expression of Pi transporters, NaPi-IIb has been shown to be highly expressed in breast cancer [23]. We observed that the NaPi-IIb had a higher expression compared to other inorganic phosphate transporters in the MDA-MB-231 cell line (Fig 2).

Because a high expression of Pi transporters has been described in breast cancer compared to normal tissue, we have sought to identify the biochemical profile of the Pi transporter (NaPi-IIb) in kinetic terms and to correlate the transport of inorganic phosphate with the tumor processes [23]. According to Forster *et al.* [6] and Takeda [4], the Pi transporter in breast cells would be sodium dependent and with high affinity for inorganic phosphate. Partially, we correlated this high affinity of the phosphate transporter in breast cancer with the high energy requirement typical of cancer cells [30].

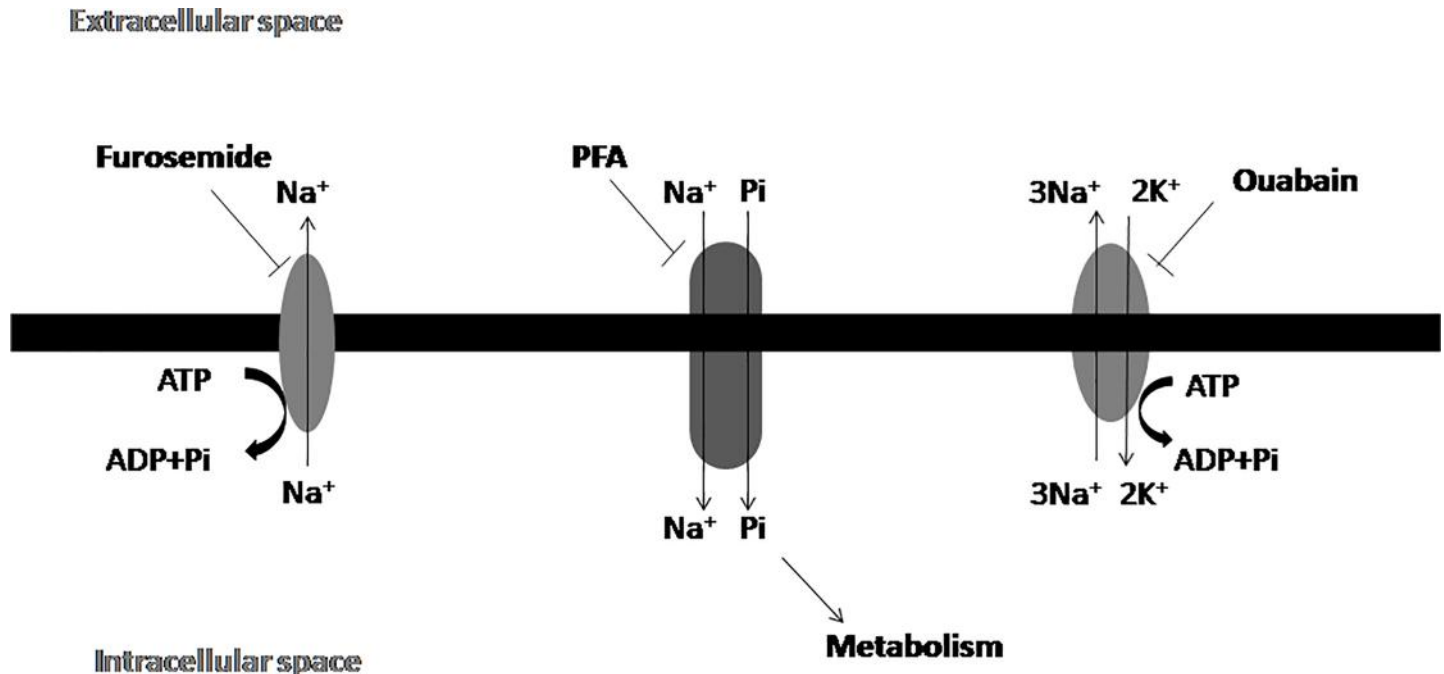


Fig 7. Proposed mechanism for Pi transport mechanism in MDA-MB-231 cells: Na⁺, K⁺-ATPase ouabain-sensitive in the plasma membrane and Na⁺-ATPase furosemide-sensitive plasma membrane coupled to Pi transport. Arrows indicate the direction of ion flow.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270.g007>

Pi is a tryptotic acid and, thus, has different physiological forms according to the pH range in which it is found [1]. Thus, when the Pi transport levels at different pH ranges were tested, we observed higher levels of transport at neutral pH than at more alkaline pH. With this result, we verified that the sodium-dependent inorganic phosphate carrier has a higher affinity for Pi in the diprotic form (H₂PO₄) found in the blood (pH 7.2).

Previous studies have demonstrated that in mammary glands NaPi-IIb was prevalently expressed as the carrier of Pi, a sodium-dependent carrier capable of transporting the Pi molecule. Furthermore, we demonstrated that the Pi transporter in tumor cells was also sodium dependent. In addition, ouabain (1 mM), furosemide (1 mM) and monensin (100 μM) were able to inhibit the transport of Pi. Furosemide inhibits the Na⁺-ATPase and ouabain inhibits the Na⁺,K⁺-ATPase. As a result the Na⁺ ion accumulates in the cytosol, leading to indirect inhibition of Pi transport. Monensin is a Na⁺ ionophore, undoing the gradient of this ion across the cytoplasmic membrane. Collectively these results suggest that the inhibitors may deregulate the intracellular sodium gradient and consequently affect sodium-dependent Pi transport (Fig 7).

Phosphonoformic acid is a competitive antagonist of the Pi transporter belonging to the NaPi-II family [32]. As expected, Pi transport into breast cancer cells in the presence of this compound was inhibited in a dose dependent manner, further evidence of the existence of the Na⁺-dependent Pi transporter on the membrane of these cells.

It was recently demonstrated in other cell types [26,33,34] that some inhibitors of Pi transport, such as FCCP, valinomycin and SCH28080, could have metabolic effects at the mitochondrial level leading to severe ATP depletion, thus indirectly affecting the active Pi uptake. Therefore, we measured the intracellular ATP content under Pi transport conditions, in the absence or presence of monensin, furosemide, ouabain and PFA, which inhibit Pi transport in MDA-MB-231 cells. However, neither inhibitor modulated cellular ATP levels (S1 Fig).

Lin *et al.* [35] identified a dose-dependence of inorganic phosphate for the cell migration of the MDA-MB-231 strain, suggesting the importance of Pi for the metastatic process. Based on this result, we sought to evaluate the importance of the Pi transporter for the metastatic process. Therefore, we used the inorganic phosphate transport inhibitors (monensin, ouabain and furosemide) and the Pi transport inhibitor (PFA) in the cell migration and adhesion assays. Interestingly, we noted a significant inhibition of cell migration, as well as cell adhesion with all inhibitors of Pi transport. PFA has been reported to inhibit the NaPi transport in osteoclast cells [36]. From these results it can be inferred that Pi directly (free Pi), or indirectly (conjugated as ATP) could be accessory to the glycolytic pathway and thus play a role in supplying energy for cellular motility and adhesion of breast cancer cells. Pi uptake appears to be related to the sodium gradient rather than to the Pi transporter itself since ouabain, furosemide and monensin decreased Pi transport, cell migration and adhesion. Therefore, the use of phosphonoformic acid clearly demonstrated that the cells were fully dependent on Pi transport for such functions.

In this study, we characterized the Pi transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. The Pi transport was found to be Na⁺-dependent, had high affinity for Pi and was more active in acid pH range; it was also inhibited by classical Pi transport inhibitor, PFA. Remarkably, the inhibition of Pi transport caused significant decrease in tumor cell migration and adhesion, suggesting a prominent role for Pi transporters in tumor progression. In this context, these proteins might be regarded as potential therapeutic targets in breast cancer.

Supporting information

S1 Fig. Effect of inhibitors on ATP levels MDA-MB-231. Intact cells were incubated for 1h at 37°C in a reaction mixture containing 116 mM NaCl or 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 0.8 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES, in the presence of the indicated inhibitors: monensin, furosemide, ouabain or PFA, as shown in the abscissa; 0.1 mM KH₂PO₄ to measure the ATP levels using an ATP bioluminescent assay Kit. The data shown are the mean activities ± SE of at least three determinations, each with different cell suspensions. Asterisks mark significant differences ($p < 0.05$) from control One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test. CTRL: control of the experiment of Pi transport in the presence of inhibitors vehicles (water, ethanol or dimethyl sulfoxide). (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Mr. Fabiano Ferreira Esteves, Mr. Edimilson Pereira and Ms. Rosângela Rosa de Araújo for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu, Robson de Queiroz Monteiro, José Roberto Meyer-Fernandes.

Formal analysis: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu.

Funding acquisition: Thais Russo-Abrahão, Franklin David Rumjanek, Robson de Queiroz Monteiro, José Roberto Meyer-Fernandes.

Investigation: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu, Tainá Gomes, Daniela Cosentino-Gomes, Ayra Diandra Carvalho-de-Araújo, Mariana Figueiredo Rodrigues, Ana Carolina Leal de Oliveira.

Methodology: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu, Tainá Gomes, Daniela Cosentino-Gomes, Ayra Diandra Carvalho-de-Araújo, Mariana Figueiredo Rodrigues.

Project administration: José Roberto Meyer-Fernandes.

Resources: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu.

Supervision: Franklin David Rumjanek, Robson de Queiroz Monteiro, José Roberto Meyer-Fernandes.

Visualization: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu, Franklin David Rumjanek, Robson de Queiroz Monteiro, José Roberto Meyer-Fernandes.

Writing – original draft: Thais Russo-Abrahão, Marco Antônio Lacerda-Abreu.

Writing – review & editing: Franklin David Rumjanek, Robson de Queiroz Monteiro, José Roberto Meyer-Fernandes.

References

1. Biber J, Hernando N, Forster I. Phosphate Transporters and Their Function. *Annu. Rev. Physiol.* 2013; 75: 535–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183748> Review. PMID: 23398154
2. Jin H, Xu CX, Lim HT, Park SJ, Shin JY, Chung YS, et al. High Dietary Inorganic Phosphate Increases Lung Tumorigenesis and Alters Akt Signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179(1): 59–68. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-306OC> PMID: 18849498
3. Dick CF, Santos ALA, Meyer-Fernandes JR. Inorganic phosphate uptake in unicellular eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1840(7): 2123–2127. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.014> PMID: 24674820
4. Takeda E, Yamamoto H, Nashiki K, Sato T, Arai H, Taketani Y. Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8(2): 191–200. Review. PMID: 15256067
5. Forster IC. Phosphate transporters in renal, gastrointestinal and other tissues. *Adv. in Chronic Kidney Dis.* 2011; 18(2): 63–76. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2011.01.006> PMID: 21406290
6. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol. Aspects Med.* 2013; 34(2–3): 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.007> Review. PMID: 23506879
7. Murer H, Forster I, Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Archiv—Eur. J. Physiol.* 2004; 447(5): 763–767. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1072-5> PMID: 12750889
8. Andrini O, Ghezzi C, Murer H, Forster IC. The leak mode of type II Na⁺-Pi cotransporters. *Channels.* 2008; 2(5): 346–357. PMID: 18989094
9. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculesco VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013; 339(6127): 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122> PMID: 23539594
10. Castello A, Hentze MW, Preiss T. Metabolic enzymes enjoying new partnerships as RNA-Binding proteins. *Trend Endocrinol. Metab.* 2015; 26(12): 746–57. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.012> PMID: 26520658
11. Amoedo ND, El-Bacha T, Rodrigues MF, Rumjanek FD. Cell Cycle and Energy Metabolism in Tumor Cells: Strategies for Drug Therapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery.* 2011; 6: 15–25. PMID: 21110821
12. Elser JJ, Kyle MM, Smith MS, Nagy JD. Biological Stoichiometry in Human Cancer. *PLoS ONE.* 2007; 2(10): e1028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001028> PMID: 17925876
13. Bobko AA, Eubank TD, Driesschaert B, Dhimitruka I, Evans J, Mohammad R, et al. Interstitial Inorganic Phosphate as a Tumor Microenvironment Marker for Tumor Progression. *Sci. Rep.* 2017; 7: 41233. <https://doi.org/10.1038/srep41233> PMID: 28117423
14. Park JH, Lee MY, Han HJ. A potential role for caveolin-1 in estradiol-17beta-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Src, PI3K/Akt, and MAPKs pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(3): 659–65. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.07.010> PMID: 18694845
15. Milani A, Geuna E, Mittica G, Valabrega G. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: Current evidence and future directions. *Help Desk: http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx, World. J. Clin. Oncol.* 2014; 10; 5(5): 990–1001. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i5.990> PMID: 25493235

16. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(215): 1–7. <https://doi.org/10.1186/bcr2889> PMID: 21884641
17. Ross CR, Temburnikar KW, Wilson GM, Seley-Radtke KL. Mitotic arrest of breast cancer MDA-MB-231 cells by a halogenated thieno[3,2-d]pyrimidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015; 25(8): 1715–1717. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.02.071> PMID: 25791452
18. Kwiatkowska E, Wojtala M, Gajewska A, Soszyński M, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2016; 48(1): 23–32. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9637-5> PMID: 26715289
19. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate Transport Kinetics and Structure-Function Relationships of SLC34 and SLC20 Proteins. *Curr. Top. in Membr.* 2012; 70: 313–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00010-7>
20. Shyian M, Gryshkova V, Kostianets O, Gorshkov V, Gogolev Y, Goncharuk I, et al. Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. *Exp. Oncol.* 2011; 33: 94–98. PMID: 21716206
21. Li Y, Chen X, Lu H. Knockdown of SLC34A2 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Invasion. *Oncol. Res.* 2016; 24: 511–519. <https://doi.org/10.3727/096504016X14719078133483> PMID: 28281971
22. Jiang Z, Hao Y, Ding X, Zhang Z, Liu P, Wei X, et al. The effects and mechanisms of SLC34A2 on tumorigenicity in human non-small cell lung cancer stem cells. *Tumor Biol.* 2016; 37: 10383–10392. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4928-y> PMID: 26846105
23. Chen DR, Chien SY, Kuo SJ, Teng YH, Tsai HT, Kuo JH, et al. SLC34A2 as a Novel Marker for Diagnosis and Targeted Therapy of Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2010; 30: 4135–4140. PMID: 21036732
24. Aslakson C.J. & Miller F.R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399–1405 (1992). PMID: 1540948
25. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254. PMID: 942051
26. Russo-Abrahão T, Alves-Bezerra M, Majerowicz D, Freitas-Mesquita AL, Dick CF, Gondim KC, et al. Transport of inorganic phosphate in *Leishmania infantum* and compensatory regulation at low inorganic phosphate concentration. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830(3): 2683–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.017> PMID: 23201200
27. Liu LL, Zhao H, Ma TF, Ge F, Chen CS, Zhang YP. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0117058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117058> PMID: 25617865
28. Mariano-Oliveira A, De Freitas MS, Monteiro RQ, Barja-Fidalgo C. Prothrombin fragments containing kringle domains induce migration and activation of human neutrophils. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(3):517–29. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.09.002> PMID: 17951099
29. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134(3): 365–72. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0292-z> PMID: 17671792
30. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; 10: 1393–1418. Review.
31. Rodrigues MF, Carvalho E, Pezzuto P, Rumjanek FD, Amoêdo ND. Reciprocal modulation of histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and trichostatin A on the energy metabolism of breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* 2015; 116(5): 797–808. <https://doi.org/10.1002/jcb.25036> PMID: 25510910
32. Villa-Belostta R, Sorribas V. Different effects of arsenate and phosphonoformate on Pi transport adaptation in opossum kidney cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2009; 297: 516–525. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00186.2009> PMID: 19553564
33. Dick CF, Dos-Santos AL, Majerowicz D, Paes LS, Giarola NL, Gondim KC, et al. Inorganic phosphate uptake in *Trypanosoma cruzi* is coupled to K(+) cycling and to active Na(+) extrusion. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830(8): 4265–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.034> PMID: 23643965
34. Russo-Abrahão T, Koeller CM, Steinmann ME, Silva-Rito S, Marins-Lucena T, Alves-Bezerra M, et al. H⁺-dependent inorganic phosphate uptake in *Trypanosoma brucei* is influenced by myo-inositol transporter. *J Bioenerg Biomembr.* 2017; 49(2): 183–194. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9695-y> PMID: 28185085
35. Lin Y, McKinnon KE, Ha SW, Beck GR Jr. Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXO2) regulated osteopontin expression. *Mol. Carcinog.* 2015; 54(9): 926–934. <https://doi.org/10.1002/mc.22153> PMID: 24700685

36. Ito M, Haito S, Furumoto M, Uehata Y, Sakurai A, Segawa H, et al. Unique uptake and efflux systems of inorganic phosphate in osteoclast-like cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292: C526–C534. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00357.2006> PMID: 16971494



Review

Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications

Marco Antônio Lacerda-Abreu^{a,b}, Thais Russo-Abrahão^{a,b}, Robson de Queiroz Monteiro^a, Franklin David Rumjanek^a, José Roberto Meyer-Fernandes^{a,b,*}

^a Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b National Institute of Science and Technology in Structural Biology and Bioimaging, Rio de Janeiro, RJ, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Inorganic phosphate uptake
SLC transporters
NaPi-IIb
SLC34A2
PiT1
SLC20A1

ABSTRACT

Inorganic phosphate is one of the most essential nutrients for the maintenance of cell life. Because of its essential role in nutrient supplementation, the study of plasma membrane inorganic phosphate transporters in cancer biology has received much attention in recent years. Several studies suggest that these transporters are up-regulated in tumor cells and thus have been considered to be important promoters of tumor progression. Altered expression levels of inorganic phosphate transporters, such as NaPi-IIb (*SLC34A2*) and PiT-1 (*SLC20A1*), have been demonstrated. The purpose of this review article was to gather the relevant experimental records on inorganic phosphate transporters in tumors and to demonstrate the importance of these proteins in clinical applications. In this work, we demonstrate that for decades, the potential use of the inorganic phosphate transporter as an antigen for the diagnosis of tumor subtypes remained unknown. With the advancement in molecular biology techniques, phosphate transporters have been identified as being associated with cancer. In addition to their altered expression in cancer, several studies have demonstrated other functions of inorganic phosphate transporters, such as transceptors, rearrangements with oncogenes and modifications in the expression of ABC transporters, aiding in the process of proliferation and drug resistance.

1. Introduction

Drug efflux transporters were the only class of solute transporters studied in cancer for a long time due to the great interest in the mechanisms of drug extrusion. Studies about plasma membrane transporters related to nutrient supply to tumor cells formed the basis for the development of cancer diagnoses using non-metabolizable 18F-labelled glucose analogs as substrates for glucose transporters [1].

In addition to glucose and amino acids, inorganic phosphate (P_i) plays important roles in many cell functions. P_i is a fundamental component of phospholipids and the nucleotides that form DNA and RNA. Inorganic phosphate is associated with energy metabolism, either in the form of ATP or in its free form as a substrate for the intermediates of metabolic pathways. P_i is also an integral part of signaling pathways by way of phosphorylation and dephosphorylation reactions of transcription factors and other intermediates of cellular signaling events [2,3]. There is a consensus that tumor cells require relatively more phosphate because of their rapid rates of growth, according to the growth rate hypothesis (GRH) [4,5].

The uptake of these nutrients is possible due to translocation

mediated by transporters across cellular membranes [1]. P_i enters the cells via Na/ P_i cotransporters. These cotransporters constitute two large families of inorganic phosphate transporters that have been characterized in mammals, namely, *SLC20* and *SLC34* [6].

The *SLC20* family consists of two members, namely, PiT-1, which is encoded by *SLC20A1*, and PiT-2, which is encoded by *SLC20A2*. These two *SLC20* family members were first identified in retroviral receptors Givr-1 (gibbonape leukemia virus receptor) and Ram-1 (ratamphotropic leukemia virus receptor) [7–9]. They are sodium-driven phosphate cotransporters that preferentially carry monovalent inorganic phosphate ($H_2PO_4^-$) together with two sodium ions, and they are expressed almost exclusively in the kidney [6,9] (Fig. 1).

The *SLC34* family consists of three members, namely, NaPi-IIa (*SLC34A1*), NaPi-IIb (*SLC34A2*), and NaPi-IIc (*SLC34A3*), with unique amino acid compositions and expression patterns in human tissues. All of the members of this family are sodium-driven phosphate cotransporters although displaying different biochemical kinetics, driving the transport of divalent inorganic phosphate (HPO_4^{2-}) together with two or three sodium ions [10].

The importance of P_i for tumor aggressiveness has been observed in

* Corresponding author at: Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.
E-mail address: meyer@bioqmed.ufjf.br (J.R. Meyer-Fernandes).

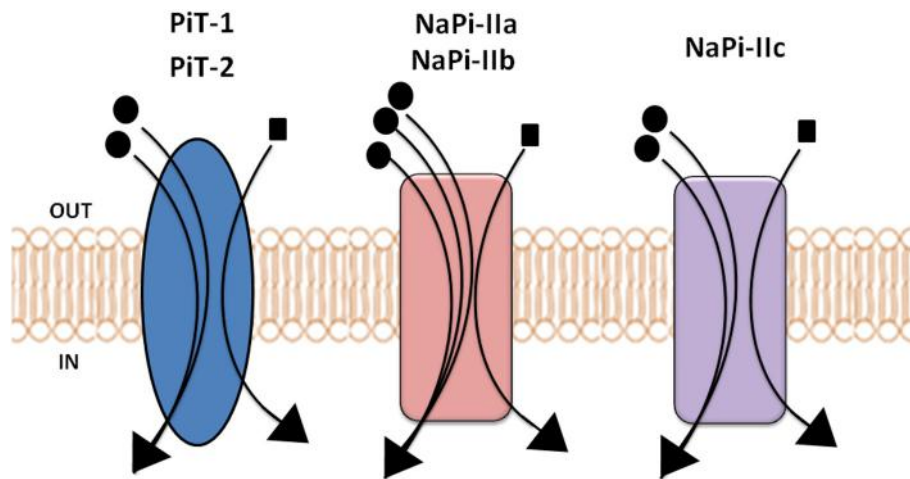


Fig. 1. Transport models of *SLC34A1* (NaPi-IIa) or *SLC34A2* (NaPi-IIb), *SLC34A3* (NaPi-IIc) and *SLC20A1* (PiT-1) or *SLC20A2* (PiT-2). The arrow indicates the direction of flow; the squares represent inorganic phosphate molecules and the circles represent sodium molecules [6].

mouse lung cancer models. According to the authors of that study, high P_i intake (diet fortified with 1.0% P_i) led to greater tumor aggressiveness via the Akt-mTOR regulatory pathway [3]. In skin cancer, a diet fortified with 1.2% P_i in mice showed that P_i was an essential nutrient for cell proliferation and for the promotion of tumorigenesis via the activation of N-Ras [11]. In humans, steady state serum phosphate concentrations generally range from 0.70 to 1.55 mM [11], while intracellular levels of P_i in tumor cells range from 2 to 7 mM [12,13]. It was observed that cell growth in a medium with a high P_i (3 or 5 mM P_i) compared to normal P_i (1 mM P_i) concentration displayed a greater migratory capacity. This could be explained by the expression of osteopontin regulated by Forkhead Box Protein C2 (FOXC2). Two pro-angiogenic factors would be responsive for high concentrations of P_i (3 or 5 mM). [14]. Recently, in mammary gland tumors of mice, a high concentration of P_i in the tumor microenvironment (1.8 ± 0.2 mM P_i , compared to that in normal mammary gland, 0.84 ± 0.07 mM P_i) was identified as a marker for tumor progression [15].

The purpose of this review is to compile the most relevant experimental data about inorganic phosphate transporters in tumor tissues, such as NaPi-IIb or PiT-1 (potentially acting as proto-oncogenes), to evaluate whether the expression profiles of these transporters could suggest mechanisms for the survival of tumor cells as well as tools for clinical applications.

2. *SLC20* family in cancer

2.1. *PiT1* is critical for cancer cells

Increasingly, nutrient transporters have received significant attention within the basic and clinical research settings. These reports have focused on the identification of markers of tumor cell metabolism. A recent study identified on the surfaces of different breast cancer cell lines various metabolite transporters, such as glucose, glutamine and inorganic phosphate, which included one member of *SLC20* family: PiT1. The conclusion drawn was that the expression profile of transporters seems to be unique for each tumor type. In fact, this observation has been exploited as an auxiliary tool for differentiating between tumors [16].

In another experimental study carried out by a different group using genomic expression experiments, a panel of 194 unique transcripts that were targets of miR-138 was identified. When tongue squamous cell carcinoma cells were transfected with miR-138, it was shown that the *SLC20A1* transporter gene was affected. This implied that when miR-138 was down-regulated, which is a critical event for tumor promotion and progression, several genes, including *SLC20A1* were overexpressed

[17].

2.2. *PiT1* expression in cancer

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a member of the ErbB family of tyrosine kinase receptors and is commonly up-regulated in several cancer types [18]. The enhanced EGFR signaling observed in EGFR-mutated cancer cells mediates a number of hallmarks of cancer such as the activation of pro-survival signaling pathways, including PI3K/Akt, MAPK and JNK [18,19]. In a recent study, three glioblastoma lines treated with gefitinib, a specific and reversible EGFR tyrosine-kinase inhibitor, showed a strong decrease in the P_i transport. Gefitinib also promoted a significant inhibition in PiT1 expression, by almost 40%. This was probably due to the regulation of PiT1 expression by the EGFR signaling, which in turn is directly linked to cell proliferation. No experiments were done demonstrating how EGFR signaling blocks the expression of PiT1, leaving open questions to be discussed in the future [20].

The identification of cancer biomarkers involved in the PI3kinase pathway was proposed in experiments carried out with a prostate cancer cell line (PTEN-deficient prostate tumor mouse model - PTEN^{fl/fl}/PB-cre). In that report, the phosphoproteins were modulated by inhibitors of AKT and PDK1. Most of the inhibited proteins were found to be involved in cellular events such as cytoskeletal reorganization, lipid signaling for proliferation, autophagy, apoptosis, vesicle transporters and solute transporters. *SLC20A1* was included among those identified [21].

2.3. *PiT1* functions beyond P_i transport

A human carcinoma study using HeLa cells demonstrated that PiT1 (but not PiT2) was responsible for activation by NF κ B, an important pro-tumoral pathway that might be induced by various cytokines, such as TNF. It was demonstrated that PiT1-silenced cells are more sensitive to TNF-induced apoptosis (30% more sensitive than wild type cells), independent of extracellular P_i and its transport activity. This qualifies the PiT carrier function as a transceptor. Hence, PiT proteins could play roles in sensing P_i and may be important for other cellular functions, such as proliferation [22].

In another study, employing HeLa Cells, silencing of PiT 1 promoted a reduction of about 40% in the number of cells after 72 h of transfection. However, RNAi-resistant PiT1 mutants were able to rescue the cell morphology, proliferation, and transport of PiT1-depleted HeLa cells showing that PiT1 (but not PiT2) is a critical protein for cell proliferation independent of the P_i transport function (Fig. 2) [23].

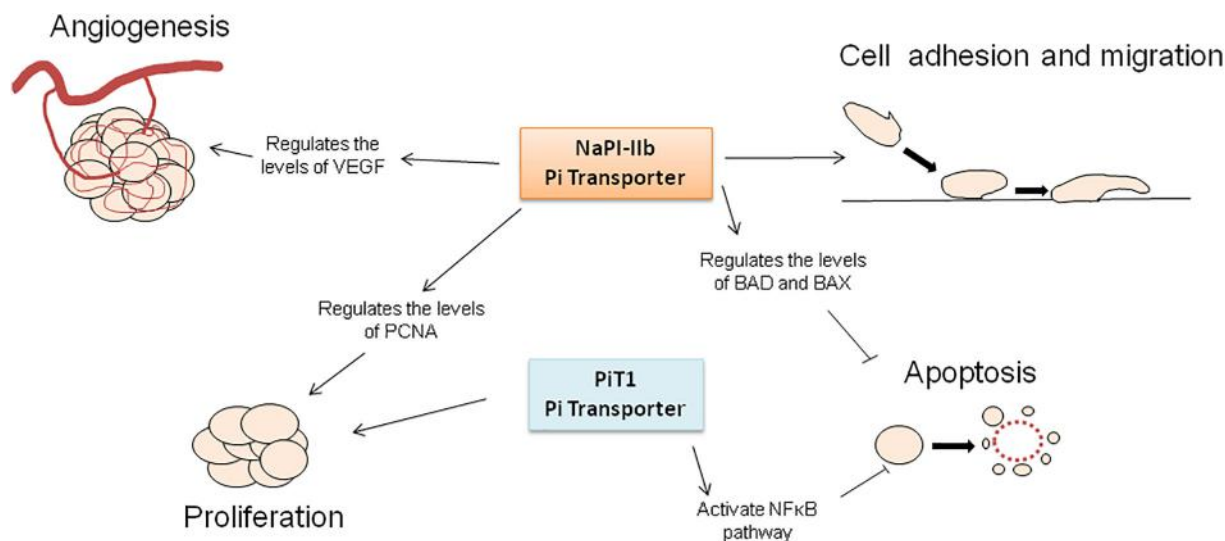


Fig. 2. Illustration of possible roles of Pi transporters in tumor processes. NaPi-IIB regulates VEGF levels, leading to increased angiogenesis. In addition, it regulates the levels of PCNA, resulting in the increase of cell proliferation. NaPi-IIB also regulates the levels of BAD and BAX proteins, leading to apoptosis inhibition. Adhesion and migration are two other cellular processes influenced by NaPi-IIB [3,28,30,31]. PiT1 promotes proliferation and NFκB activation and reduces apoptosis induction [23].

3. SLC34 family in cancer

3.1. NaPi-IIB expression in cancer

The SLC34 family consists of three members, namely, NaPi-IIa (SLC34A1) NaPi-IIB (SLC34A2) and NaPi-IIc (SLC34A3), with distinct primary structures and expression profiles in human tissues. All of them are sodium-driven phosphate cotransporters, but with different kinetic behaviors, driving the transport of divalent inorganic phosphate (HPO_4^{2-}) together with two or three sodium ions [10]. Several studies have only focused their research on the NaPi-IIB transporter, precisely because it is expressed in several human tissues, unlike NaPi-IIa and NaPi-IIc, which are expressed only in kidneys. One of the first reports about the expression of NaPi-IIB in ovarian cancer was carried out using a database library, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE), confirmed by Northern blotting analysis. SLC34A2 was shown to be rarely expressed in normal tissues or non-ovarian cancers, although it was frequently expressed in ovarian cancer cell lines and primary tumors (see Table 1) [24]. A comparative study was conducted analyzing the microarray profiles of various genes from normal thyroid tissue and

from tumor samples from patients with the thyroid papillary subtype, one of the most common thyroid cancers. In that study, NaPi-IIB expression was detected in thyroid tumors [25]. Five years later, similar results were observed in Korean patients, with the same subtype of thyroid cancer displaying increased expression of SLC34A2 [26].

SLC34A2 gene expression was significantly increased in breast cancer compared to the adjacent normal breast tissues (normal tissues: 6.71 ± 0.77 ; tumor tissues: 10.29 ± 0.80 ; $p = 0.001$). Furthermore, there was a similar expression profile for CA125 (normal tissues: 7.26 ± 0.62 ; tumor tissues: 10.51 ± 0.58 ; $p < 0.0001$), a biomarker predictor, thereby suggesting that SLC34A2 might be a novel marker for the diagnosis and targeted therapy of breast cancer [27]. More recently, the kinetic parameters of Na^+ -dependent P_i transport were described in the aggressive human breast cancer cell line MDA-MB-231. The level of P_i transport was higher in cells with higher metastatic capacity. In addition, Na^+ -dependent P_i transport inhibition led to decreased tumor cell migration and adhesion by approximately 50% (Fig. 2) [28].

In lung cancer, several interesting studies have been performed. Initially in 2000, Hashimoto and colleagues [29] reported that NaPi-IIB may be a useful marker of lung cancer. Jin et al., in 2009 [3], employed

Table 1
Different results observed of inorganic phosphate transport in cancer.

Inorganic phosphate transport	Tumor cell type	Results observed compared with normal tissues	Methodology
NaPi-IIB	Ovarian	High levels in ovarian cancer-derived cell lines and primary tumors [24].	Northern blotting [24].
NaPi-IIB	Thyroid	High levels of expression in tissue of thyroid tumor patients [25].	Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Validation of Microarray Data [25].
NaPi-IIB	Breast	High levels of expression in breast tumor tissues [27].	Quantitative real-time PCR analysis [27].
NaPi-IIB	Lung: Non-small cell lung cancer	Low SLC34A2 expression in NSCLC cell lines A549, H1299, H460 and Human bronchial epithelial cell [33,34].	Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis [33,34].
		High level of SLC34A2 expression in CD166 ⁺ cells in patients samples [36].	Quantitative real-time RT-PCR analysis (qPCR) [36].
NaPi-IIB	Kidney	SLC34A2 gene showed 66% in methyl state in patients samples [37].	Promoter methylation analysis [37].
SLC34A2-ROS-rearrangement	Byle: Cholangiocarcinoma	Low expression rates of SLC34a2-ROS-1 fusion [54].	Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis [54].
SLC34A2-ROS-rearrangement	Colorectal	A fusion phase of SLC34a2-ROS-1 was confirmed in patient samples [53].	FISH patterns and confirmed for RT-PCR [53].
SLC34A2-ROS-rearrangement	Stomach (Gastric Cancer)	SLC34A2-ROS1 rearrangement was identified in gastric cancer [52].	Microarrays and RT-PCR analysis [52].

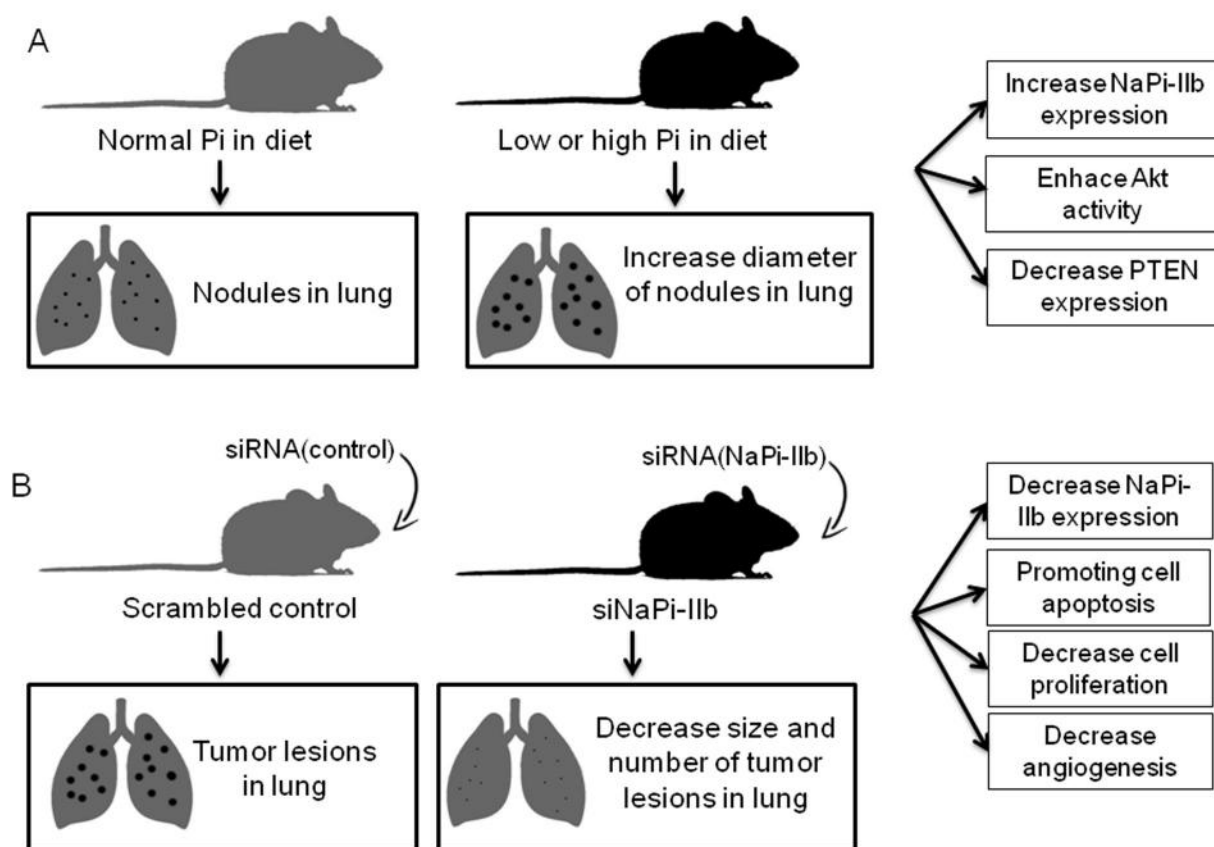


Fig. 3. Diagram showing two experiments using rasLA1 mice as a lung cancer model. A) Three groups of rasLA1 mice with induced lung cancer were subjected to three types of diet with normal, low or high levels of P_i. Low- or high-P_i mice presented enhancement of nodule diameters in the lung, accompanied by high levels of NaPi-IIb expression, increased Akt activity, and decreased PTEN expression. B) RasLA1 mice with induced lung cancer were divided into two groups as follows: the control group (scrambled control) and mice bearing silenced NaPi-IIb RNA (siNaPi-IIb). The siNaPi-IIb group showed a decrease in the size and number of lung lesions, accompanied by a decrease in NaPi-IIb expression levels, a lower rate of proliferation, an increase in apoptosis and a decrease in angiogenesis [3,30,31].

two different mouse lung cancer models (urethane-induced and K-ras^{LA1}) that were subjected to either normal (0.5% Pi on a diet or 6 mg/dl serum phosphate) or high levels of dietary inorganic phosphate (1.0% Pi on a diet or 7 mg/dl serum phosphate). Authors observed high levels of NaPi-IIb expression (2-fold increase in comparison to the control) in mice fed high levels of inorganic phosphate. In addition, there was enhanced AKT activity (3-fold increase in comparison to the control), decreased PTEN expression (40% less than control) and enhanced tumor diameters. In a similar study, Xu et al., in 2010 [30], demonstrated that low dietary levels of P_i (0.01% Pi on a diet or 6.5 mg/dl serum phosphate) compared to control (0.5% Pi on a diet or 8 mg/dl serum phosphate) increased the expression of NaPi-IIb (by ~2-fold) and activated AKT signaling (by ~4-fold) with decreased PTEN expression (30% reduction compared to control) in the lungs of K-ras^{LA1} mice (Fig. 3A). Hong and co-workers [31] used aerosols with small interfering RNA (siRNA) directed against NaPi-IIb that were delivered to the lungs of K-ras^{LA1} mice. The results showed significant decreases in the number and size of lung tumors; increased protein levels of the apoptosis promoters BAX (by ~2-fold) and BAD (by ~2-fold); decreased expression levels of PCNA (33% less than control), a protein that regulates cell proliferation; and decreased levels of VEGF (55.5% less than control) a potent regulator of angiogenesis (Fig. 3B) [31]. These results demonstrated that the P_i transporter is highly expressed in tumor cells and, when the transporter is impaired, important tumor processes might be affected (Fig. 2).

In addition, Christopher and co-workers sought to identify novel candidate tumor suppressor genes (TSGs) using renal cell carcinoma cells by analyzing the gene methylation levels. The group found that 63% of the *SLC34A2* gene were in the methylated state, thus calling

attention, to the investigation of epigenetics-based therapy [32].

Studies about non-small cell lung cancer (NSCLC), the most frequent lung cancer subtype, showed the occurrence of low *SLC34A2* expression in A549 and 95D cells compared to normal cells. Through Millicell chamber, Matrigel invasion, MTT, colony forming and transwell assays, experiments both in vivo and in vitro demonstrated decreases in proliferation, migration and invasion [33,34]. Further, another group demonstrated that *SLC34A2* is a direct target of microRNA-410 (miR-410) and is inhibited by this miRNA either transcriptionally or post-transcriptionally. In this way, miR-410 promoted the growth, invasion and migration of NSCLC cells in vitro, suggesting that miR-410 might constitute a new therapeutic target in NSCLC [35].

A recent study employing cells derived from primary NSCLC tissue samples was able to generate tumors in primary, secondary and tertiary transplants in mice, indicating that these cells display lung cancer stem cell-like characteristics (LCSCs). Strikingly, high levels of *SLC34A2* expression were observed in CD166⁺ cells compared to either CD166⁻ cells or differentiated adherent cells. LCSC CD166⁺ cells with silenced *SLC34A2* showed a reduction in proliferation and tumor volume in addition to a low level of gene expression of intermediates in the Wnt/ β -catenin pathway [36]. That study not only allows for better understanding of the mechanisms regulating this specific population of NSCLC cells, but also provides insight into the gradual improvement of more effective cancer therapies against this disease. Some studies have established a distinction between the expression levels of NaPi-IIb in some histological subtypes of cancers. In ovarian cancer, a higher expression level of NaPi-IIb was detected in ovarian carcinomas; serous (3.62 fold expression.) and clear cell adenocarcinoma (3.76 fold higher expression) than in other histologic subtypes: endometrioid (3.40 fold

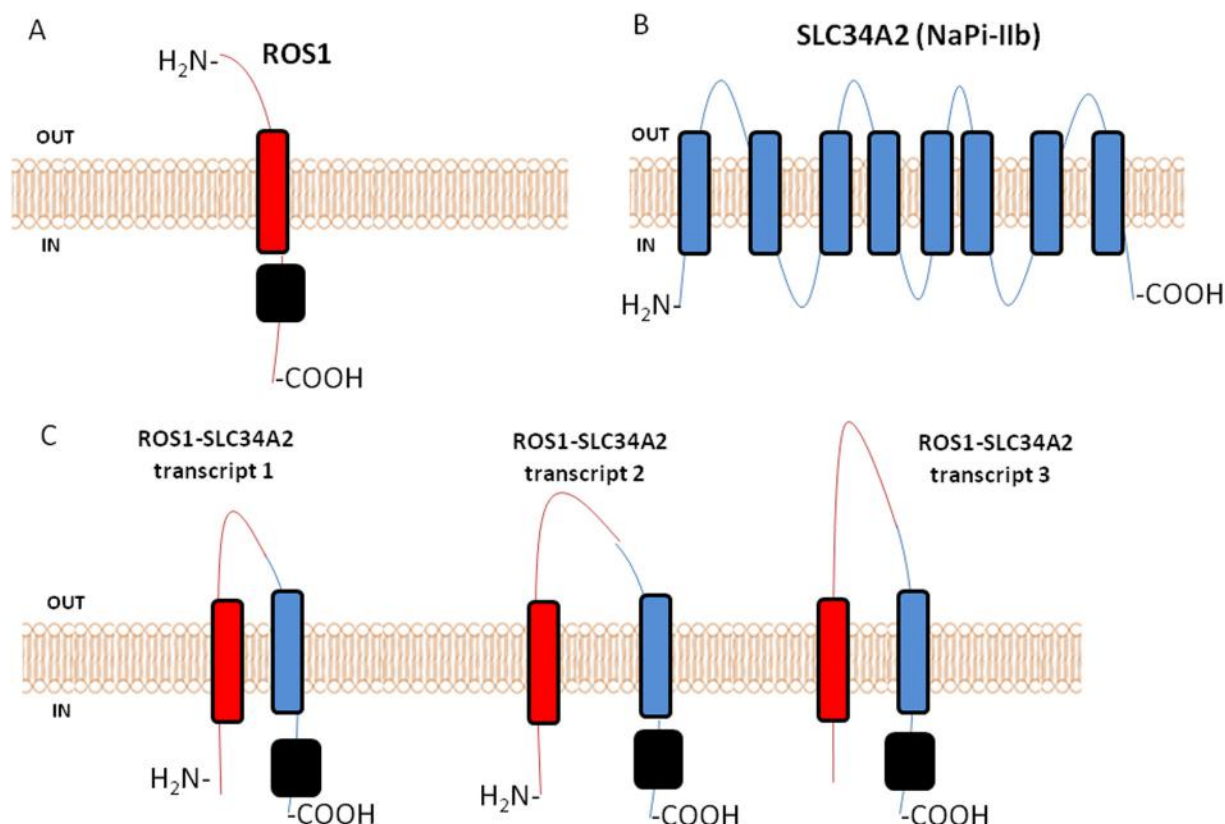


Fig. 4. The ROS-1-*SLC34A2* gene rearrangement. A) ROS1 membrane protein with its single transmembrane domain (dark gray), the H₂N region faces the extracellular space and the catalytic region (black) along with the COOH-terminal region faces the cytosol. B) The diagram shows the complete NaPi-IIb membrane protein with its eight transmembrane domains (light gray) and terminal H₂N and COOH regions facing the cytosol. C) All possible rearrangements of the cytosol-directed H₂N region and the first transmembrane domain of *SLC34A2* (light gray) with the ROS1 transmembrane domain (dark gray) together with the catalytic region (black) and the COOH-terminal region directed towards the cytosol. Three possible rearrangements have been described in the literature because of an alternative splicing. ROS1-*SLC34A2* transcript 1, ROS1-*SLC34A2* transcript 2 [50], ROS1-*SLC34A2* transcript 3 [51].

higher expression), mucinous (3.02 fold higher expression), and normal ovary tissue (2.35 fold higher expression) [37]. Although several phosphate transporter genes had high expression, as *SLC32A2*, the highest levels were found associated with *SLC25A3*, an inorganic phosphate mitochondrial channel. However, no distinction between expression of *SLC25A3* in normal ovary samples and tumor samples, or among different subtypes of ovarian carcinoma, suggesting that this channel might not play a relevant role in tumorigenesis [37].

In kidney cancer, the gene expression of renal cell carcinoma (RCC) was compared to a distinct variant of renal cell carcinoma, clear cell papillary renal cell carcinoma (CCPRCC). The results showed increased NaPi-IIb expression in the former when compared to clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) (approximately 5 times more) [38]. These results suggest that NaPi-IIb could be potentially used to identify the specific subtype of cancer.

3.2. Monoclonal antibody MX35 detects NaPi-IIb

In 1987, Mattes and colleagues developed a number of monoclonal murine antibodies against several human epithelial differentiation antigens expressed in ovarian carcinoma. As a result, the biological functions for some of the antigens were suggested [39]. Based on the studies established by Mattes et al., for many years the MX35 antigen was believed to have a high reactivity in ovarian cancer. This led to the suggestion that the antigen MX35 could be used in several diagnostic methods such as high-resolution positron emission tomography (PET) or even in radioimmunotherapy against ovarian cancer [40–42].

In parallel, another group attempting to chemically classify the MX35 antigen identified it as a 95-kDa glycoprotein stabilized by

disulfide bonds [43]. However, what initially appeared to be a novel membrane protein in ovarian cancer was, in fact, a previously known protein expressed in human tissues. In 2008, Yin and colleagues demonstrated that the MX35 antibody binds to NaPi-IIb, not only in ovarian cancer but also in several other cancers [44–46]. In addition, the use of the MX35 antibody allowed the classification of ovarian cancer and other types of cancers into several subtypes. Due to the high demand for the MX35 antibody as a tool in several studies, a humanized version of this antibody, RebmaB 200, was produced to assist in the investigation of molecular and histological diagnoses and in the development of therapeutic strategies against various cancers [47,48].

3.3. ROS-1 gene rearrangements with SLC34A2

Studies using NSCLS cells showed high levels of ROS-1 (a tyrosine-kinase receptor) gene expression when compared to normal tissues [49]. In addition, it is known that the ROS-1 gene can undergo molecular rearrangement (Fig. 4A) with other genes, including *SLC34A2* (Fig. 4B). Such rearrangement creates a membrane domain that exhibits constitutive tyrosine-kinase activity, which in turn potentiates oncogenic effects. In a previous study performed in HCC78 cells, Rikova and colleagues showed that the NH₂-terminal fragment of the first transmembrane domain of the *SLC34A2* gene (ending in exon 4) links with the ROS1 gene in the region that starts in exon 32, thus including the transmembrane domain and the intracellular region with catalytic function up to the C-terminal region of ROS1 [50] (Fig. 4). Because of the alternative splicing, the fusion mechanism may vary. Thus, exon 4 of the *SLC34* gene can bind with exon 34 of the ROS1 gene, generating a different transcript without interfering with its function of

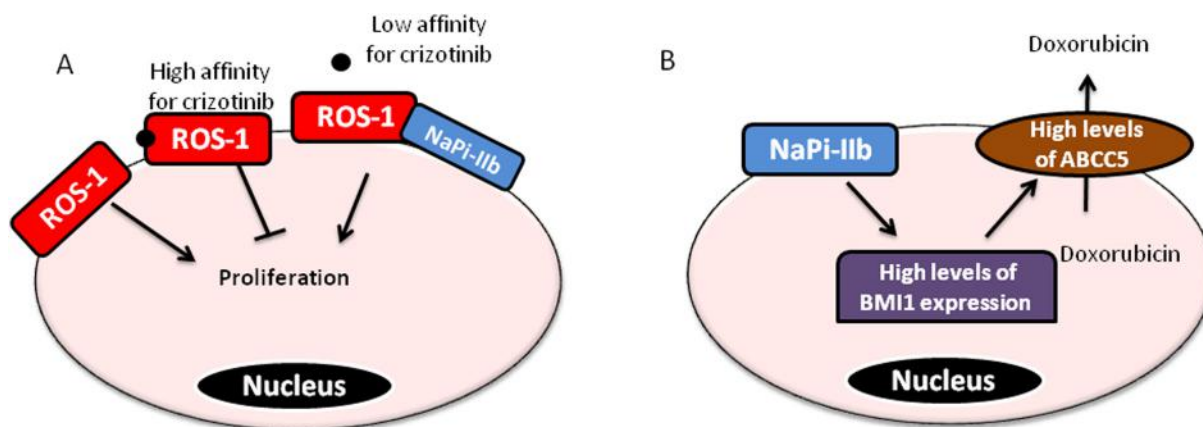


Fig. 5. Mechanisms of drug resistance via NaPi-IIb. A) The receptor tyrosine kinase (ROS-1) inducing proliferation in lung cancer. The ROS-1 effect is blocked because of the high affinity for the agonist crizotinib (black circles). The rearrangement of the ROS1 gene with the SLC34A2 (NaPi-IIb) gene promotes the expression of a membrane protein with structurally low affinity for crizotinib, inducing crizotinib-resistant cell proliferation [55]. B) The presence of NaPi-IIb, independent of its transport activity in breast cancer, modulates BMI1 transcription factor levels, which promotes the regulation of ABCC5 transporter expression levels (ABCC5), which are responsible for the efflux of doxorubicin [57].

constitutively activating ROS1 [50]. Another study demonstrated a third variation of the transcript by the fusion of exon 32 of ROS1 with exon 12 of the SLC34A2 gene [51] (Fig. 4C). Lung cancer was the first type of cancer in which the phenomenon of the rearrangement of ROS1-SLC34A2 was observed. Later, other types of cancers, such as gastric adenocarcinoma, colorectal adenocarcinoma, and cholangiocarcinoma, were reported as displaying transcriptional rearrangements [52–54].

3.4. SLC34A2 confers resistance to drugs in cancer

The rearrangement of the SLC34A2 gene with ROS-1 allowed mechanistic interpretations regarding the survival of lung cancer cells. Indeed, by modifying the structure of ROS-1, the rearrangement decreases the sensitivity of the cancer to crizotinib (a specific inhibitor of ROS-1). Song and collaborators recently confirmed this hypothesis, in 2015, in a study employing HCC78 cells, which are positive for the SLC34A2-ROS1 rearrangement. Those cells exhibited in vitro resistance to crizotinib, used clinically against NSCLC [55] (Fig. 5A).

In another approach, a flow cytometry study of breast cancer cells showed that CD44⁺/CD24⁻ cells constituted a cell population with high potential for aggressiveness [56], displaying chemoresistance to doxorubicin, which is used in breast cancer therapy [57]. These cell populations showed high expression levels of SLC34A2 and, which upon silencing led to loss in, chemoresistance. The authors proposed a regulatory mechanism via the SLC34A2-Bmi1-ABCC5 axis in which the expression of the ABC transporter (ABCC5) became susceptible to the stem cell-related transcription factor (Bmi1), which was modulated by the SLC34A2 transporter [57] (Fig. 5B).

4. Conclusions

In this work, we have reviewed key experiments that use the genes or the translated proteins of different inorganic phosphate transporters in cancer investigations. The purpose of this review was to highlight the importance of inorganic phosphate transporters in tumor biology, which for many years has been used as an antigen marker for several tumor tissues, even though its function remained unknown. The review shows that the Pi transporter plays an important role in tumor biology. Furthermore, the inorganic phosphate carrier can be used as a target for chemotherapeutic agents, for investigations of drug resistance mechanisms, or as a molecular marker for the diagnosis of cancer patients.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.05.001> associated this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Vivian Mary Rumjanek for discussions during the preparation of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 305077/2013-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 23038.002352/2017-24) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ – E-26/201.300/2014).

References

- [1] Y.D. Bhutia, E. Babu, S. Ramachandran, S. Yang, M. Thangaraju, V. Ganapathy, SLC transporters as a novel class of tumor suppressors: identity, function and molecular mechanisms, *Biochem. J.* 473 (9) (2016) 1113–1124, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20150751>.
- [2] L. Sapio, S. Naviglio, Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: a Janus Bifrons? *World J. Clin. Oncol.* 6 (6) (2015) 198–201, <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v6.i6.198>.
- [3] H. Jin, C. Xu, H. Lim, S. Park, J. Shin, Y. Chung, S. Park, S. Chang, H. Youn, K. Lee, Y. Lee, Y. Ha, C. Chae, G.R. Beck, M. Cho, High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters Akt signaling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 (1) (2009) 59–68, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200802-306OC>.
- [4] J.J. Elser, M.M. Kyle, M.S. Smith, J.D. Nagy, Biological stoichiometry in human cancer, *PLoS One* 2 (10) (2007) e1028, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001028>.
- [5] I. Kareva, Biological stoichiometry in tumor micro-environments, *PLoS One* 8 (1) (2013) e51844, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051844>.
- [6] I.C. Forster, N. Hernando, J. Biber, H. Murer, Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families, *Mol. Asp. Med.* 34 (2–3) (2013) 386–395, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.007> (Review).
- [7] D.G. Miller, R.H. Edwards, A.D. Miller, Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus, cell biology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 78–82.
- [8] B. O'hara, S.V. Johann, H.P. Klinger, D.G. Blair, H. Rubinson, K.J. Dunn, P. Sass, S.M. Vitek, T. Robins, Characterization of a human gene conferring sensitivity to

- infection by gibbon ape leukemia virus, *Cell Growth Differ.* 3 (1990) 119–127.
- [9] M.P. Kavanaugh, D. Kabat, Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family, *Kidney Int.* 49 (1996) 959–963, <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1996.135>.
- [10] C.A. Wagner, N. Hernandez, I.C. Forster, J. Biber, The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters, *Pflügers Arch.* 466 (1) (2013) 139–153, <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1418-6>.
- [11] C.E. Camalier, M.R. Young, G. Bohe, C.M. Perella, N.H. Colburn, G.R. Beck, Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis, *Cancer Prev. Res.* 3 (3) (2010) 359–370, <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0068>.
- [12] M. Stubbs, Z.M. Bhujwala, S.G.M. Tozer, L.M. Rodrigues, R.J. Maxwell, R. Morgan, F.A. Howe, J.R. Griffiths, An assessment of 31P MRS as a method of measuring pH in rat tumours, *NMR Biomed.* 5 (1992) 351–359, <http://dx.doi.org/10.1002/nbm.1940050606>.
- [13] A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, S. Rodríguez-Enríquez, R. Encalada, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Modeling cancer glycolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 755–767, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.006>.
- [14] Y. Lin, K.E. Mckinnon, S.W. Ha, G.R.Jr. Beck, Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXO2) regulated osteopontin expression, *Mol. Carcinog.* 54 (9) (2014) 926–934, <http://dx.doi.org/10.1002/mc.22153>.
- [15] A.A. Bobko, T.D. Eubank, B. Driesschaert, I. Dhimitruka, J. Evans, R. Mohammad, E.E. Tchekneva, M.M. Dikov, V.V. Khramtsov, Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41233, <http://dx.doi.org/10.1038/srep41233>.
- [16] V. Petit, G. Massonnet, Z. Maciorowski, J. Touhami, A. Thuleau, F. Némati, J. Laval, S. Cîteau-Joubert, J. Servely, D. Vallerand, J. Fontaine, N. Taylor, J. Battini, M. Sibton, D. Decaudin, Optimization of tumor xenograft dissociation for the profiling of cell surface markers and nutrient transporters, *Lab. Investig.* 93 (5) (2013) 611–621, <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.44>.
- [17] L. Jiang, Y. Dai, X. Liu, C. Wang, A. Wang, Z. Chen, C.E. Heidbreder, A. Kolokythas, X. Zhou, Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma, *Hum. Genet.* 129 (2) (2010) 189–197, <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-010-0915-3>.
- [18] R. Paletta-Silva, N. Rocco-Machado, J.R. Meyer-Fernandes, NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 3683–3704, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14023683>.
- [19] Y. Yang, J. Zhou, X. Li, L. Zhao, Y. Cheng, Y. Lin, J. Wang, L. Wei, Y. Dong, J. Wang, Gefitinib enhances sensitivity of endometrial cancer cells to progesterin therapy via dual-specificity phosphatase 1, *Oncotarget* 15 (8(70)) (2017) 115360–115369, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23264>.
- [20] C. Puech, N. Prevot, N. Perek, Gefitinib inhibits sodium phosphate co-transporter III isoform 1 in a model of human malignant glioma, *Anticancer Res.* 34 (2014) 6527–6536.
- [21] J.N. Andersen, S. Sathyanarayanan, A. Dibacco, A. Chi, T. Zhang, A.H. Chen, B. Dolinski, M. Kraus, B. Roberts, W. Arthur, R.A. Klinghoffer, D. Gargano, L. Li, I. Feldman, B. Lynch, J. Rush, R.C. Hendrickson, P. Blume-Jensen, C.P. Pawelczak, Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: personalized oncology with PI3K pathway inhibitors, *Sci. Transl. Med.* 2 (43) (2010) 43–55, <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3001065>.
- [22] C. Salaun, C. Leroy, A. Rousseau, V. Boitez, L. Beck, G. Friedlander, Identification of a novel transport-independent function of PiT1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 285 (45) (2010) 34408–34418, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.130989>.
- [23] L. Beck, C. Leroy, C. Salaun, G. Margall-Ducos, C. Desdoutets, G. Friedlander, Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity, *J. Biol. Chem.* 284 (45) (2009) 31363–31374, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.053132>.
- [24] L.B. Rangel, C.A. Sherman-Baust, R.P. Wernyj, D.R. Schwartz, K.R. Cho, P.J. Morin, Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression, *Oncogene* 22 (46) (2013) 7225–7232, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207008>.
- [25] B. Jarzab, M. Wieniec, K. Fijarewicz, K. Simek, M. Jarza, M. Oczko-Wojciechowska, J. Włoch, A. Czarniecka, E. Chmielik, D. Lange, A. Pawlaczek, S. Szpak, E. Gubała, A. Świerniak, Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications, *Cancer Res.* 65 (4) (2005) 1587–1598.
- [26] H.S. Kim, D.H. Kim, J.Y. Kim, N.H. Jeoung, I.K. Lee, J.G. Bong, E.D. Jung, Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean, *Korean J. Intern. Med.* 25 (4) (2010) 399–407, <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2010.25.4.399>.
- [27] D.R. Chen, S.Y. Chien, S.J. Kuo, Y.H. Teng, H.T. Tsai, J.H. Kuo, J.G. Chung, SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer, *Anticancer Res.* 30 (2010) 4135–4140.
- [28] T. Russo-Abrahão, M.A. Lacerda-Abreu, T. Gomes, D. Cosentino-Gomes, A.D. Carvalho-De-Araújo, M.F. Rodrigues, A.C.L. Oliveira, F.D. Rumjanek, R.Q. Monteiro, J.R. Meyer-Fernandes, Characterization of inorganic phosphate transport in the 1 triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231, *PLoS One* 13 (2) (2018) e0191270, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191270>.
- [29] M. Hashimoto, D.Y. Wang, T. Kamo, Y. Zhu, T. Tsujiuchi, Y. Konishi, M. Tanaka, H. Sugimura, Isolation and localization of type IIb Na/Pi cotransporter in the developing rat lung, *Am. J. Pathol.* 157 (1) (2000) 21–27, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64512-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64512-9).
- [30] C. Xu, H. Jin, H. Lim, Y. Ha, C. Chae, G. An, K. Lee, M. Cho, Low dietary inorganic phosphate stimulates lung tumorigenesis through altering protein translation and cell cycle in K-rasLA1Mice, *Nutr. Cancer* 62 (4) (2010) 525–532, <http://dx.doi.org/10.1080/01635580903532432>.
- [31] S. Hong, A. Minai-Tehrani, S. Chang, H. Jiang, S. Lee, A. Lee, H.W. Seo, C. Chae, G.R. Beck, M. Cho, Knockdown of the sodium-dependent phosphate co-transporter 2b (NPT2b) suppresses lung tumorigenesis, *PLoS One* 8 (10) (2013) e77121, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077121>.
- [32] C.J. Ricketts, M.R. Morris, D. Gentle, M. Brown, N. Wake, E.R. Woodward, N. Clarke, F. Latif, E.R. Maher, Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma, *Epigenetics* 7 (3) (2012) 278–290, <http://dx.doi.org/10.4161/epi.7.3.19103>.
- [33] W. Yang, Y. Wang, Q. Pu, S. Ye, Q. Ma, J. Ren, G. Zhong, L. Liu, W. Zhu, Elevated expression of SLC34A2 inhibits the viability and invasion of A549 cells, *Mol. Med. Rep.* 10 (3) (2014) 1205–1214, <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.2376>.
- [34] Y. Wang, W. Yang, Q. Pu, Y. Yang, S. Ye, Q. Ma, J. Ren, Z. Cao, G. Zhong, X. Zhang, L. Liu, W. Zhu, The effects and mechanisms of SLC34A2 in tumorigenesis and progression of human non-small cell lung cancer, *J. Biomed. Sci.* 22 (1) (2015) 22–52, <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-015-0158-7>.
- [35] X. Zhang, X. Ke, Q. Pu, Y. Yuan, W. Yang, X. Luo, Q. Jiang, X. Hu, Y. Gong, K. Tang, X. Su, L. Liu, W. Zhu, Y. Wei, MicroRNA-410 acts as oncogene in NSCLC through downregulating SLC34A2 via activating Wnt/ β -catenin pathway, *Oncotarget* 7 (12) (2015) 14569–14585, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7538>.
- [36] Z. Jiang, Y. Hao, X. Ding, Z. Zhang, P. Liu, X. Wei, J. Xi, The effects and mechanisms of SLC34A2 on tumorigenicity in human non-small cell lung cancer stem cells, *Tumour Biol.* 37 (8) (2016) 10383–10392, <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-4928-y>.
- [37] I.C. Soares, K. Simões, J.E.S. Souza, O.K. Okamoto, A. Wakamatsu, M.C. Tuma, G. Ritter, V.A.F. Alves, In silico analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 20 (2) (2012) 165–172.
- [38] K.E. Fisher, Q. Yin-Goen, D. Alexis, J.S. Sirintrapun, W. Harrison, R. Benjamin Isett, M.R. Rossi, C.S. Moreno, A.N. Young, A.O. Osunkoya, Gene expression profiling of clear cell papillary renal cell carcinoma: comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma, *Mod. Pathol.* 27 (2) (2013) 222–230, <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2013.140>.
- [39] M.J. Mattes, K. Look, K. Furukawa, V.K. Pierce, L.J. Old, J.L. Lewis Jr., K.O. Lloyd, Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells, *Cancer Res.* 47 (1987) 6741–6750.
- [40] J. Elgqvist, H. Andersson, T. Back, R. Hultborn, H. Jensen, B. Karlsson, S. Lindegren, S. Palm, E. Warnhammar, L. Jacobsson, Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with (211)At-labeled monoclonal antibody MX35, *J. Nucl. Med.* 46 (11) (2005) 1907–1915.
- [41] T. Bäck, H. Andersson, C.R. Divgi, R. Hultborn, H. Jensen, S. Lindegren, S. Palm, L. Jacobsson, ²¹¹At radioimmunotherapy of subcutaneous human ovarian cancer xenografts: evaluation of relative biologic effectiveness of an emitter in vivo, *J. Nucl. Med.* 46 (2005) 2061–2067.
- [42] J. Elgqvist, H. Andersson, T. Back, I. Claesson, R. Hultborn, H. Jensen, B.R. Johansson, S. Lindegren, M. Olsson, S. Palm, E. Warnhammar, L. Jacobsson, a-radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose, *J. Nucl. Med.* 47 (2006) 1342–1350.
- [43] M. Welshinger, B.W.T. Yin, K.O. Lloyd, Initial immunochemical characterization of MX35 ovarian cancer antigen, *Gynecol. Oncol.* 67 (1997) 188–192, <http://dx.doi.org/10.1006/gyno.1997.4846>.
- [44] B.M. Yin, R. Kiyamova, R. Chua, O.L. Caballero, I. Gout, V. Gryshkova, N. Bhaskaran, S. Souchelnyskiy, U. Hellman, V. Filonenko, A.A. Jungbluth, K. Odunsi, K.O. Lloyd, L.J. Old, G. Ritter, Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas, *Cancer Immun.* 8 (2008) 3.
- [45] R. Kiyamova, V. Gryshkova, G. Ovcharenko, D. Lituyev, S. Malyuchik, V. Usenko, Y. Kozhachenko, V. Gurtovyy, B. Yin, G. Ritter, L. Old, V. Filonenko, I. Gout, Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent phosphate co-transporter NaPi2b, *Hybridoma* 27 (4) (2008) 277–284, <http://dx.doi.org/10.1089/hyb.2008.0015>.
- [46] V. Gryshkova, D. Lituyev, L. Savinska, G. Ovcharenko, I. Gout, V.E. Filonenko, R. Kiyamova, Generation of monoclonal antibodies against tumor-associated antigen MX35/sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, *Hybridoma (Larchmt)* 30 (1) (2011) 37–42, <http://dx.doi.org/10.1089/hyb.2010.0064>.
- [47] M.L. Dos Santos, F.P. Yeda, L.R. Tsuruta, B.B. Horta, A.A. Pimenta, T.L.M. Degaki, I.C. Soares, M.C. Tuma, O.K. Okamoto, V.A.F. Alves, L.J. Old, G. Ritter, A.M. Moro, Rebmab200, a humanized monoclonal antibody targeting the sodium phosphate transporter NaPi2b displays strong immune mediated cytotoxicity against cancer: a novel reagent for targeted antibody therapy of cancer, *PLoS One* 8 (7) (2013) e70332, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070332>.
- [48] S. Lindegren, L.N.S. Andrade, T. Bäck, C.M.L. Machado, B.B. Horta, C. Buchpiguel, A.M. Moro, O.K. Okamoto, L. Jacobsson, E. Cederkrantz, K. Washiyama, E. Aneheim, S. Palm, H. Jensen, M.C.B. Tuma, R. Chammas, R. Hultborn, P. Albertsson, Binding affinity, specificity and comparative biodistribution of the parental murine monoclonal antibody MX35 (anti-NaPi2b) and its humanized version Rebmab200, *PLoS One* 10 (5) (2015) e0126298, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126298>.
- [49] J. Acquaviva, R.E. Wong, A. Charest, The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* 1795 (1) (2009) 37–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.07.006>.
- [50] K. Rikova, A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, K. Lee,

- C. Reeves, Y. Li, Y. Hu, Z. Tan, M. Stokes, L. Sullivan, J. Mitchell, R. Wetzel, J. Macneill, J.M. Ren, J. Yuan, C.E. Bakalarski, J. Villen, J.M. Kornhauser, B. Smith, D. Li, X. Zhou, S.P. Gygi, T. Gu, R.D. Polakiewicz, J. Rush, M.J. Comb, Global survey of Phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung Cancer, *Cell* 131 (6) (2007) 1190–1203, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.025>.
- [51] K. Takeuchi, M. Soda, Y. Togashi, R. Suzuki, S. Sakata, S. Hatano, R. Asaka, W. Hamanaka, H. Ninomiya, H. Uehara, Y.L. Choi, Y. Satoh, S. Okumura, K. Nakagawa, H. Mano, Y. Ishikawa, RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer, *Nat. Med.* 18 (3) (2012) 378–381, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2658>.
- [52] J. Lee, S.E. Lee, S.Y. Kang, I. Do, S. Lee, S.Y. Ha, J. Cho, W.K. Kang, J. Jang, S.I. Ou, K. Kim, Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma, *Cancer* 119 (9) (2013) 1627–1635, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.27967>.
- [53] D.L. Aisner, T.T. Nguyen, D.D. Paskulin, A.T. Le, J. Haney, N. Schulte, F. Chionh, J. Hardingham, J. Mariadason, N. Tebbutt, R.C. Doebele, A.J.E. Weickhardt, M. Varella-Garcia, ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers, *Mol. Cancer Res.* 12 (1) (2014) 111–118, <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0479-T>.
- [54] P. Liu, Y. Wu, L. Sun, Q. Zuo, M. Shi, ROS kinase fusions are not common in Chinese patients with cholangiocarcinoma, *J. South Med. Univ.* 33 (4) (2013) 474–478, <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1673-4254.2013.04.03>.
- [55] A. Song, T.M. Kim, D. Kim, S. Kim, B. Keam, S. Lee, D.S. Heo, Molecular changes associated with acquired resistance to crizotinib in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 21 (10) (2015) 2379–2387, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1350>.
- [56] A. Jaggupilli, E. Elkord, Significance of CD44 and CD24 as Cancer stem cell markers: an enduring ambiguity, *Clin. Dev. Immunol.* 2012 (2012) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/708036>.
- [57] G. Ge, C. Zhou, Y. Ren, X. Tang, K. Wang, W. Zhang, L. Niu, Y. Zhou, Y. Yan, J. He, Enhanced SLC34A2 in breast cancer stem cell-like cells induces chemotherapeutic resistance to doxorubicin via SLC34A2-Bmi1-ABCC5 signaling, *Tumour Biol.* 37 (4) (2015) 5049–5062, <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4226-0>.



H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment[☆]



Marco Antonio Lacerda-Abreu^{a,b}, Thais Russo-Abrahão^{a,b}, Daniela Cosentino-Gomes^{a,b}, Michelle Tanny Cunha Nascimento^{a,b}, Luiz Fernando Carvalho-Kelly^{a,b}, Tainá Gomes^a, Mariana Figueiredo Rodrigues^a, Sandra König^c, Franklin David Rumjanek^a, Robson Q. Monteiro^a, José Roberto Meyer-Fernandes^{a,b,*}

^a Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Inorganic phosphate
H⁺-dependent Pi transport
Breast cancer
MDA-MB-231

ABSTRACT

Tumor microenvironment has a high concentration of inorganic phosphate (Pi), which is actually a marker for tumor progression. Regarding Pi another class of transporter has been recently studied, an H⁺-dependent Pi transporter, that is stimulated at acidic pH in Caco2BBE human intestinal cells. In this study, we characterized the H⁺-dependent Pi transport in breast cancer cell (MDA-MB-231) and around the cancer tissue. MDA-MB-231 cell line presented higher levels of H⁺-dependent Pi transport as compared to other breast cell lines, such as MCF-10A, MCF-7 and T47-D. The Pi transport was linear as a function of time and exhibited a Michaelis-Menten kinetic of $K_m = 1.387 \pm 0.1674$ mM Pi and $V_{max} = 198.6 \pm 10.23$ Pi \times h⁻¹ \times mg protein⁻¹ hence reflecting a low affinity Pi transport. H⁺-dependent Pi uptake was higher at acidic pH. FCCP, Bafilomycin A1 and SCH28080, which deregulate the intracellular levels of protons, inhibited the H⁺-dependent Pi transport. No effect on pHi was observed in the absence of inorganic phosphate. PAA, an H⁺-dependent Pi transport inhibitor, reduced the Pi transport activity, cell proliferation, adhesion, and migration. Arsenate, a structural analog of Pi, inhibited the Pi transport. At high Pi conditions, the H⁺-dependent Pi transport was five-fold higher than the Na⁺-dependent Pi transport, thus reflecting a low affinity Pi transport. The occurrence of an H⁺-dependent Pi transporter in tumor cells may endow them with an alternative path for Pi uptake in situations in which Na⁺-dependent Pi transport is saturated within the tumor microenvironment, thus regulating the energetically expensive tumor processes.

1. Introduction

In many, if not all living organisms inorganic phosphate (Pi) is obtained from the diet in three anionic forms (H₂PO₄, HPO₄ or H₃PO₄). Pi is essential for several biochemical reactions such as the kinase/phosphatase signaling, formation of ATP, biosynthesis of lipids, carbohydrates and nucleic acids [1,2].

In healthy mammals, the extracellular [Pi] is maintained at relatively narrow range concentrations, between 0.7 and 1.55 mM [3,4]. Pi is absorbed by cells through Pi transporters. It has been established that Pi is transported mainly via Na/Pi cotransporters, consisting of two large carrier families: SLC20 (which includes PiT-1, encoded by

SLC20A1 gene, PiT-2, encoded by SLC20A2 gene), and SLC34 (which includes NaPi-IIa, encoded by SLC34A1, NaPi-IIb, encoded by SLC34A2 and NaPi-IIc, encoded by SLC34A3) [5–9].

Although Na⁺-dependent Pi transporters have been investigated in detail, studies on another class of H⁺-dependent Pi transporters stimulated at acidic pH are emerging [10–14]. Shirazi-Beeche and co-workers observed a Pi transport insensitive to phosphonoformic acid (PFA,) a specific inhibitor of Na⁺-dependent Pi transport in oocytes [10].

H⁺-dependent Pi transporter has been thoroughly investigated in osteoclasts-like cells demonstrating that the intracellular pH decreased with the addition of Pi and that H⁺-dependent Pi transport was

[☆] This work is dedicated to Ottilia Rodrigues Affonso Mitidieri on her 92th birthday.

* Corresponding author at: Laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

E-mail address: meyer@bioqmed.ufjf.br (J.R. Meyer-Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.015>

Received 23 February 2018; Received in revised form 20 December 2018; Accepted 6 January 2019

Available online 26 April 2019

0925-4439/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

regulated by a $V\text{-H}^+$ -ATPase, suggesting that it could be involved in the removal of intracellular protons and acidification of the extracellular milieu [12].

Studies on human intestinal cells (Caco2BBE) showed that the phosphate transport is uniquely Na^+ -independent, displaying more than one kinetic component, and at least one of them being an H^+ -dependent process [13]. When these cells were incubated with high levels of phosphate (4 mM), an independent uptake of Na^+ was stimulated [13].

Compared to normal cells it has been established that tumor cells have a higher demand for phosphate due to their rapid growth rates. This is in accordance with the Growth Rate Hypothesis (GRH) [15–17]. Indeed the intracellular levels of Pi in tumor cells have been shown to range from 2 to 7 mM [15,18,19].

For instance, the difference between Pi in the tumor micro-environment 1.8 ± 0.2 mM Pi, and that of normal mammary gland, 0.84 ± 0.07 mM Pi was considered to be a marker for tumor breast cancer cell lines. The markers are classified by expression patterns of oncogenic receptors, such as MCF-7 and T47-D cells (Luminal A, ER+, PR+ and HER-) or MDA-MB-231 (triple-negative overexpression: ER-, PR- and HER-) [15,20–22]. Studies in vitro with breast cancer cells, such as MCF-7, T47-D and MDA-MB-231, have demonstrated that MDA-MB-231 exhibits an increased migratory capacity when compared to MCF-7 and T47-D [23]. It has also been shown that the migration of MDA-MB-231 cells was enhanced in the presence of high Pi concentrations (3 or 5 mM), this being a hallmark of the metastatic process [24]. SLC34A2 gene expression is significantly increased in breast cancer compared to adjacent normal breast tissues. Overexpression of SLC34A2 gene was similar to that of CA125, one of the well-known cancer biomarkers. This observation suggests that SLC34A2 may be a novel marker for diagnosis and potentially a target for the therapy of breast cancer [25]. Recently, we measured the kinetic parameters of sodium-dependent Pi transport in the aggressive human breast cancer cell lines. The Pi transport level was found to be higher in cells with greater metastatic potential such as MDA-MB-231. In addition, inhibition of Na^+ -dependent Pi transport in those cells reduced tumor cell migration and adhesion [26] yet another indication that the metastatic phenotype might be functionally associated to Pi transport.

As an extension of these previous observations in the present work we aimed at determining the inorganic phosphate transport in the presence of high levels of Pi (1 mM) in different human breast cell lines including the non-tumorigenic MCF-10A and the malignant MCF-7, T47-D and MDA-MB-231. We further characterize biochemically the H^+ -dependent inorganic phosphate transport on MDA-MB-231 cells seeking a possible association between the H^+ -dependent Pi transport and cell adhesion and migration in this tumor cell line.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Reagents were purchased from E. Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All solutions were prepared with Milli-Q water (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). The inorganic radioactive phosphate (^{32}Pi) was supplied by the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN).

2.2. Cell culture

Human breast non-tumorigenic epithelial cell line, MCF-10A, were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), 10% fetal bovine serum (FBS), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), 20 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hydrocortisone, pH 7.4 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), 100 U/mL penicillin and streptomycin (Thermo Fisher,

Brazil). MCF-10A cells, genotyped yielding a profile that confirms their identity by comparing it to data of ATCC, DSMZ, CLIMA and ICLAC, was kindly supplied by Jerson Lima da Silva from the Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil and. Breast cancer cell lines (MDA-MB-231, T47D and MCF-7) were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in Iscoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM-LCG Biotechnology, Brazil) supplemented with sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS) (Cripion Biotechnology, Brazil), 100 U/mL penicillin and streptomycin (Thermo Fisher, Brazil). IMDM contains 1 mM Pi and added NaH_2PO_4 , pH was adjusted to 7.4 with HCl (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO).

Prior to the experiments, breast cancer cell lines were washed twice with a free-phosphate buffer solution containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl_2 and 50 mM HEPES (pH 7.2). Cells used for experimental conditions indicated as H^+ -dependent (or Na^+ -independent) were washed with buffer solution containing 116 mM choline chloride, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl_2 and 50 mM HEPES (pH 7.2). Adherent cells were dissociated after incubation at 37°C , 5% CO_2 with a trypsin solution (2.5 g/L, pH 7.2, 0.05 mL/ cm^2), and the number was estimated by counting in a Neubauer chamber. Protein concentration was measured using the Bradford method [27].

2.3. Pi transport assay

MCF-10A, MDA-MB-231, T-47D and MCF-7 (5×10^4 cells per well) were incubated at 37°C , 5% CO_2 atmosphere, for 40 min in a reaction mixture (0.5 mL) containing 116 mM NaCl or choline chloride, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 50 mM HEPES (pH 7.2), 0.8 mM MgCl_2 , 1 mM KH_2PO_4 and 2.5 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ ^{32}Pi . In parallel, the transport of Pi was carried out at 4°C as a control (blank values) [28]. Reactions were stopped and cells was washed with 0.5 mL of an ice-cold phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.2) and cells were lysed with 0.5 mL SDS 0.1%. These internalized Pi released by cell lysis was transferred to a filter paper which was then immersed in scintillation liquid [26,28].

To determine Pi H^+ -dependent (or Na^+ -independent) transport values, NaCl was replaced by choline chloride. In order to determine Pi Na^+ -dependent activity, transport values of Pi in the presence of NaCl were subtracted from the values of transport of Pi in the presence of choline chloride, thus deriving the NaCl stimulated fraction.

To measure substrate affinity (K_m) and maximum rate (V_{max}) of the Pi transporter concentrations of Pi ranging from 0 to 5 mM Pi were used. Bafilomycin A1 (100 nM), the vacuolar ATPase inhibitor, valinomycin (100 μM), the K^+ ionophore, FCCP (10 nM), the H^+ ionophore, and monensin (100 μM), the Na^+ ionophore, were tested. The H^+ , K^+ -ATPase inhibitor, SCH28080 (100 μM), 4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), an anion exchange inhibitor and the Pi transport inhibitors, phosphonoformic acid (PFA-5 mM), phosphonoacetic acid (PAA-1 mM) and arsenate (1 mM) were also tested. Vehicles were: 1% DMSO (bafilomycin A1, valinomycin, furosemide and SCH28080), ethanol 1% (monensin), and water (DIDS, PFA, PAA, arsenate) were used in control conditions. At 1% of these vehicles, the values obtained for ^{32}Pi uptake were the same as those obtained with water. The viability of MDA-MB-231 was tested using the CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.4. Real-time PCR analysis

Total RNA from MDA-MB-231 cells was purified from TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) as described in the manufacturer's manual. After treatment of RNA with DNase I, a first-strand synthesis kit (Invitrogen) was used to generate the full-length cDNA from 1 μg of total RNA. qPCR was performed on StepONE Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) using a FastStart Master SYBR Green I kit (from

Roche, Mannheim, Germany). The expression data of the NaPi-IIb gene (sense primer: 5'-CCCAGCTTATAGTGGAGAGCTTC-3'; antisense primer: 5'-GCACCAATCTTGACAAGACTCTTG-3') were normalized to an endogenous reference (β -actin, sense primer: 5'-TGACGTGGACATCCGC AAAG-3'; antisense primer: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3') as previously described [29] and according to the manufacturer's instructions.

2.5. Proliferation assay

MDA-MB-231 cells (1×10^4 cells per well) were seeded in 24-well plates. After 12 h, 1 mM of PAA was added, and cells were incubated for different times at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. After the respective incubation time (0–60 h), cells were washed twice with PBS, trypsinized and quantified using a Neubauer chamber.

2.6. Adhesion assay

96-Well culture plates were pre-coated with 32 μ g/mL ECM gel (rat sarcoma) diluted in PBS. Then 100 μ L per well were added for 12 h at 4 °C. In order to block non-specific, background binding sites of the wells, they were blocked with 1 mg/ml BSA, diluted in PBS for 2 h at room temperature. 100 μ L of MDA-MB-231 cells suspended in serum-free medium at 2.5×10^4 cells/well were added to each well coated with ECM gel in the absence or presence of 1 mM PAA and maintained at 37 °C, 5% CO₂, for 12 h. After incubation, non-adherent cells were carefully removed by washing twice with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min. Fixed cells were then washed with PBS twice, stained with 100 μ L of 0.5% crystal violet, for 5 min and washed further (2 \times) with PBS. The washed cells were lysed with 100 μ L acetic acid (1% in ethanol) and stained with crystal violet. Cell lysates were read spectrophotometrically at 570 nm. Results were expressed as control percentage [30].

2.7. Migration assay

24 well plates Corning® Transwell® were used for migration assays through the permeable supports with 6.5 mm insert, and polycarbonate membrane pore with 8.0 μ m. MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells/well) were suspended in serum-free medium and added to the upper chamber in the absence or presence of 1 mM PAA, maintained at 37 °C, 5% CO₂, for 24 h. After incubation, the non-adherent cells were removed after two washes with PBS, and subsequently, cells were trypsinized and quantified using Neubauer chamber.

2.8. Optical quantification of intracellular pH

To analyze changes in intracellular pH (pHi) after Pi influx, MDA-MB-231 cells (1×10^5 cells per well) were washed three times in buffer solution containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂ and 50 mM HEPES (pH 7.2) and incubated for 30 min with 6 μ M BCECF-AM (Thermo Fisher). Cells were washed to remove the excess extracellular BCECF-AM and plated in 96 well plates with same buffer solution. Time 0 measurements were performed just before the addition of 1 mM KH₂PO₄. Intracellular pH changes were quantified using a VICTOR multiplate reader with excitation and emission wavelengths of 500 and 550 nm, respectively, according to manufacturer's instructions. pHi was measured at 2-minute intervals after addition of 1 mM KH₂PO₄. The ratio of fluorescence to excitation emission was converted to pH values using high-K nigericin method [31].

2.9. Immunofluorescence imaging

MDA-MB 231 cells were treated or not with 1 mM PAA for 24 h. Cells were then rinsed two times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for

5 min and unspecific sites were blocked in 5% PBS-BSA for 2 h. Samples were then incubated at 4 °C overnight with mouse-anti-vimentin (1:100; DAKO clone V9) or mouse-anti-E-cadherin (1:100; BD610182) antibodies. After extensive wash, samples were stained with goat-anti-mouse IgG (H + L) secondary antibody conjugated with Alexa Fluor®-594 (1:500; Molecular Probes A11032) for 1 h at room temperature and extensively washed. Slides were mounted using ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI. Images were taken using confocal high-resolution LSM 710 equipped with Elyra PS.1 system and sCMOS-pco camera (ZEISS). Images were analyzed by ZEN lite blue edition software (ZEISS). Fluorescence intensities were quantified by Image J software as the pixel of red-staining intensity per cell (from 10 cells for each experimental condition). Statistical significance of the quantification was analyzed applying unpaired *t*-test.

2.10. Statistical analysis

In all cases, at least three independent experiments were performed in triplicate. The values presented in all experiments represent the mean \pm SE. The kinetic parameters (apparent values of K_m and V_{max}) were calculated using the non-linear regression analysis of data for Michaelis-Menten equation. Linear regression analysis of Lineweaver-Burk plots was also determined. Differences were considered significant at $p < 0.05$ by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test, unless otherwise specified in the figure legends. All statistical analyzes were performed with GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA).

3. Results

3.1. Pi transport in different breast cancer cells lineages

One non-tumorigenic cell line (MCF-10A) and three breast cancer cell lines were used to measure the level of H⁺-dependent (or Na⁺-independent) Pi transport with 1 mM Pi: MCF-7, T47D (both classified as luminal A) and MDA-MB-231 (classified as triple negative) [21,22]. MCF-10 presented H⁺-dependent Pi transport (Fig. 1). It is important to note that, in the presence of 1 mM Pi, the Na⁺-dependent Pi transport is saturated. Cell lines classified as luminal A (MCF-7 and T47-D) also presented H⁺-dependent Pi transport levels without significant differences among them. However, MDA-MB-231 line displayed a higher level of H⁺-dependent Pi transport as compared to MCF-10, MCF-7 and T47-D (Fig. 1).

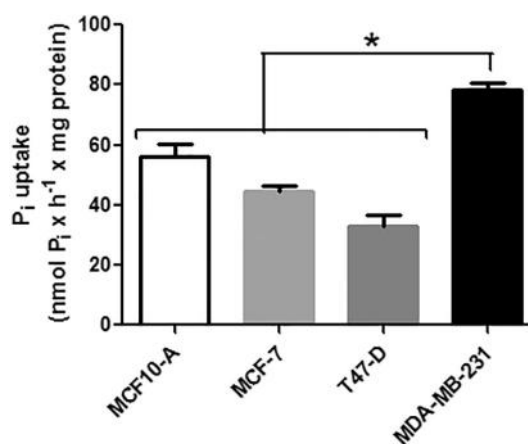


Fig. 1. Comparative rates of ³²Pi influx in breast cell lines. Intact MCF-10A, MCF-7, T47-D or MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/mL) were incubated at 37 °C in a reaction mixture containing 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 10 mM HEPES, 0.8 mM MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄ and 2.5 μ Ci/nmol ³²Pi. The results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

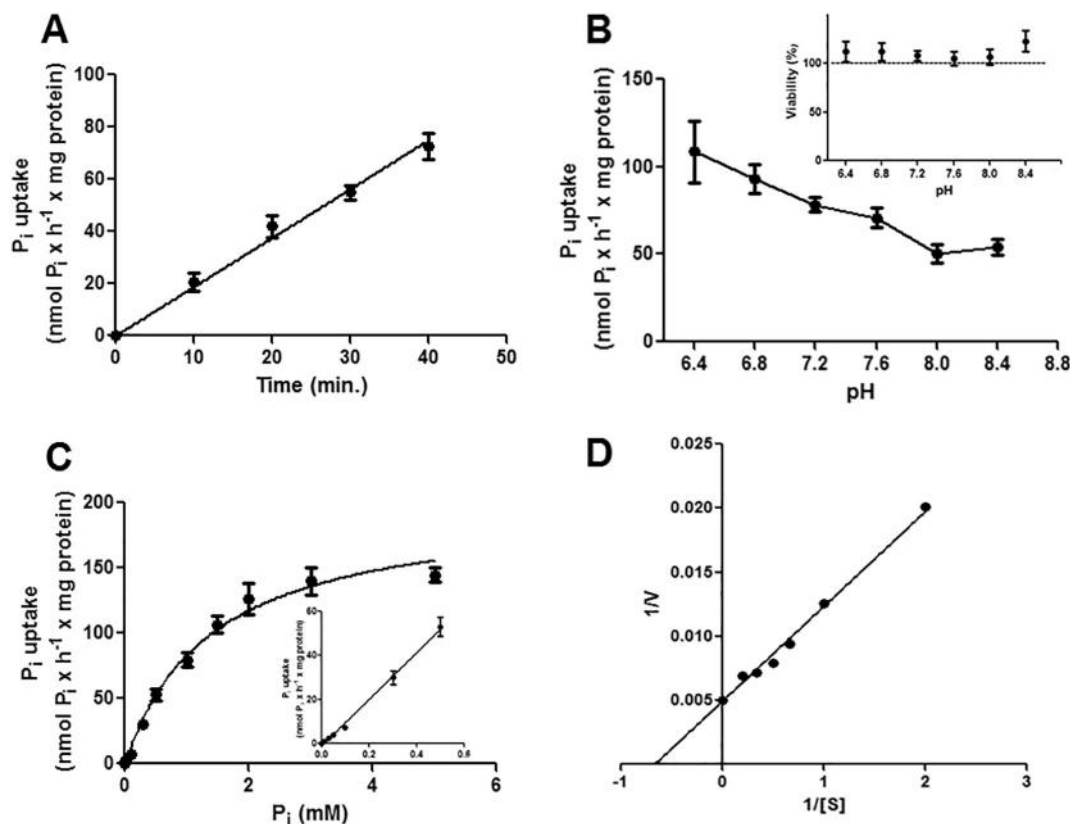


Fig. 2. Kinetic parameters of H^+ -dependent $^{32}P_i$ influx of MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/mL) were incubated at $37^\circ C$ in a reaction mixture as described in Fig. 1 at various times (A), pH ranging from 6.4 to 9.2 using 10 mM HEPES, 15 mM Tris, 15 mM MES (B), increasing concentrations of KH_2PO_4 (0–5 mM) (C), Lineweaver-Burk plot for P_i concentrations between 0.5 and 5 mM P_i (D). In these pH ranges, the cells remained viable throughout the experiment according to CellTiter 96[®]Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (C inset). The results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

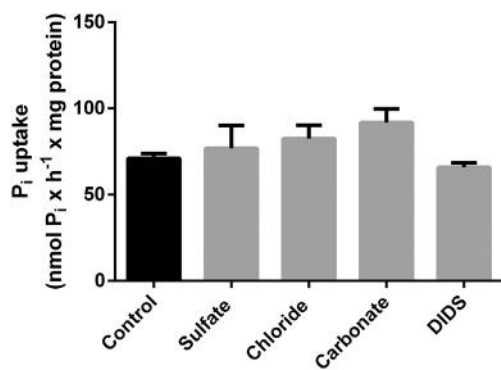


Fig. 3. Effect of anions on H^+ -dependent $^{32}P_i$ influx of MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/mL) were incubated for 40 min at $37^\circ C$ in a reaction mixture as described in Fig. 1 and anions or inhibitor indicated in the horizontal axis: magnesium sulfate (10 mM), magnesium chloride (10 mM), magnesium bicarbonate (10 mM) and DIDS (1 mM). In the presence of these inhibitors at their respective concentrations, cells remained viable throughout the experiment. Results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

3.2. H^+ -dependent P_i transport of MDA-MB-231 cells

Next we biochemically characterized the H^+ -dependent inorganic phosphate transport in MDA-MB-231. H^+ -dependent P_i transport tests were carried out at different times from 0 to 40 min. We could observe linearity of the transport as a function of time for up to 40 min (Fig. 2A). Because longer times could lead to saturation of P_i transport, we used 40 min as the standard time for P_i capture in P_i transport assays

throughout the work.

H^+ -dependent inorganic phosphate transport assays were carried out at different pH ranges (6.4 to 9.2). The result in Fig. 2B shows that the higher P_i uptake occurred at more acidic pH. In all pH ranges performed, cell viability in MDA-MB-231 was not affected (Fig. 2B inset).

Assays in the presence of different P_i concentrations were carried out in MDA-MB-231 cells. A Michaelis-Menten kinetic profile for the H^+ -dependent transport of P_i was observed in the presence of increasing concentrations of inorganic phosphate from 0 to 5 mM until saturation was reached (Fig. 2C). This yielded a value of $K_m = 1.387 \pm 0.1674$ mM P_i and $V_{max} = 198.6 \pm 10.23$ $P_i \times h^{-1} \times mg$ protein $^{-1}$. A double reciprocal plot is shown in Fig. 2D. Compared to the data presented previously for Na^+ -dependent P_i transport [26], the carrier analyzed here exhibits low affinity for inorganic phosphate.

3.3. Influence of anions to H^+ -dependent P_i transport

Inorganic phosphate is a negatively charged compound, chemically classified as an anion. Several studies have described a nonspecific anion transporter in Caco2BBE cells [13]. To investigate whether the H^+ -dependent inorganic phosphate transport would indeed be an anion carrier, magnesium sulfate (10 mM), magnesium chloride (10 mM) and magnesium bicarbonate (10 mM) were tested in H^+ -dependent P_i transport [13]. No effects of these anions were observed (Fig. 3). In addition, the classical inhibitor of anion transporters (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid – DIDS) [13] had no significant effect on the H^+ -dependent P_i transport at 1 mM concentration (Fig. 3).

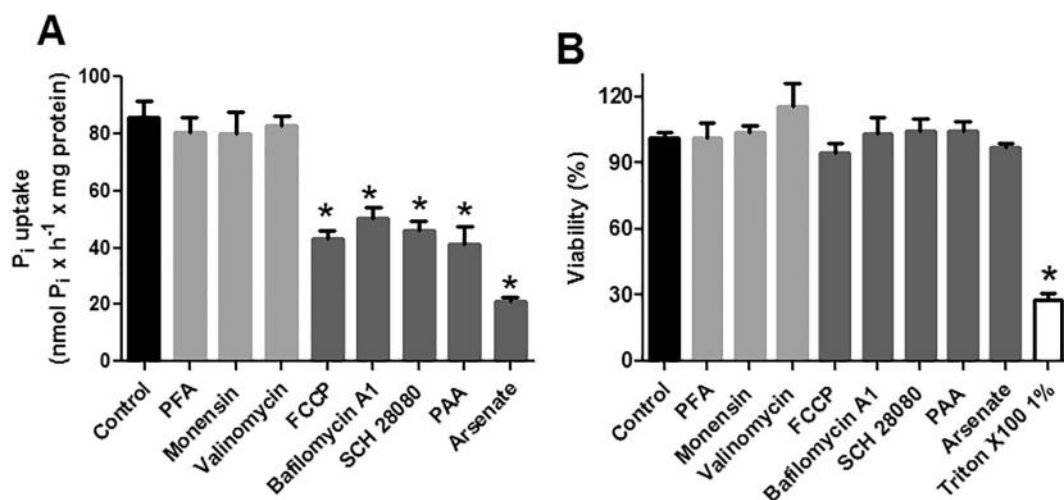


Fig. 4. Effect of ion influx on H⁺-dependent ³²Pi uptake of MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/mL) were incubated for 40 min at 37 °C in a reaction mixture as described in Fig. 1 and the inhibitors indicated in the abscissa: PFA (5 mM), monensin (100 μ M), FCCP (10 μ M), bafilomycin A1 (100 nM), SCH28080 (100 μ M), valinomycin (100 μ M), PAA (1 mM), arsenate (1 mM) (A). In the presence of these inhibitors at their respective concentrations, cells remained viable throughout the experiment according to CellTiter 96[®]Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (B). Results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

3.4. Influence of ion influx inhibitors on H⁺-dependent Pi transport

In order to verify the importance of the ion influx for the H⁺-dependent Pi transport, assays were performed in the presence of different ion transport modulators. Those were PFA (phosphonoformic acid), an inhibitor of the Na⁺-dependent Pi transporter; Monensin, a Na⁺ ionophore; Valinomycin, a K⁺ ionophore, and FCCP, an H⁺ ionophore. In addition, inhibitors of the vacuolar H⁺-ATPase, Bafilomycin A1, an inhibitor of H⁺, K⁺-ATPase, SCH28080, a Pi transport inhibitor, PAA, and arsenate, a structural analog of Pi, were also tested. Only FCCP, Bafilomycin A1 and SCH28080, which deregulate the levels of intracellular protons, as well as PAA and arsenate inhibited H⁺-dependent Pi transport (Fig. 4A). In all conditions performed, MDA-MB-231 cell viability was not affected (Fig. 4B).

3.5. Proton participation in Na⁺-independent Pi transport

To verify the hypothesis that Na⁺-independent Pi transport is an H⁺-dependent Pi transporter, optical quantification of intracellular pH was initially carried out using permeabilized MDA-MB-231 cells at pH values ranging from 5.5 to 8.5. The intracellular pH (pHi) of MDA-MB-231 cells was measured at various times in the presence or absence of inorganic phosphate (1 mM). The results in Fig. 5 show that addition of inorganic phosphate lowered pHi. No effect on pHi was observed in the absence of inorganic phosphate.

3.6. Effect of PAA on Pi transport, cell proliferation, adhesion and migration phenotype

It has been reported that phosphonoacetic acid (PAA) is a potent inhibitor of H⁺-dependent Pi transport [13]. In Fig. 6A we show the effect of increasing concentrations of PAA on H⁺-dependent Pi transport. Based on that, 1 mM of PAA was tested for several parameters relevant to tumor cell behavior. MDA-MB-231 cell proliferation was evaluated over 60 h. We found that proliferation was reduced by approximately 80% in the presence of PAA compared to controls (Fig. 6B). PAA was also tested in adhesion and migration assays. The results in Fig. 6C and D show that 1 mM PAA reduced both parameters by approximately 40%. In addition, migrating cells displayed higher Pi transport activity than non-migrating cells, as shows in Fig. 6E. In contrast, there was no difference between these two conditions when Pi

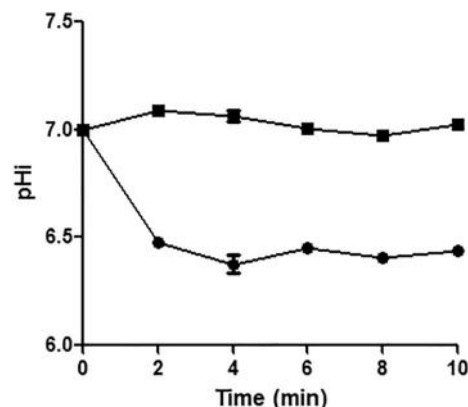


Fig. 5. Influence of inorganic phosphate on intracellular pH as a function of time in MDA-MB-231. A) Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/mL) were washed with a reaction mixture containing 116 mM choline chloride, 5.5 mM Glucose, 10 mM HEPES, 0.8 mM MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄ (closed circle) or water (closed square) were added. The intracellular pH (pHi) was quantified each 2 min interval for 10 min total time by optical quantification of the intracellular pH. Results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

transport activity was measured at 100 μ M Pi, a suitable condition for high-affinity Na⁺-Pi-transport (Fig. 6F).

We also analyzed the marker proteins associated with the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) (E-cadherin and vimentin) and migration capacity of MDA-MB-231 cells grown in the presence or absence of PAA by immunofluorescence. While control cells presented low expression of E-cadherin (Fig. 7A) and high expression of vimentin (Fig. 7F), cells grown in the presence of PAA for 24 h present induced expression of E-cadherin (Fig. 7B), suggesting an inverted pattern of markers expression. Quantification of the fluorescence intensity confirmed that PAA significantly increases E-cadherin expression (Fig. 7E). These observations strongly suggest that, when Pi transport is inhibited, MDA-MB-231 cells tend to revert from mesenchymal to epithelial features.

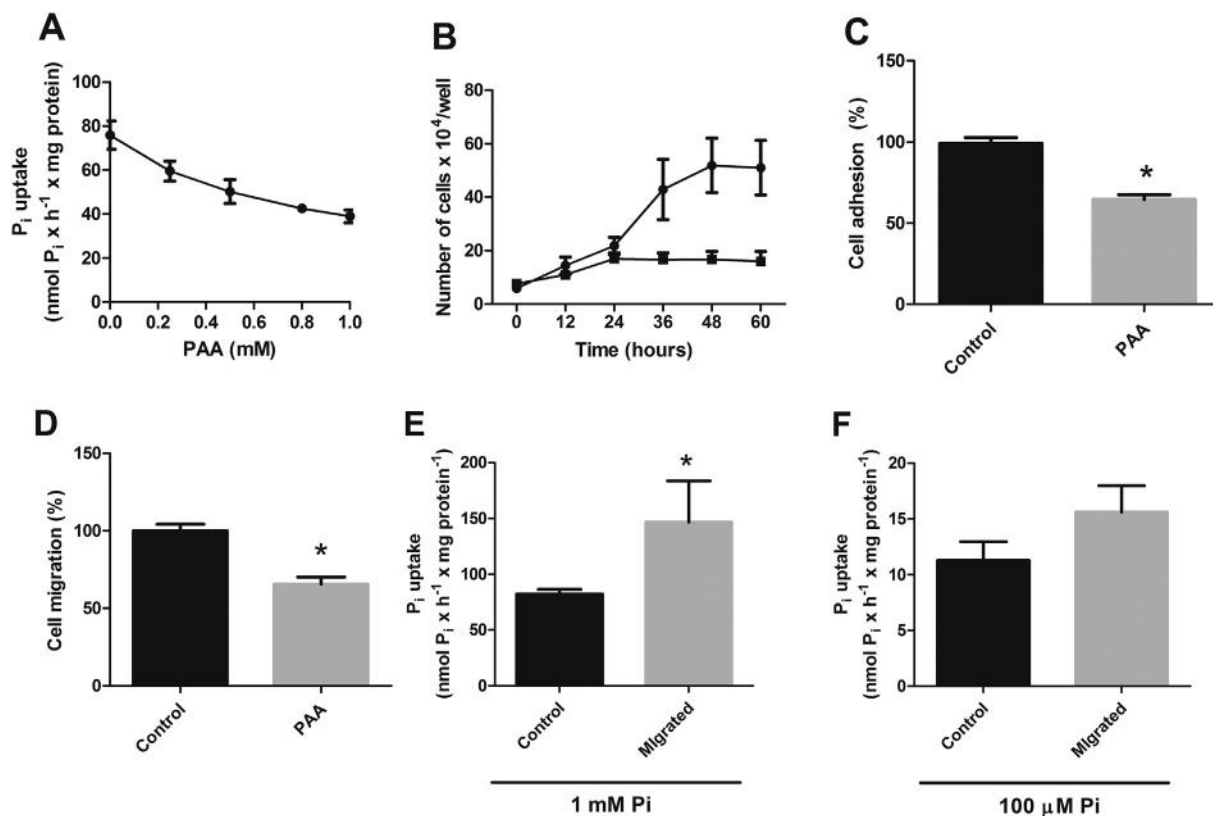


Fig. 6. Effect of PAA on ^{32}P i influx, proliferation, adhesion and cell migration phenotype in MDA-MB-231. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/mL) were incubated for 40 min at 37 °C in a reaction mixture as described in Fig. 1 in the presence of increasing concentrations of PAA, where cells remained viable throughout the experiment (A). MDA-MB-231 (1×10^4 cells/well) were maintained in 1 mM PAA were quantified at an initial interval of 6 or 12 h up to 60 h using Neubauer camera (B). Cell adhesion were done with MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells/well) pretreated for 40 min in the presence or absence of PAA (1 mM) (C). Cell migration were done with MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells/well) pretreated for 40 min in the presence or absence of PAA (1 mM) (D). Pi transport was measured, in the same condition described previously, in non-migrated (control) or migrated cells in the presence of 1 mM Pi (E) or 100 μM Pi (F). Results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions.

3.7. Effect of high phosphate concentration and PFA in growth medium on Pi transport

In mammary gland tumors of mice, a high concentration of Pi in the tumor microenvironment (~ 2 mM Pi), compared to that in the normal mammary gland (approximately 1 mM Pi) was identified [20]. MDA-MB-231 cells were maintained at different Pi concentrations (1 or 2 mM Pi) and in the presence of PFA (5 mM) in the growth medium for 24 h. As shown in Fig. 8A, NaPi-IIB expression was significantly decreased at 2 mM Pi as well as at 5 mM PFA.

Parallel experiments with MDA-MB-231 cells in the same conditions were carried out. Cells were washed in a Pi free solution and 100 μM Pi was added thereafter to analyze the Pi transport. Na⁺-dependent Pi transport was abolished at 5 mM PFA and significantly decreased in the presence of 2 mM Pi (Fig. 8B). However, the H⁺-dependent Pi transport at 2 mM or 5 mM Pi was 5 fold higher than the Na⁺-dependent Pi transport (Fig. 8B).

4. Discussion

Recently, our group characterized the high-affinity Na⁺-dependent Pi transporter in MDA-MB-231 cells [26]. Throughout that work, low Pi concentrations (100 μM Pi) were used for the Pi transport assays. In the present work, 1 mM Pi was used in Pi transport assays in order to characterize an H⁺-dependent Pi transporter that responds to high Pi concentrations. Based on the results shown in Fig. 1, we suggest that the enhanced H⁺-dependent Pi transport may contribute to greater migratory capacity [23]. In this situation the excess Pi transport would be

in keeping with a greater demand for Pi in connection with tumor cell energy metabolism. We propose then that there is another kinetic component responsive to high Pi concentrations in breast cancer cells, which was analyzed in detail in the present work.

Our results showed that the influence of sodium and potassium could be discarded based on experiments in which valinomycin, monensin and PFA were used (Fig. 4A). Furthermore, H⁺-dependent Pi transport was linear for up to 40 min (Fig. 2A) and exhibited a Michaelis-Menten kinetics displaying low affinity for inorganic phosphate (Fig. 2C and D). This result is compatible with that of osteoclast-like cells, in which the transport system has a K_m to Pi of 7.5 mM (low affinity component) and 0.35 mM (high affinity component) [12]. Presumably this low affinity Pi transport becomes operative when the levels of Pi in tumor microenvironment rise to 2 mM thus contributing to scavenge the excess Pi when the Na⁺-dependent transporter is saturated, with $K_m = 0.08$ mM Pi and $V_{max} = 71.67 \pm 3$ nmol \times h⁻¹ \times (mg protein)⁻¹ [26].

Candea and coworkers (2014) characterized an H⁺-dependent Pi transport in human intestinal cells (Caco2BBE) [13] and observed that the Pi transport was influenced by anions, suggesting that Pi could be taken up along with others anions. In our study, no effect was observed when anions and anion-carrier inhibitor (DIDS) were tested on H⁺-dependent Pi transport of MDA-MB-231 (Fig. 3). These results suggested that Pi uptake by breast cancer cells did not involve an anion carrier.

Extracellular pH can be acidified by the secretion of lactate and H⁺ catalyzed by monocarboxylate transporter 4 (MCT) in cancer cells. This may be relevant to our observations in the sense that a greater Pi

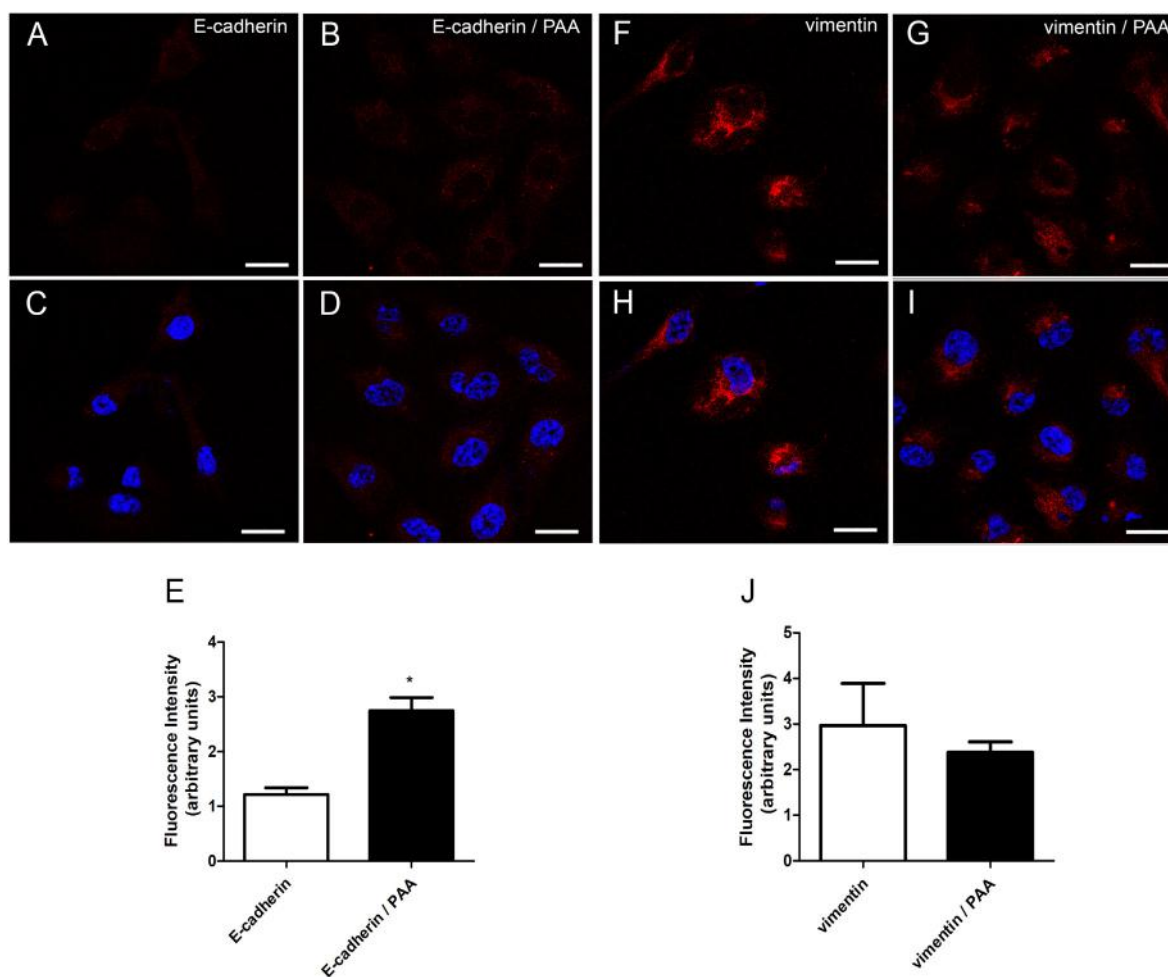


Fig. 7. Effect of PAA on E-cadherin and vimentin expression. MDA-MB-231 cells were plated onto microscope slides (5×10^4 cells/well) and then maintained in the presence or absence of 1 mM PAA for 24 h. Cells were fixed, permeabilized and the expression of E-cadherin (A–D) and vimentin (F–I) was detected by immunofluorescence. Nuclei were revealed with DAPI (blue). Bars = 20 μ m. Fluorescence intensity of red-stained MDA-MB-231 cells were quantified for E-Cadherin (E) and vimentin (J). * $p < 0.0001$ vs. untreated cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

transport did occur in the acidic pH range, suggesting that the putative transporter is either H^+ -dependent, or that it has greater affinity for Pi in its protonated form (H_3PO_4). Similar results were found by Ito and coworkers (2005) who studied an H^+ -dependent Pi transporter involved in the uptake up Pi during bone reabsorption in osteoclast-like cells [12]. In order to demonstrate the occurrence of a proton-dependent Pi transporter, the intracellular pH was quantified in the presence of phosphate. The results in Fig. 5 showed that indeed there was a

reduction in the intracellular pH after adding inorganic phosphate. These results indicated that, upon addition of phosphate, protons present in the extracellular environment might be transported together with inorganic phosphate by an H^+ -dependent Pi co-transporter, thus contributing to the acidification of the intracellular environment.

Bafilomycin A_1 , an inhibitor of a vacuolar H^+ -ATPase that may be located on the plasma membrane (responsible for the H^+ -pumping to the extracellular environment), or the vacuole membrane (H^+ pumping

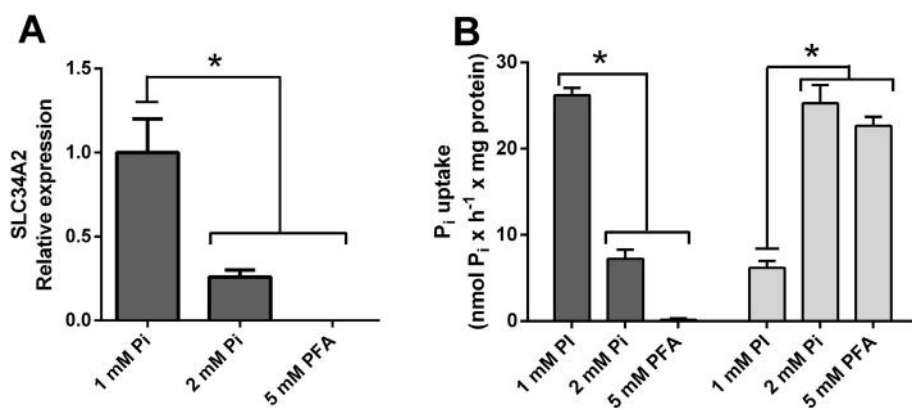


Fig. 8. Effect of high phosphate concentration and PFA in growth medium on SLC34A2 expression or Pi transport in MDA-MB-231. A) SLC34A2 expression analysis was done after pre-treatment for 24 h with 1 mM Pi (control), 2 mM Pi and 5 mM PFA. Gene expression data were normalized to an endogenous reference β -actin (ACTB). B) Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/well) were incubated for at 37 $^{\circ}C$ in a reaction mixture for H^+ -dependent Pi transport (light gray) containing 116 mM choline or 116 mM NaCl for Na⁺-dependent Pi transport (dark gray), 5.5 mM Glucose, 5.4 KCl, 10 mM HEPES, 0.8 mM $MgCl_2$, 1 mM KH_2PO_4 and 2.5 μ Ci/nmol $^{32}P_i$. Results are the means \pm SE of at least 3 experiments, with different cell suspensions. Statistical significance was analyzed applying unpaired t -test.

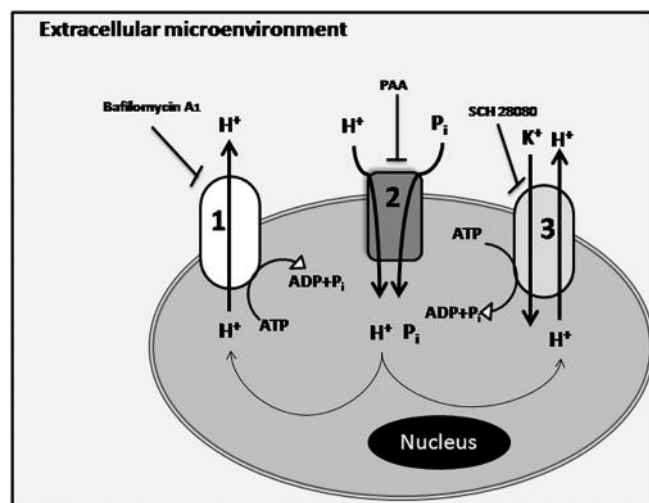


Fig. 9. Proposed mechanism for H^+ -dependent Pi transporter mechanism in MDA-MB-231 cells: H^+ , K^+ -ATPase-Bafilomycin A1 sensitive in the plasma membrane and H^+ -ATPase SCH-28080-sensitive in the plasma membrane coupled to Pi H^+ -dependent transporter.

to the vacuolar lumen), was able to inhibit H^+ -dependent Pi transport (Fig. 4A). In addition, H^+ -dependent Pi transport was inhibited by FCCP (H^+ ionophore) and SCH28080 (H^+ , K^+ -ATPase inhibitor) (Fig. 4A). Collectively these results indicate a role for the a vacuolar H^+ -ATPase and an H^+ , K^+ -ATPase in the regulation of Pi , H^+ transport mechanism (Fig. 9).

We have previously shown that PFA inhibits Na^+ -dependent Pi transport [26]. In the H^+ -dependent Pi transport, we observed no effect of PFA. However, when looking for another inhibitor of Pi transport belonging to the same class of PFA (phosphoenolcarboxylic acids), we showed that PAA was able to inhibit the H^+ -dependent Pi transport (Fig. 6A). A possible mechanistic explanation for this result is that PFA bound to phosphorus and its three sodium ions. This would increase its affinity to the sodium-dependent Pi carrier bound to the three sodium ions Pi [5]. Conversely, PAA is a compound which has phosphorus attached to oxygen and a hydroxyl at its ends; in the absence of sodium and, being structurally similar to inorganic phosphate, this molecule might be able to competitively inhibit H^+ -dependent Pi transport.

Pi plays a critical role in several cell types, participating in the energy metabolism and in nucleic acid synthesis [15]. In tumor cells, phosphate is required for their rapid growth rates, in keeping with the Growth Rate Hypothesis (GRH) [15–17]. It has been shown that 3 and 5 mM Pi were able to stimulate the migration of MDA-MB-231 cells compared to normal cells grown 1 mM Pi [15,24]. Although PAA has been reported to affect DNA synthesis and cause arrest of cellular cycle, besides having antiviral activity, it is also described as a specific inhibitor of Pi transporters [12,13,32,33]. Hence we thus tested PAA on MDA-MB-231 cells, which has a higher migratory capacity than other lineages [23]. PAA was able to promote a significant reduction in cell proliferation (after 24 h), migration and adhesion (Fig. 6) in these cells without affecting their viability, thus indicating that H^+ -dependent Pi transporter may be a hallmark of cancer cells. In addition, as evidenced with immunofluorescence results, MDA-MB-231 cells tend to revert from mesenchymal to epithelial features when the H^+ -dependent Pi transport is inhibited in the presence of PAA (Fig. 7), consistently strengthening the observed reduction of migration capacity (Fig. 6).

Extracellular Pi in humans is maintained in a relatively narrow range, between 0.7 and 1.55 mM [3]. However, in the tumor microenvironment of mammary gland mice was identified a high concentration of Pi (approximately 2 mM) [20]. We have observed a decreased $NaPi$ -IIB expression and Na^+ -dependent Pi transport in the presence of 2 mM Pi or 5 mM PFA concomitant with an increase in H^+ -

dependent Pi transport (Fig. 8). This result suggested the occurrence of a compensatory mechanism for Pi transport in situations where the transport of Pi Na^+ -dependent was compromised.

Amidst the paucity of studies that seek to characterize H^+ -dependent Pi transport and its detailed participation in cellular mechanisms, this report described identified for the first time an H^+ -dependent Pi transporter and how it could participate in several vital processes of breast tumor progression. Further studies should be directed at the structural characterization of the H^+ -dependent Pi carrier. However, an added complication is the lack of information regarding the gene encoding the transporter since this has not yet been annotated. When eventually this becomes available it may be possible to confirm our hypothesis by carrying out work with the recombinant molecule which would permit the systematic and precise analysis of the parameters discussed here. Likewise, knowledge derived from the gene sequence may also enable specific interference studies of the H^+ -dependent Pi transport using for example, CRISPR or the short hairpin technology.

The functional and molecular nature of the H^+ -dependent Pi transporter could represent a biological advantage for tumors in the sense of endowing cells with the incorporation of extra Pi even in those conditions when the sodium-dependent Pi transport is saturated by a high extracellular Pi (approx. 2 mM). The excess Pi might be able to compensate for the energetically expensive biochemical features of tumor cells. We suggest that the dissociated tumor cells (metastatic) are able to adjust their biochemical profile as a function of changes in the microenvironment as indicated by the results shown in Fig. 6E and F. In addition, the occurrence of an H^+ -dependent Pi transporter in tumor cells might represent a positive selective adaptation to the low pH in their vicinity due to lactate secretion, i.e., the transporter would favor Pi uptake even in conditions of high acidity.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Fabiano Ferreira Esteves, Mr. Edimilson Pereira and Ms. Rosangela Rosa de Araújo for their technical assistance. This work was supported by research grants Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), The State of Rio de Janeiro Research Foundation (FAPERJ), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) supported this investigation.

We thank CENABIO (Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem) for confocal facility.

References

- [1] L. Sapio, S. Naviglio, Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: a Janus Bifrons? *World J Clin Oncol* 6 (2015) 198–201.
- [2] J. Biber, N. Hernando, I. Forster, Phosphate transporters and their function, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 535–550, <https://doi.org/10.5306/wjco.v6.i6.198>.
- [3] C.E. Camalier, M. Young, G. Bober, C.M. Perella, N.H. Collburn, G.R. Beck, Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis, *Cancer Prev. Res.* 3 (2013) 359–370, <https://doi.org/10.1158/1940-6207>.
- [4] Y.D. Bhatia, E. Babu, S. Ramachandran, S. Yang, M. Thangaraju, V. Ganapathy, SLC transporters as a novel class of tumor suppressors: identity, function and molecular mechanisms, *Biochem. J.* 473 (2016) 1113–1124, <https://doi.org/10.1042/BJ20150751>.
- [5] I.C. Forster, N. Hernando, J. Biber, H. Murer, Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families, *Mol. Asp. Med.* 34 (2013) 386–395, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.007>.
- [6] D.G. Miller, R.H. Edwards, A.D. Miller, Cloning of the cellular receptor for

- amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 78–82, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.78>.
- [7] B. O'hara, S.V. Johann, H.P. Klinger, D.G. Blair, H. Rubinson, K.J. Dunn, P. Sass, S.M. Vitek, T. Robins, Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus, *Cell Growth Differ.* 3 (1990) 119–127.
- [8] M.P. Kavanaugh, D. Kabat, Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family, *Kidney Int.* 49 (1996) 959–963.
- [9] C.A. Wagner, N. Hernando, I.C. Forster, J. Biber, The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters, *Pflugers Arch.* 466 (2013) 139–153, <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1418-6>.
- [10] S.P. Shirazi-Beechey, J.I. Penny, J. Dyer, I.S. Wood, P.S. Tarpey, D. Scott, W. Buchan, Epithelial phosphate transport in ruminants, mechanisms and regulation, *Kidney Int.* 49 (1996) 992–996.
- [11] K. Huber, C. Walter, B. Schroder, G. Breves, Phosphate transport in the duodenum and jejunum of goats and its adaptation by dietary phosphate and calcium, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283 (2002) R296–R302, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00760.2001>.
- [12] M. Ito, N. Matsuka, M. Izuka, S. Haito, Y. Sakai, R. Nakamura, R. Segawa, M. Kuwahata, H. Yamamoto, W.J. Pike, K. Miyamoto, Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast-like cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288 (2004) 921–931, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00412.2004>.
- [13] E. Candéal, Y.A. Caldas, N. Guillén, M. Levi, V. Sorribas, Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307 (2014) 1113–1122, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00251.2014>.
- [14] J. Marks, G.J. Lee, S.P. Nadaraja, E.S. Debnam, R.J. Unwin, Experimental and regional variations in Na⁺ dependent and Na⁺-independent phosphate transport along the rat small intestine and colon, *Physiol. Rep.* 3 (2015) 2051–2817, <https://doi.org/10.14814/phy2.12281>.
- [15] M.A. Lacerda-Abreu, T. Russo-Abrahão, R.Q. Monteiro, F.D. Rumjanek, J.R. Meyer-Fernandes, Inorganic phosphate transporters in cancer: functions, molecular mechanisms and possible clinical applications, *Biochim. Biophys. Acta* 2 (2018) 291–298, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.05.001>.
- [16] J.J. Elser, M.M. Kyle, M.S. Smith, J.D. Nagy, Biological stoichiometry in human cancer, *PLoS One* 2 (2007) e1028, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001028.t001>.
- [17] I. Kareva, Biological stoichiometry in tumor micro-environments, *PLoS One* 8 (2013) e51844, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051844.g001>.
- [18] M. Stubbs, Z.M. Bhujwalla, S.G.M. Tozer, L.M. Rodrigues, R.J. Maxwell, R. Morgan, F.A. Howe, J.R. Griffiths, An assessment of ³¹P MRS as a method of measuring pH in rat tumours, *NMR Biomed.* 5 (1992) 351–359, <https://doi.org/10.1002/nbm.1940050606>.
- [19] A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, S. Rodríguez-Enríquez, R. Encalada, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Modeling cancer glycolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 755–767, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.006>.
- [20] A.A. Bobko, T.D. Eubank, B. Driesschaert, I. Dhimitruka, J. Evans, R. Mohammad, E.E. Tchekneva, M.M. Dikov, V.V. Khrantsov, Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41233, <https://doi.org/10.1038/srep41233>.
- [21] D.L. Holliday, V. Speirs, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res.* 13 (2011), <https://doi.org/10.1186/bcr2889>.
- [22] C.R. Ross, K.W. Temburnikar, G.M. Wilson, K.L. Seley-Radtke, Mitotic arrest of breast cancer MDA-MB-231 cells by a halogenated thieno[3,2-d]pyrimidine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 1715–1717, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.02.071>.
- [23] B.N. Smith, L.J. Burton, V. Henderson, D.D. Randle, D.J. Morton, B.A. Smith, L. Taliaferro-Smith, P. Nagappan, C. Yates, M. Zayzafoon, L.W.K. Chung, V.A. Odero-Marah, Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2, *PLoS One* (8) (2014) e104987, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104987>.
- [24] Y. Lin, K.E. Mckinnon, S.W. Ha Jr., G.R. Beck, Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXO2) regulated osteopontin expression, *Mol. Carcinog.* 54 (2014) 926–934, <https://doi.org/10.1002/mc.22153>.
- [25] D.R. Chen, S.Y. Chien, S.J. Kuo, Y.H. Teng, H.T. Tsai, J.H. Kuo, J.G. Chung, SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer, *Anticancer Res.* 30 (2010) 4135–4140.
- [26] T. Russo-Abrahão, M.A. Lacerda-Abreu, T. Gomes, D. Cosentino-Gomes, A.D. Carvalho-De-Araújo, M.F. Rodrigues, A.C.L. Oliveira, F.D. Rumjanek, R.Q. Monteiro, J.R. Meyer-Fernandes, Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231, *PLoS One* 13 (2018) e0191270, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270>.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [28] T. Russo-Abrahão, M. Alves-Bezerra, D. Majerowicz, A.L. Freitas-Mesquita, C.F. Dick, K.C. Gondim, J.R. Meyer-Fernandes, Transport of inorganic phosphate in *Leishmania infantum* and compensatory regulation at low inorganic phosphate concentration, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 2683–2689, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.017>.
- [29] L.L. Liu, H. Zhao, T.F. Ma, F. Ge, C.S. Chen, Y.P. Zhang, Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection, *PLoS One* 10 (2015) e0117058, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117058>.
- [30] L. Wang, X. Zhou, T. Zhou, D. Ma, S. Chen, X. Zhi, L. Yin, Z. Shao, Z. Ou, P. Zhou, Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134 (2008) 365–372, <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0292-z>.
- [31] J.A. Thomas, R.N. Buchsbaum, A. Zimniak, E. Racker, Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ, *Biochemistry* 18 (1979) 2210–2218.
- [32] O. Nyormoi, D.A. Thorley-Lawson, J. Elkington, J.L. Strominger, Differential effect of phosphonoacetic acid on the expression of Epstein-Barr viral antigens and virus production, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 (5) (1976) 1745–1748.
- [33] M. Loghman-Adham, Use of phosphonocarboxylic acids as inhibitors of sodium-phosphate cotransport, *Gen. Pharmacol.* 27 (2) (1996) 305–312, [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02017-9](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02017-9).

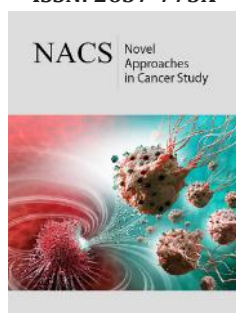
Release of Inorganic Phosphate into the Tumor Environment: Possible Roles of Ecto-Nucleotidases and Ecto-Phosphatases

Marco Antonio Lacerda-Abreu^{1,2*} and José Roberto Meyer-Fernandes^{1,2*}

¹Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Brazil


²National Institute of Science and Technology in Structural Biology and Bioimaging, Brazil

ISSN: 2637-773X



***Corresponding author:** Marco Antonio Lacerda-Abreu and José Roberto Meyer-Fernandes, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

Submission:  October 21, 2019

Published:  October 29, 2019

Volume 3 - Issue 4

How to cite this article: Marco Antonio Lacerda-Abreu, José Roberto Meyer-Fernandes. Release of Inorganic Phosphate into the Tumor Environment: Possible Roles of Ecto-Nucleotidases and Ecto-Phosphatases. *Nov Appro in Can Study*. 3(4). NACS.000568.2019. DOI: [10.31031/NACS.2019.03.000568](https://doi.org/10.31031/NACS.2019.03.000568)

Copyright@ : Marco Antonio Lacerda-Abreu and José Roberto Meyer-Fernandes, This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract

Inorganic phosphate (Pi) is essential for several biochemical reaction. Serum Pi is maintained at relatively narrow range concentrations, between 0.7 and 1.55mM. Tumor microenvironment presents a high Pi concentration (1.8±0.2mM Pi) and this could be associated with the rapid growth in the "Growth Rate Hypothesis". Several studies have identified high expression of Pi transporters in various tumor tissues. Similarly, ecto-enzymes (like ecto-nucleotidases or ecto-phosphatases) act by dephosphorylating phospho-substrates in the extracellular environment, and its high expression has been observed in various types of cancer. Little is known about the function of these ecto-enzymes on Pi releasing and accumulation in the tumor environment. Therefore, the purpose of this study is to correlate a possible contribution of the Pi release in the tumor microenvironment by ecto-nucleotidases and ecto-phosphatases, concomitant to the regulation of Pi extracellular pool by specific Pi transporters, associating it to the tumorigenesis.

Keywords: Ecto-nucleotidases; Ecto-phosphatases; Pi transporters; Pi release; Cancer

Introduction

Inorganic phosphate is an essential nutrient for the maintenance of cell life, by comprise phospholipids and nucleotides that compose DNA and RNA. Pi plays central role on signaling pathways by protein phosphorylation and dephosphorylation and it participates on energy metabolism in the form of ATP or metabolic intermediates substrates [1,2]. In healthy humans, steady state serum Pi concentrations generally range from 0.70 to 1.55mM [3]. The Pi is absorbed by intestinal cells by Na⁺ dependent Pi transporter (SLC34A2) [4]. About 60-70% of the total Pi in food intake is present as organic phosphate compound, thus, ecto-nucleotidase and ecto-phosphatase enzymes are required to provide it from hydrolysis of phosphorylated compounds such as glucose 1-phosphate, ATP, ADP and 5'AMP [5].

Extracellular nucleosides and nucleotides derived from purine (as adenosine, ADP and ATP) or pyrimidine (as UDP and UTP) moiety, not only act as energy source for living organism, but also performs signaling role, once nucleotide release to extracellular environment, through panexin and connexin junctions, controls various pathological and physiological conditions [6,7]. These signaling molecules modulate a variety of physiological functions such as blood clotting, inflammation and immune reactions and cell proliferation [8]. Those functions are controlled by specific activation of purinergic receptors; those are activated by extracellular nucleotides, like purinergic receptor subtypes: P2 (ATP) and P1 (Adenosine) [6-7]. Activation of purinergic receptors can be controlled by extracellular nucleotide hydrolysis; whereas ecto-nucleotidases are responsible for ATP hydrolysis generating ADP, AMP, adenosine and Pi [6-8]. Another class of enzymes that can hydrolyze phosphorylated compounds are acid ecto phosphatases, like the transmembrane acid prostate phosphatase (TM-PAcP), recently discovered as variant of a secreted phosphatase used in the diagnosis of prostate cancer [9,10].

However, it is currently scarce studies on the role of ecto-nucleotidase and ecto-phosphatases to release Pi towards the extracellular environment. In mouse skin and lung cancer models, a high tumorigenic rate was observed in diets supplemented with Pi, sustaining the Growth Rate Hypothesis (GRH), requiring relatively more phosphate due to their rapid growth rates [2,3,11,12]. In mouse breast tumor cells, a high Pi concentration was identified in

the tumor microenvironment ($1.8 \pm 0.2 \text{ mM Pi}$) compared to normal mammary gland ($0.84 \pm 0.07 \text{ mM Pi}$), suggesting it as a marker for body cancer [12]. Elevated extracellular Pi (3 and 5 mM Pi) also stimulates metastatic capacity in lung (A549) and breast (MDA-MB-231) cancer cells, once it increases FOXC2, OPN and Vegfa mRNA levels, triggering a high migration capacity [13]. Recently, a high affinity Na^+ dependent Pi transporter was characterized in breast cancer cells (MDA-MB-231), and it is related to adhesion and migration capacity [14]. Also, in MDA-MB-231 cells, a low affinity H^+ -dependent Pi transporter is related to cell migration process, especially in high Pi concentrations [15]. Several tumor tissues present high levels of ecto-nucleotidase, ecto-phosphatase and Pi transporters expression [2,16-18]. However, no study has sought to integrate these enzymes by focusing on Pi release towards the tumor environment and its possible functions for tumor progression so far.

Ecto-Nucleotidases

Ecto-nucleotidases are a set of enzymes that hydrolyze extracellular phosphorylated nucleotides derived from purine or pyrimidine. The four main classes of ecto-nucleotidase are:

- Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase): generating ADP and AMP from ATP hydrolysis [19-21];
- Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs): hydrolysis of ATP to AMP;
- Ecto-5-nucleotidase (e5NT): generating adenosine from 5'AMP hydrolysis [8]. The E-NTPDase family comprises eight enzymes, which differ in cell location and substrate specificity, whereas four presents extracellular catalytic site: NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3) and NTPDase8(CD39L4) [6-7]. High ATP hydrolysis or NTPDases overexpression has been observed in several cancers such as: melanomas [18], Walker 256[22], bladder cancer [23] and breast cancer [24].

Regarding the family of E-NPPs, has been reported seven class of enzymes (E-NPP1 - E-NPP7), however, four are able to hydrolyze a variety of nucleotides: E-NPP1 (PC-1), NPP2 (autotaxin), NPP3 (CD203c) and NPP4 [8,17]. Regarding the expression of these enzymes in tumor tissues, NPP1 is widely identified in neural brain tumors [25], rat C6 glioma cell membranes [26], human astrocytic brain tumors [27], and human glioblastoma stem cells [17,28]. NPP2 has been closely associated with the migration phenotype in melanomas [29] and various tumors such as hepatocellular carcinoma [30], neuroblastoma [31], prostate carcinoma [32] and non-small cell lung cancer [33,34]. Moreover, NPP3 has been related to tumor development and transformation, showing that its expression in fibroblast and glioma cells induced enhanced invasive properties [34,35].

Ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT; CD73) is a transmembrane enzyme found in vertebrates, plants and even bacteria. Ecto-5'-nucleotidase hydrolyzes AMP into adenosine, which is a major source of adenosine for adenosine (P1) receptors [7]. Ecto-5'-NT

is anchored to the plasma membrane by a GPI anchor. Ecto-5'-NT catalyses the hydrolysis of 5' carbon esterified phosphate from ribose or deoxyribose [6]. CD73 overexpression is well established in the literature for various cancers including walker 256 tumor bladder Buffon [20], [23], leukemia [36], glioma [37], glioblastoma [38], melanoma[39], ovarian cancer [40], thyroid cancer [41], esophageal cancer [42], gastric cancer [43], colon cancer [44], prostate cancer [45], breast cancer [18,22,24,46], pancreatic cancer [47], hepatocarcinoma [48] and salivary gland tumors [49].

Another type of enzymes able to hydrolyze nucleotides are the Alkaline phosphatases. Alkaline phosphatases (ALP) are ubiquitous metalloenzymes and represent a protein family of phosphomonoesterases. These enzymes can be divided into two groups, tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNALP) and tissue specific ALPs including placental ALP (PALP), intestinal ALP (IALP) and ALP germ cells (GCALP) [8]. All these isoforms present high levels of expression in cancer cells: TNALP was identified in osteoblastic bone metastases [50]; PALP was identified in ovarian, testicular, lung, breast, gastrointestinal tract and choriocarcinoma cancer [51-53]; IALP was identified in hepatocellular carcinoma [54] and GCALP was identified in carcinoma testis [55-57].

Acid Ecto Phosphatases

Acid phosphatases are enzymes that hydrolyze phosphorylated substrates in acidic environments; five class of enzymes have been reported in human tissues [58]. In human prostate, a prostatic acid phosphatase (PACp) is reported intracellularly. However, in patients with advanced prostate cancer, an elevation of serum acid phosphatase (sPACp) was identified, accompanied by a decrease in expression of (PACp). Both forms of PACp are transcribed from the same gene but follow different post-transcriptional modifications [9]. Recently, a new spliced variant PACp mRNA encoding a transmembrane type I protein with extracellular phosphatase activity (TM-PACp) was identified in various tissues such as brain, kidney, liver, lung, muscle, placenta, salivary gland, spleen, thyroid, thymus. TM-PACp expression was also observed in human prostate cancer tissue samples [10].

Pi Transporters

Pi enters the cells via Pi cotransporters. These cotransporters constitute two large families of inorganic phosphate transporters that have been characterized in mammals, namely, SLC20 :expressed almost exclusively in the kidney and SLC34 (consists of three members, NaPi-IIa (SLC34A1): expressed in kidney, osteoclasts, neurons; NaPi-IIb (SLC34A2): expressed in small intestine, lung, testis, liver, secreting mammary gland; and NaPi-IIc (SLC34A3), expressed in kidney [2,4]. Specifically, in relation to cancer, several studies have identified increased expression of Pi transporters in tumor tissues compared to normal tissues such as ovarian [59], thyroid [60], breast [61], lung [62] and kidney [2,63]. Regarding Pi another class of transporter has been recently studied, an H^+ -dependent Pi transporter in Caco2BBE human intestinal cells [64], osteoclasts-like cells [65] and recently in MDA-MB-231, breast cancer cells [15].

Co-Relation of Ecto-Nucleotidases, Ecto-Phosphatases and Pi Transport

Decades ago, many studies sought to relate the importance of ecto-nucleotidases and ecto-phosphatases for the absorption of their generated products. Knowing that there was a high expression of non-specific alkaline phosphatase in rat small intestine epithelial cells, Rothstein et al. [5] identify the importance of ALPs for 1-phosphate glucose hydrolysis generating glucose to be transported into the cells. Regarding the absorption of Pi, in microorganisms like *Escherichia coli*, extracellular low Pi concentration induces an increased expression of ecto-phosphatases, strongly suggesting a function for these enzymes in Pi pool availability [66]. Years later, it has been demonstrated an increase in intracellular Pi in cell intestines of chickens and rats when is added a phosphorylated compound (β -glycerophosphate), suggesting a relation between alkaline phosphatase activity and Pi absorption [67,68]. However, once inhibiting alkaline phosphatase, no regulation of intracellular Pi levels was observed; but the presence of other ecto-phosphatase activities cannot be excluded Valinietse et al. [68]; Shirazi, 1981 and Moog F [67]. In the last twenty years, studies relating ecto-nucleotidases and/or ecto-phosphatases and Pi transporters have become scarce. After the elucidation of the homeostatic system of Pi in humans, new studies focused to solve the structure of the carrier and relationship to pathophysiology [4].

Increasing expression of ecto-nucleotidases and ecto-phosphatases in tumor tissues have mostly been associated with the release of extracellular adenosine, as an adenosine receptor agonist (P1 receptor) triggering signaling involved with proliferation and metastasis processes [18]. Little is discussed about the contribution of Pi released from hydrolysis to these tumor tissues. Bobko et al. [12] showed that the concentration of interstitial Pi in the tumor to approximately 2mM may be a direct consequence of the high hydrolysis of ATP by tumor cells. We recently suggested that the high level of Pi in the tumor environment would be inducing a downregulation expression of a high affinity Pi Na⁺ dependent transporter and consequently increasing the activity level of a low affinity Pi H⁺ dependent transporter, acting as a compensatory mechanism to obtain more inorganic phosphate [15]. Further studies need to be done to relate the importance of ecto-nucleotidases and ecto-phosphatases for Pi release in the tumor environment and the possible regulation of these enzymes according to extracellular Pi concentration.

Conclusion

In general, high levels of expression of ecto-enzymes were observed in tumor tissues. In this review, we suggest a possible contribution of these overexpressed enzymes to a high amount of Pi been released in the tumor environment. Due to the Growth Rate Hypothesis (GRH), tumor cells require more Pi to fuel high energy rate tumor processes such as proliferation and metastasis. At high Pi levels, tumor cells would increase the activity of the low affinity H⁺ dependent Pi transporter and may represent a biological advantage for tumors in providing the cells with the incorporation

of extra Pi even under those conditions where Na⁺ dependent Pi transport is saturated by a high extracellular Pi (approx. 2mM). The importance of accumulating and transporting more Pi would be to promote cell transformation and tumorigenesis via specific molecular mechanisms and increase ATP production through oxidative phosphorylation.

Funding

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq -305077/2013-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES -23038.002352/2017-24) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ -E-26/201.300/2014).

Conflict of Interest

None declared.

References

- Brown RB, Razzaque MS (2018) Phosphate toxicity and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1869(2): 303- 309.
- Lacerda-Abreu, Russo-Abraão T, Monteiro RQ, Rumjanek FD, Meyer-Fernandes JR (2018) Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1870(2): 291-298.
- Camalier, Camalier CE, Young MR, Bobe G, Perella CM, et al. (2010) Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 3(3): 359-370.
- IC, Hernando N, Biber J, Murer H (2013) Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med* 34(2-3): 386-395.
- Rothstein A, Meier RC, Scharf TG (1953) Relationship of cell surface to metabolism. IX. Digestion of phosphorylated compounds by enzymes located on surface of intestinal cell. *Am J Physiol* 173(1): 41-46.
- Baqi Y (2015) Ecto-nucleotidase inhibitors: Recent developments in drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 15(1): 21-33.
- Iqbal J (2019) Ectonucleotidases: Potential target in drug discovery and development. *Mini Rev Med Chem* 19(11): 866- 869.
- Rashida M, Iqbal J (2014) Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto- nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Med Res Rev* 34(4): 703-743.
- Muniyan S, Chaturvedi NK, Dwyer JG, Lagrange CA, Chaney WG, et al. (2013) Human prostatic acid phosphatase: Structure, function and regulation. *Int J Mol Sci* 14(5): 10438-10464.
- Quintero IB, Araujo CL, Pulkka AE, Wirkkala RS, Herrala AM, et al. (2017) Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Res* 67(14): 6549-6554.
- Jin H, Xu CX, Lim HT, Park SJ, Shin JY, et al. (2009) High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters Akt signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 179(1): 59-68.
- Bobko AA, Eubank TD, Driesschaert B, Dhimitruka I, Evans J, et al. (2017) Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression. *Sci Rep* 7: 41233.
- Lin Y, McKinnon KE, Ha SW, Beck GR (2015) Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXO2) regulated osteopontin expression. *Mol Carcinog* 54(9): 926-934.

14. Russo-Abrahão T, Lacerda-Abreu MA, Gomes T, Cosentino-Gomes D, Carvalho-de-Araújo AD, et al. (2018) Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB- 231. *PLoS One* 13(2): e0191270.
15. Lacerda-Abreu MA, Russo-Abrahão T, Cosentino-Gomes D, Nascimento MTC, Carvalho-Kelly LF, et al. (2019) H⁺ dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865(9): 2180-2188.
16. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. *Biofactors* 31(2): 77-98.
17. Lee SY, Müller CE (2017) Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) and its inhibitors. *Medchemcomm* 8(5): 823-840.
18. Stagg J, Smyth MJ (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29(39): 5346-5358.
19. Dzhandzhugazyan KN, Kirkin AF, Thor Straten P, Zeuthen J (1998) Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett* 430(3): 227-230.
20. Buffon A, Wink MR, Ribeiro BV, Casali EA, Libermann TA, et al. (2007) NTPDase and 5' ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. *Biochim Biophys Acta* 1770(8): 1259-1265.
21. Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, Gutierrez JM, Maldonado PA, et al. (2012) Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother* 66(1): 40-45.
22. Gardani CFF, Cappellari AR, de Souza JB, da Silva BT, Engroff P, et al. (2019) Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signal* 15(1): 95-105.
23. Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, et al. (2010) Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol* 28(3): 260-267.
24. do Carmo Araújo M, Rocha JB, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, et al. (2005) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1740(3): 421-426.
25. Aerts I, Martin JJ, De Deyn PP, Van Ginniken C, Van Ostade X, et al. (2011) The expression of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (E-NPP1) is correlated with astrocytic tumor grade. *Clin Neurol Neurosurg* 113(3): 224-229.
26. Grobden B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310(3): 257-270.
27. Gómez-Villafuertes R, Pintor J, Miras-Portugal MT, Gualix (2014) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: Changes in expression associated with neuronal differentiation. *J Neurochem* 131(3): 290-302.
28. Bageritz J, Puccio L, Piro RM, Hovestadt V, Phillips E, et al. (2014) Stem cell characteristics in glioblastoma are maintained by the ectonucleotidase E-NPP1. *Cell Death Differ* 21(6): 929-940.
29. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, et al. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267(4): 2524-2529.
30. Zhang G, Zhao Z, Xu S, Ni L, Wang X (1999) Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 112(4): 330-332.
31. Kawagoe H, Stracke ML, Nakamura H, Sano K (1997) Expression and transcriptional regulation of the PD-1a/autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res* 57(12): 2516-2521.
32. Mulvaney PT, Stracke ML, Nam SW, Woodhouse E, O'Keefe M, et al. (1998) Cyclocreatine inhibits stimulated motility in tumor cells possessing creatine kinase. *Int J Cancer* 78(1): 46-52.
33. Yang Y, Mou Lj, Liu N, Tsao MS (1999) Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(2): 216-222.
34. Goding JW, Grobden B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638(1): 1-19.
35. Deissler H, Blass-Kampmann S, Bruyneel E, Mareel M, Rajewsky MF (1999) Neural cell surface differentiation antigen gp130(RB13-6) induces fibroblasts and glioma cells to express astroglial proteins and invasive properties. *FASEB J* 13(6): 657-666.
36. Mikhailov A, Sokolovskaya A, Yegutkin GG, Amdahl H, West A, et al. (2008) CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol* 181(1): 464-475.
37. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, et al. (2008) The role of ecto-50- nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* 319(1-2): 61-68.
38. Ludwig HC, Rausch S, Schallack K, Markakis E (1999) Expression of CD 73 (ecto-50-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res* 19(3A): 1747-1752.
39. Sadej R, Sychala J, Skladanowski AC (2006) Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res* 16(3): 213-222.
40. Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, et al. (2010) CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res* 70(6): 2245-2255.
41. Kondo T, Nakazawa T, Murata SI, Katoh R (2006) Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. *Histopathology* 48(5): 612-614.
42. Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, et al. (2004) Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer* 91(8): 1543-1550.
43. Durak I, Cetin R, Canbolat O, Cetin D, Yurtarslani Z, Unal A (1994) Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. *Cancer Lett* 84(2): 199-202.
44. Eroglu A, Canbolat O, Demirci S, Kocaoglu H, Eryavuz Y, (2000) Activities of adenosine deaminase and 5'- nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol* 17(4): 319-324.
45. Sychala J, Kitajewski J (2004) Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Exp Cell Res* 296(2): 99-108.
46. Sychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, et al. (2004) Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-50- nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(2): 708-717.
47. Zhou L, Jia S, Chen Y, Wang W, Wu Z, et al. (2019) The distinct role of CD73 in the progression of pancreatic cancer. *J Mol Med (Berl)* 97(6): 803-815.
48. Ma XL, Shen MN, Hu B, Wang BL, Yang WJ, et al. (2019) CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110β and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol* 12(1): 37.
49. Ranjbar MA, Ranjbar Z, Zahed M, Nikookar N (2019) CD73 a novel marker for the diagnosis of benign and malignant salivary gland tumors. *J Clin Exp Dent* 11(3): e213-e218.
50. Demers LM, Costa L, Chinchilli VM, Gaydos L, Curley E, et al. (1995) Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. *Clin Chem* 41(10): 1489-1494.

51. Nathanson L, Fishman WH (1971) New observations on the Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients. *Cancer* 27(6): 1388-1397.
52. Jacoby B, Bagshawe KD (1971) Placental-type alkaline phosphatase from human tumour tissue. *Clin Chim Acta* 35(2): 473-481.
53. Loose JH, Damjanov I, Harris H (1984) Identity of the neoplastic alkaline phosphatase as revealed with monoclonal antibodies to the placental form of the enzyme. *Am J Clin Pathol* 82(2): 173-177.
54. Higashino K, Otani R, Kudo S, Hashinostume M, Hada T (1975) Hepatocellular carcinoma and a variant alkaline phosphatase. *Ann Intern Med* 83(1): 74-78.
55. Wahren B, Holmgren PA, Stigbrand T (1979) Placental alkaline phosphatase, alphafetoprotein and carcinoembryonic antigen in testicular tumors. Tissue typing by means of cytologic smears. *Int J Cancer* 24(6): 749-753.
56. Jeppsson A, Wahren B, Brehmer-Andersson E, Silfverswärd C, Stigbrand T, et al. (1984) Eutopic expression of placental-like alkaline phosphatase in testicular tumors. *Int J Cancer* 34(6): 757-761.
57. Roelofs H, Manes T, Janszen T, Millán JL, Oosterhuis JW, et al. (1999) Heterogeneity in alkaline phosphatase isozyme expression in human testicular germ cell tumours: An enzyme-/immunohistochemical and molecular analysis. *J Pathol* 189(2): 236-244.
58. Moss DW, Raymond FD, Wile DB (1995) Clinical and biological aspects of acid phosphatase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32(4): 431-467.
59. Rangel LB, Sherman-Baust CA, Wernyj RP, Schwartz DR, Cho KR, et al. (2003) Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene* 22(46): 7225-7232.
60. Jarzab B, Wiench M, Fajarewicz K, Simek K, Jarzab M, et al. (2005) Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 65(4): 1587-1597.
61. Chen DR, Chien SY, Kuo SJ, Teng YH, Tsai HT, et al. (2010) SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Res* 30(10): 4135-4140.
62. Jiang Z, Hao Y, Ding X, Zhang Z, Liu P, et al. (2016) The effects and mechanisms of SLC34A2 on tumorigenicity in human non-small cell lung cancer stem cells. *Tumour Biol* 37(8): 10383-10392.
63. Soares IC, Simões K, de Souza JE, Okamoto OK, Wakamatsu A, et al. (2012) In silico analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20(2): 165-172.
64. Candéal E, Caldas YA, Guillén N, Levi M, Sorribas V (2014) Na⁺ independent phosphate transport in Caco2BBE cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(12): C1113-1122.
65. Ito M, Matsuka N, Izuka M, Haito S, Sakai Y, et al. (2005) Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast-like cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(4): C921-931.
66. Torriani A (1960) Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 38: 460-469.
67. Moog F, Glazier HS (1972) Phosphate absorption and alkaline phosphatase activity in the small intestine of the adult mouse and of the chick embryo and hatched chick. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 42(2): 321-336.
68. Valinietse MY, Bauman VK, Galvanovsky YY (1985) Absence of alkaline phosphatase-linked inorganic phosphate transport in the chick jejunum. *Digestion* 31(4): 182-188.

For possible submissions Click below:

[Submit Article](#)

Possible roles of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and clinical significance in metastasis human cancer

Marco Antonio Lacerda-Abreu^{1,2*} and José Roberto Meyer-Fernandes^{1,2*}

¹Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis; Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²National Institute of Science and Technology in Structural Biology and Bioimaging, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

CD73, also designated ecto-5'-nucleotidase is one kind of ecto-nucleotidase that plays a critical role in tumor development. CD73 overexpression is well established in the literature for various cancers. However, increasing studies have shown a strong relationship between CD73 for metastatic processes. In this review, we summarize major roles of CD73 expression for the development of metastases in different tumor tissues and possible therapeutic target for metastasis. In addition, we list possible CD73 functions, either by adenosine generation as adenosine receptor agonist (metastatic signaling modulator) or inorganic phosphate (Pi) generation as a substrate for the high bioenergetic metastatic processes demand.

Introduction

Metastasis is a complex process and a major contributor of death in cancer patients [1]. The metastatic process is thought to consist of a number of distinct steps: 1) Invasion requires neoplastic epithelial cells to lose cell-cell adhesion and to gain motility for migration and cell adhesion to matrix extracellular (MEC), this represents a shift toward the mesenchymal state for epithelial to mesenchymal transition (EMT), which enables them to invade the adjacent tissue [2]. 2) On intravasation, tumor cells penetrate through the blood endothelium or lymphatic vessels to enter the systemic circulation and must be able to survive this stressful environment. 3) Survivors cell extravasate through the capillary endothelium at distal sites. 4) In the new host environment, an even smaller subset of such metastasizing cells succeeds in proliferating from minimum growths into malignant secondary tumors [3].

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) are the most common signaling cascade for metastatic progression [1]. This cascade starts with the binding of an extracellular mitogenic ligand to the membrane receptor (ie EGFR, PDGFR) leading to activation of Ras (a GTPase) which activates series of MAPKs via MAP3K, MAP2K, MAPK and finally activation of metastatic transcription factors [1].

In solid tumors, ATP is released into the extracellular space through the channels and panexin connections, a higher concentration than in healthy tissues, due to cell death in the tumor nucleus, metabolic or hypoxic stress [4]. Ecto-nucleotidases are responsible for ATP hydrolysis generating ADP, AMP, adenosine and Pi, for three main classes of ecto-nucleotidases: 1) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (CD39, E-NTPDase) generating ADP and AMP from ATP hydrolysis; 2) Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases, hydrolysis of ATP to AMP; 3) Ecto-5'-nucleotidase, generating adenosine and Pi from 5'AMP hydrolysis [5-6]. Regarding Ecto-5'-nucleotidase, overexpression is well established in the literature for various cancers [6].

In this review, we shown the main works on CD73 expression in the development of metastasis in different tumor tissues. In addition,

we seek to understand mechanically how the CD73 enzyme regulates metastatic processes.

CD73 in several metastatic cancers

There is a consensus on high CD73 expression in different cancer tissues [6]. In recent years, CD73 expression has been associated with metastatic processes. In non-small cell lung cancer (NSCLC), silenced CD73 cell lines A549 and H226 showed significant inhibition of cell migration and invasion [7]. In melanoma cell lines (A375 cells), an enzymatic and non-enzymatic function of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in migration and invasion has been demonstrated [8]. Regardless of its enzymatic role, it is known that CD73 can mediate cell-cell adhesion by being a co-receptor in T cell activation or regulating cell interaction with extracellular matrix (ECM) components and migration therein [8-9].

Immunohistochemical analysis from melanoma patients samples, showed elevated CD73 expression in metastatic patients. In addition, was demonstrated an association of decreased survival with CD73 expression, whereas CD73 in tumor infiltrating mononuclear cells was significantly associated with survival improvement [10].

A study using human cervical cancer cell lines (HeLa and SiHa) overexpressing CD73 showed a 50% increase in cell migration. In the same study, ACPD (50µM), a specific inhibitor of CD73 enzyme activity has no effect on cell migration, suggesting a regulation independent of enzymatic activity. On the other hand, high concentration of adenosine (100µM-1mM) showed a decrease cell migration, suggesting a distinct

***Correspondence to:** Marco Antonio Lacerda-Abreu and José Roberto Meyer-Fernandes, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil, Tel: +55-21-3938-6781; Fax: +55-21-2270-8647; E-mail: meyer@bioqmed.ufrj.br

Key words: ecto-5'-nucleotidase, CD73, metastasis, adenosine-receptor, Pi transporters

Received: January 23, 2020; **Accepted:** February 13, 2020; **Published:** February 17, 2020

mechanism for adenosine receptors [11]. This latter observation was previously confirmed in PC-3 cells (human prostate carcinoma) and MDA-MB-231 cells (human breast cancer), a significant reduction in cell invasion with 1-50 μ M adenosine [12].

Regarding breast cancer, a distinct group using T47-D cells, observed a stimulation of cell invasion, migration and adhesion (slightly more than twice) with adenosine (100 μ M) and an inhibition with ACPP (12 μ M) [13]. Suggesting that CD73 may facilitate the metastatic process of human breast cancer cells through its enzyme activity of generating adenosine [13], as discussed later.

Hepatocellular carcinoma cell lines (HCCLM3 and SMMC7721) with CD73 silenced showed an inhibition of cell invasion and migration. In those same cells, by deleting the gene in xenograft model groups, the incidence of intrahepatic or lung metastasis was lower compared to the control and the opposite was observed when overexpressing the CD73 gene [14]. Moreover, CD73, E-Cadherin, and N-Cadherin expressions in hepatocellular carcinoma samples showed that in tissues with high CD73 expression levels have mesenchymal phenotype and samples with low level CD73 expression has phenotype more epithelial associating the CD73 expression with epithelial-mesenchymal transition [14].

CD73 acting as possible metastatic clinical targets

Some studies have shown different ways to impair CD73 function associated with damage to metastatic processes. The applicability of anti-CD73 monoclonal antibody (mAb) to breast cancer therapy in mouse models has been demonstrated [15]. The study inoculated mouse metastatic cell line (4T1.2) into BALB/C mice. In mice previously treated with anti-CD73 showed a significant reduction in lung metastasis compared to mice treated with the vehicle [15]. In other experiments of a distinct group, indicated that anti-CD73 could inhibit cell migration and invasion in human triple-negative breast cancer (MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells) and mouse 4T1 cell lines. In vivo analysis, anti-CD73 mAb could significantly inhibit lung metastasis of 4T1 cells in a mouse xenograft model [16]. This result set suggests the possible applicability of anti-CD73 for metastasis treatment, however, more studies need to be done regarding this applicability.

A new CD73 applicability has been suggested using tiamulin hydrogen fumarate (THF; 25 μ g/mL), a classic veterinary antibiotic showed a significant reduction in CD73 enzyme activity, whereas migration and invasion in MDA-MB-231 or T41 cells were reduced by THF. This trend was reversed by treatment with adenosine, suggested that THF inhibited cell migration and invasion by CD73 activity decreased [17].

One study using mouse models of breast cancer has demonstrated that CD73 overexpression in tumor cells conferred chemoresistance to doxorubicin, by suppressing adaptive antitumor immune responses via activation of A2A adenosine receptors [18]. Stagg and colleagues, shown that targeted therapy against CD73 can trigger adaptive anti-tumor immunity and inhibit metastasis of breast cancer [15]. In addition, Bowser, *et al.* demonstrated CD73 deficiency led to a loss of epithelial barrier function endometrial, and pharmacological CD73 inhibition increased in vitro migration and invasion of endometrial carcinoma cells [19]. These observations demonstrate the importance of caution in inhibiting CD73 and the possible impacts on non-tumor tissues in the human body.

Adenosine release function for metastasis

Ecto 5'-nucleotidase hydrolyzes AMP into adenosine, which is a major source of adenosine for adenosine (P1) receptors, whereas ATP is common substrate for P2 receptors. Together, acts a complex role in pathological and physiological functions of the body [20]. In this study, we will focus solely on adenosine receptor (P1) function as the main trigger for metastatic processes.

There are four subtypes of adenosine receptors (ARs), named A1, A2A, A2B and A3, all of which are G protein-coupled receptors (GPCRs) [5]. Both A1 and A3 receptors decrease cAMP levels, whereas A2A and A2B increase cAMP contents. Adenosine receptors activate MAPK pathways and, in some cells, A1, A3, and A2B receptors direct phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), overall acting on different pathways, mainly involved in metastatic processes [21]. For example, a group using a non-selective adenosine receptor antagonist (aminophylline) or a selective A2B receptor antagonist (ATL801) had a significant reduction by 85% breast cancer cells from mammary fat to lung [22]. In addition, Beavis, *et al.* shown that A2A receptor blockade potentially suppresses CD73⁺ tumor metastasis and Young, *et al.* demonstrated Co-inhibition of CD73 and A_{2AR} adenosine signaling improves anti-tumor immune responses [23-24].

Pi release function for metastasis

Ecto-5'-nucleotidases catalyses the hydrolysis of 5' carbon esterified phosphate from ribose or deoxyribose. High nucleotidase expression in tumor tissues has commonly been associated with extracellular adenosine release. Little is discussed about the contribution of Pi released from hydrolysis to these metastatic processes [6].

Pi is a fundamental component of phospholipids and the nucleotides that form DNA and RNA. Inorganic phosphate is associated with energy metabolism, either in the form of ATP or in its free form as a substrate for the intermediates of metabolic pathways [25].

It was observed that cell growth in a medium with a high Pi (3 or 5 mM Pi) compared to normal Pi (1 mM Pi) concentration displayed a greater migratory capacity, could be explained by expression of osteopontin regulated by Forkhead Box Protein C2 (FOXC2) [26].

Pi enters the cells via Na/Pi cotransporters. These cotransporters constitute two large families of Na⁺ Dependent inorganic phosphate transporters that have been characterized in mammals, namely, SLC20 and SLC34. Regarding the SLC34 family, consists of three members, namely, NaPi-IIa (SLC34A1), NaPi-IIb (SLC34A2), and NaPi-IIc (SLC34A3) [27]. Several studies suggest that NaPi-IIb (SLC34A2) is upregulated in tumor cells and thus have been considered to be important promoters of tumor progression [25]. Russo-Abrahão, *et al.* showed the Pi transport level higher in cells breast cancer cells with greater metastatic potential such as MDA-MB-231 compared to other breast cancer cells (MCF-7 and T47-D). In addition, inhibition of Na⁺-dependent Pi transport in those cells significant reduced tumor cell migration and adhesion [28]. Lacerda-Abreu, *et al.* 2019 demonstrated in MDA-MB-231 cells, a low affinity H⁺-dependent Pi transporter is related to cell migration and adhesion process, especially in high Pi concentrations. Also was shown that MDA-MB-231 cells tend to revert from mesenchymal to epithelial features when the H⁺-dependent Pi transport is inhibited [29].

Conclusion

The development of metastases represents the fortuitous survival and growth of very few neoplastic cells. In this review, we summarize

the importance of CD73 for metastatic processes in different tumor tissues and possible use as a therapeutic target for metastasis. This would occur by mechanisms independent of enzymatic function, in which CD73 may perform a receptor-like function by controlling metastatic signaling. Regarding the enzymatic function of CD73 and its generated products (adenosine and Pi), adenosine binds at P1 receptor, generally acts on the MAPK pathway, the main signaling pathway involved in signaling metastatic processes. Inorganic phosphate possibly acts as substrate for the Na⁺-dependent or H⁺-dependent Pi transporters, providing more Pi intracellular for metastatic bioenergetic demand.

Acknowledgements and Funding

This work was supported by research grants Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), The State of Rio de Janeiro Research Foundation (FAPERJ), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) supported this investigation.

References

- Khan I, Steeg PS (2017) Metastasis suppressors: functional pathways. *Laboratory Investigation* 98: 198-210.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, et al. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-939. [Crossref]
- Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3: 453-458. [Crossref]
- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J, et al. (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276: 121-144. [Crossref]
- Stagg J, Smyth MJ (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29: 5346-5358. [Crossref]
- Lacerda-Abreu MA, Meyer-Fernandes JR (2019) Release of Inorganic Phosphate into the Tumor Environment: Possible Roles of Ecto-Nucleotidases and Ecto-Phosphatases. *Nov Appro in Can Study* 3: NACS.000568.
- Zhu J, Zeng Y, Li W (2017) CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 16: 34. [Crossref]
- Sadej R, Skladanowski AC (2012) Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol* 59: 647-652. [Crossref]
- Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, et al. (1995) CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* 182: 1603-1608. [Crossref]
- Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, et al. (1995) CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* 182: 1603-1608. [Crossref]
- Monteiro I, Vigano S, Faouzi M, Treilleux I, Michielin O, et al. (2018) CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. *Oncotarget* 9: 26659-26669. [Crossref]
- Gao ZW, Wang HP, Lin F, Wang X, Long M, et al. (2017) CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer* 17: 135. [Crossref]
- Virtanen SS, Kukkonen-Macchi A, Vainio M, Elima K, Härkönen PL, et al. (2014) Adenosine inhibits tumor cell invasion via receptor-independent mechanisms. *Mol Cancer Res* 12: 1863-1874. [Crossref]
- Ma XL, Shen MN, Hu B, Wang BL, Yang WJ, et al. (2019) CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110^β and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol* 12: 37. [Crossref]
- [Crossref] Stagg JI, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, et al. (2010) Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1547-1552.
- [Crossref] Qiao ZI, Li X2, Kang N3, Yang Y4, Chen C5, et al. (2019) A Novel Specific Anti-CD73 Antibody Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Cell Motility by Regulating Autophagy. *Int J Mol Sci* 20.
- Yang X, Pei S, Wang H, Jin Y, Yu F (2017) Tiamulin inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of CD73. *BMC Cancer* 17: 255. [Crossref]
- Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, et al. (2013) CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 11091-11096. [Crossref]
- Bowser JL, Blackburn MR, Shipley GL, Molina JG, Dunner K Jr, et al. (2016) Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J Clin Invest* 126: 220-238. [Crossref]
- Iqbal J (2019) Ectonucleotidases: Potential Target in Drug Discovery and Development. *Mini Rev Med Chem* 19: 866-869. [Crossref]
- Arab SI,2, Hadjati J3 (2019) Adenosine Blockage in Tumor Microenvironment and Improvement of Cancer Immunotherapy. *Immune Netw* 19: e23. [Crossref]
- Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, et al. (2012) Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J Immunol* 188: 198-205. [Crossref]
- Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, et al. (2013) Blockade of A2A receptors potentially suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14711-14716. [Crossref]
- Young A, Ngiow SF1, Barkauskas DS2, Sult E3, Hay C3, et al. (2016) Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* 30: 391-403. [Crossref]
- Lacerda-Abreu MA, Russo-Abrahão T, Monteiro R de Q, Rumjanek F D, Meyer-Fernandes JR (2018) Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1870: 291-298.
- Lin Y, McKinnon KE, Ha SW, Beck GR Jr (2015) Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXC2) regulated osteopontin expression. *Mol Carcinog* 54: 926-934. [Crossref]
- Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H (2013) Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med* 34: 386-395. [Crossref]
- Russo-Abrahão T, Lacerda-Abreu MA, Gomes T (2018) Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PLoS One* 13: e0191270. [Crossref]
- Lacerda-Abreu MA, Russo-Abrahão T, Cosentino-Gomes D, Nascimento MTC, Carvalho-Kelly LF, et al. (2019) H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865: 2180-2188. [Crossref]

Copyright: ©2020 Lacerda-Abreu MA. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

RESEARCH ARTICLE

Ectophosphatase activity in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231

Marco A. Lacerda-Abreu^{1,2} | Thais Russo-Abrahão^{1,2} |
Raíssa Leite Tenório Aguiar^{1,2} | Robson de Queiroz Monteiro¹ |
Franklin D. Rumjanek¹ | José R. Meyer-Fernandes^{1,2} 

¹Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

José R. Meyer-Fernandes, Laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil
Email: meyer@bioqmed.ufrj.br

Funding information

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Grant/Award Number: e-26/201.300/2014; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 0012017; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 401134/2014-8

Abstract

Breast cancer is one of the most common cancers in the female population worldwide, and its development is thought to be associated with genetic mutations that lead to uncontrolled and accelerated growth of breast cells. This abnormal behavior requires extra energy, and indeed, tumor cells display a rewired energy metabolism compared to normal breast cells. Inorganic phosphate (Pi) is a glycolytic substrate of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and has an important role in cancer cell proliferation. For cells to obtain Pi, ectoenzymes in the plasma membrane with their catalytic site facing the extracellular environment can hydrolyze phosphorylated molecules, and this is an initial and possibly limiting step for the uptake of Pi by carriers that behave as adjuvants in the process of energy harvesting and thus partially contributes to tumor energy requirements. In this study, the activity of an ectophosphatase in MDA-MB-231 cells was biochemically characterized, and the results showed that the activity of this enzyme was higher in the acidic pH range and that the enzyme had a $K_m = 4.5 \pm 0.5$ mM para-nitrophenylphosphate and a $V_{max} = 2280 \pm 158$ nM \times h⁻¹ \times mg protein⁻¹. In addition, classical acid phosphatase inhibitors, including sodium orthovanadate, decreased enzymatic activity. Sodium orthovanadate was able to inhibit ectophosphatase activity while also inhibiting cell proliferation, adhesion, and migration, which are important processes in tumor progression, especially in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells that have higher ectophosphatase activity than MCF-7 and MCF-10 breast cells.

KEYWORDS

breast cancer, ectophosphatase activity, MDA-MB-231

Abbreviation: ER, estrogen receptor; PAP, prostatic acid phosphatase; Pi, inorganic phosphate; p-NP, p-nitrophenol; p-NPP, p-nitrophenylphosphate; PR, progesterone receptor; TM-PAP, transmembrane prostatic acid phosphatase.

This work is dedicated to Franklin David Rumjanek, who died during the process of reviewing this article.

1 | INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer worldwide (Nagini, 2017). The World Health Organization estimated that there were 2.09 million cases of breast cancer and 627,000 breast cancer-associated deaths in 2018 (World Health Organization, 2019). According to its

gene expression profile, breast cancer has at least four different phenotypes: luminal A (estrogen receptor [ER] positive and/or progesterone receptor [PR] positive, and human epidermal growth factor receptor [HER] negative); luminal B (ER positive and/or PR positive, and HER2 negative); HER2-enriched; and basal-like (triple-negative; ER negative, PR negative, and HER2 negative; Harbeck & Gnant, 2017; Vuong et al., 2014). Previous studies suggest that the MDA-MB-231 cell line (a triple-negative cancer cell line) exhibits an increased migratory capacity compared to MCF-7 and T47-D (luminal A) cells (Smith et al., 2014). MDA-MB-231 cell migration has also been reported to be highly stimulated by high concentrations (3–5 mM) of extracellular inorganic phosphate (Pi; Y. Lin et al., 2014).

Pi is an essential nutrient for cells and is present in the tumor microenvironment. Recently, two Pi transporters were described in breast cancer: H⁺-dependent Pi transporter and Na⁺-dependent Pi transporter, which play a role in tumor progression (Lacerda-Abreu et al., 2019, 2018; Russo-Abrahão et al., 2018). Certain ectoenzyme groups are involved in the availability of extracellular phosphate to the cells; these enzymes are responsible for dephosphorylation processes on the external surface of cells (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019). Although known, phosphatases have not been biochemically characterized in cancer cells, and it is possible that ectophosphatases are responsible for Pi release in the tumor microenvironment, which would eventually be captured by Pi carriers (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019).

In addition to ectophosphatases, another class of enzymes that hydrolyze extracellular phosphorylated nucleotides derived from purine or pyrimidine has been described in breast cancer: (a) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) (Do-Carmo-Araújo et al., 2005); (b) ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (Yang et al., 2002); (c) ecto-5-nucleotidase (Canbolat et al., 1996); and (d) Alkaline phosphatase (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019; Loose et al., 1984; Zimmermann, 2009).

Phosphatases are classified based on substrate specificity, pH, and cellular location (Camici et al., 1989; Freitas-Mesquita & Meyer-Fernandes, 2014). Alkaline phosphatases, a known class of phosphatases, are capable of hydrolyzing phosphate monoesters in alkaline pH (Vincent et al., 1992). These enzymes are classified into two groups: tissue nonspecific alkaline phosphatases and tissue-specific alkaline phosphatases, which includes intestinal alkaline phosphatase, placental alkaline phosphatase, and germ cell alkaline phosphatase (Al-Rashida & Iqbal, 2014; Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019).

Another group, the acid phosphatases, catalyzes the hydrolysis of phosphate monoesters under acidic conditions and generates Pi (Vincent et al., 1992). A recent review compiled data showing that human tissues present certain types of acid phosphatases: prostatic acid phosphatase (PAP), an intracellular protein; serum acid phosphatase; and transmembrane type I protein, with extracellular phosphatase activity (TM-PAP) (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019; Quintero et al., 2007). Multiple treatment strategies for prostate cancer are based on PAP inhibition (A. M. Lin et al., 2006).

Ectophosphatases are membrane-attached enzymes whose active sites face the external environment. These enzymes catalyze the

removal of phosphate groups from various phosphorylated substrates, such as phosphoamino acids (Fonseca-de-Souza et al., 2009; Furuya et al., 1998). The aim of this study is to characterize the ectophosphatase activity in MDA-MB-231 breast cancer cells, underlining its possible role in tumor biology as a source of phosphate, which, in turn, could be internalized by tumor cell-specific carriers, and, thus, participate in tumorigenesis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Materials

Reagents were purchased from Sigma-Aldrich. All solutions were prepared with Milli-Q water (Millipore Corp.).

2.2 | Cell culture

MCF-10A, a human breast nontumorigenic epithelial cell line, was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml epidermal growth factor (Sigma-Aldrich), 0.5 µg/ml hydrocortisone (pH 7.4) (Sigma-Aldrich), and 100 U/ml penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific). The MCF-10A cells were genotyped, yielding a profile that confirmed their identity by comparing it to ATCC, DSMZ, CLIMA, and ICLAC data. They were kindly supplied by Jerson Lima da Silva from the Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, UFRJ.

Breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Iscoves modified Dulbecco's medium (IMDM; LCG Biotechnology) supplemented with sodium bicarbonate, 10% FBS (Cripion Biotechnology), and 100 U/ml penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific). IMDM contains 1 mM Pi; NaH₂PO₄ was added, and the pH was adjusted to 7.4 with HCl (Sigma-Aldrich).

Cells were harvested from the culture medium, washed two times with buffer consisting of 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂, and 50 mM HEPES (pH 7.2). Adherent cells were dissociated after incubation at 37°C and 5% CO₂ with a trypsin solution (2.5 g/L, pH 7.2, and 0.05 ml/cm²), and the cell number was estimated by counting in a Neubauer chamber. Protein concentrations were measured using the Bradford method (Bradford, 1976).

2.3 | Ectophosphatase activity measurements

Phosphatase activity was determined using *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) as the substrate and by measuring the rate of *p*-nitrophenol (*p*-NP) production. MCF-10A, MCF-7, and MDA-MB-231 cells were cultivated in 96-well plates (5 × 10⁴ cells per well) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in a reaction mixture (0.1 ml)

containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 50 mM HEPES (pH 7.2), and 0.8 mM MgCl₂. Reactions were started by the addition of 5 mM *p*-NPP, and the supernatant was transferred to a 96-well plate without cells; after 60 min, the reactions were stopped by addition of 0.2 ml of 1 N NaOH, and the results were determined spectrophotometrically at 425 nm. The phosphatase activity was calculated by subtracting the nonspecific *p*-NPP hydrolysis measured in the absence of cells. To determine the concentration of released *p*-NP, a *p*-NP curve was plotted and used as a standard. We also tested phosphoamino acid nucleotides as possible ectophosphatase substrates. In these cases, the hydrolytic activities were spectrophotometrically analyzed by measuring the Pi released from these substrates under the same conditions employed above (Fiske & Subbarow, 1925). The values obtained for *p*-NPP activity using both methods were identical.

2.4 | Proliferation assay

MDA-MB-231 cells (1×10^4 cells per well) were seeded in 24-well culture plates. After 12 h, 1 mM sodium orthovanadate was added, and the cells were incubated for different lengths of time at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After the indicated incubation time (0–72 h), the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized and quantified using a Neubauer chamber.

2.5 | Adhesion assay

Briefly, 96-well culture plates were precoated with 32 µg/ml extracellular matrix (ECM) gel (rat sarcoma) diluted in PBS for 12 h at 4°C. To block nonspecific binding, background binding sites of the wells were coated with 1 mg/ml bovine serum albumin diluted in PBS for 2 h at room temperature. MDA-MB-231 cells (100 µl suspended in serum-free medium) were added to each well coated with ECM gel at 2.5×10^4 cells/well in the absence or presence of 1 mM sodium orthovanadate and maintained at 37°C and 5% CO₂ for 12 h. Nonadherent cells were carefully removed by washing twice with PBS, and the adherent cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min. Fixed cells were then washed with PBS twice, stained with 100 µl of 0.5% crystal violet for 5 min and washed further (2X) with PBS. The washed cells were lysed with 100 µl acetic acid (1% in ethanol) and stained with crystal violet. Cell lysates were read spectrophotometrically at 570 nm. The results are expressed as a percentage of the control (Lacerda-Abreu et al., 2019).

2.6 | Migration assay

For migration assays, 24-well Corning® Transwell® plates with permeable supports, 6.5 mm inserts, and 8.0-µm polycarbonate membrane pores were used. MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells/well)

were suspended in serum-free medium, added to the upper chamber in the absence or presence of 1 mM sodium orthovanadate, and maintained at 37°C in 5% CO₂ for 4 h. After incubation, migrated cells were washed twice with PBS, fixed with 100% methanol, and stained for 15 min in crystal violet solution (0.5% crystal violet in 25% methanol/PBS). Cells that did not migrate to the lower compartment were removed with a cotton swab. Five random fields in each insert were photographed at a magnification of $\times 20$. Quantification is expressed as the percentage of area covered with migrated cells determined using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Health; Buchegger et al., 2016).

2.7 | Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, with similar results obtained from at least three separate cell suspensions. The values presented in all experiments represent the mean \pm SE. Differences were considered significant at $p < .05$ determined by one-way analysis of variance using Turkey's multiple comparisons test, unless otherwise specified in the figure legend. The kinetic parameters (apparent K_m and V_{max} values) were calculated using nonlinear regression analysis of data for the Michaelis-Menten equation. Linear regression analyses of Lineweaver-Burk plots were also performed. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software).

3 | RESULTS

3.1 | Extracellular phosphatases in breast cell lines

We investigated the secreted phosphatase and ectophosphatase activities in human breast epithelial cells (MCF-10A) and breast cancer cells (MCF-7 (hormone-positive) and MDA-MB-231 (hormone-negative)). The ectophosphatase activity was higher in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) but most prominent in the MDA-MB-231 cell line (Figure 1a).

To investigate the possibility of *p*-NPP being hydrolyzed by secreted soluble enzymes, MCF-10A, MCF-7, and MDA-MB-231 cells were incubated in the absence of *p*-NPP. Subsequently, the suspensions were centrifuged to remove cells, and the supernatants were assayed for phosphatase activity. No differences were observed in the activity of secreted phosphatases between the breast cell lines (Figure 1b). Hence, although displaying different activities, all enzymes were secreted. On the basis of these initial results, we opted to concentrate our study specifically on the MDA-MB-231-line. In these cells, the secreted phosphatase activity is not related to the membrane bound ectophosphatase activity. Tartrate, a specific inhibitor of secreted phosphatase activity (Dutra et al., 1998; Santos et al., 2002; Vannier-Santos et al., 1995), inhibited the secreted phosphatase activity strongly (Figure 2a) and had no effect on ectophosphatase activity (Figure 2b).

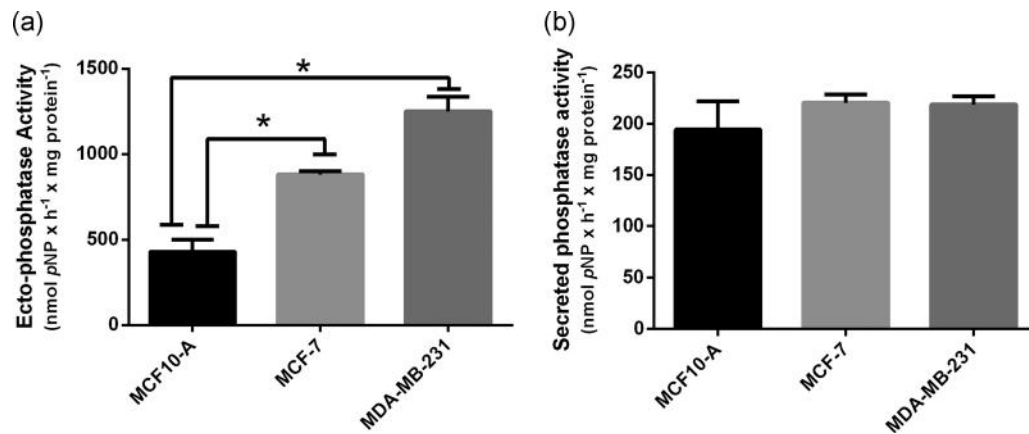


FIGURE 1 Extracellular phosphatases in breast cell lines. (a) To assess ectophosphatase activity, breast cells (5×10^4 cells/well = 14.5 mg protein/ml) were incubated at 37°C in a reaction mixture containing 116 mM NaCl, 5.5 mM glucose, 5.4 mM KCl, 15 mM HEPES (pH 7.2), 0.8 mM $MgCl_2$, and 5 mM para-nitrophenylphosphate (pNPP) for 60 min. (b) For secreted phosphatase, a reaction mixture without pNPP was preincubated for 60 min, and 5 mM pNPP was added to the cell-free supernatant. The data are the means \pm SE of three experiments with different cell suspensions. pNP, p-nitrophenol. * denotes significant differences ($p < .05$) from MCF10-A, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test

3.2 | Ectophosphatase activity and kinetic parameters

The time course of phosphatase activity present on the external surface of MDA-MB-231 cells was linear for at least 1 h (Figure 3a). To evaluate kinetic parameters, ectophosphatase activity was examined in the presence of p-NPP at a concentration range of 0–15 mM (Figure 3b). The enzymatic activity followed Michaelis–Menten kinetics, showing an apparent $K_m = 4.5 \pm 0.5$ mM pNPP and $V_{max} = 2280 \pm 158$ nM \times h $^{-1}$ \times mg protein $^{-1}$. Linear regression analysis of Lineweaver–Burk plots (Figure 3b inset) confirmed that the ectophosphatase activity followed Michaelis–Menten kinetics.

Ectophosphatase activity was assessed at different pH ranges (5.0–8.0). The results in Figure 3c show that higher ectophosphatase

activity occurred under more acidic pH conditions. In all pH ranges tested, MDA-MB-231 cell viability was not affected (Figure 3d).

3.3 | Phosphatase inhibitors and substrate specificity in MDA-MB-231 cells

Classical phosphatase inhibitors were tested against ectophosphatase activity. Levamisole, an alkaline phosphatase inhibitor, had no effect on the ectophosphatase activity (Figure 4a). Ammonium molybdate, an acid phosphatase inhibitor, and sodium orthovanadate, an acid tyrosine-phosphatase inhibitor, promoted a significant reduction in the ectophosphatase activity (Figure 4a). Under all conditions tested, the inhibitors did not decrease MDA-MB-231 cell viability (Figure 4b).

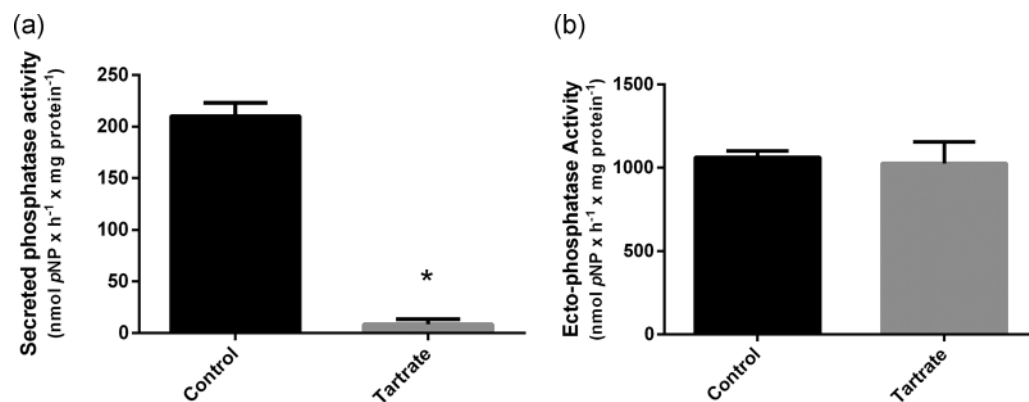


FIGURE 2 Influence of tartrate on secreted phosphatase and ectophosphatase activities of MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C. (a) For secreted phosphatase, a reaction mixture without para-nitrophenylphosphate (pNPP) was preincubated for 60 min, and 5 mM pNPP was added to the cell-free supernatant in the absence (control) or presence of tartrate (10 mM). (b) Ectophosphatase activity was measured in a reaction mixture as described in Figure 1 in the absence (control) or presence of tartrate (10 mM). pNP, p-nitrophenol. * denotes significant differences ($p < .05$) from control, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test

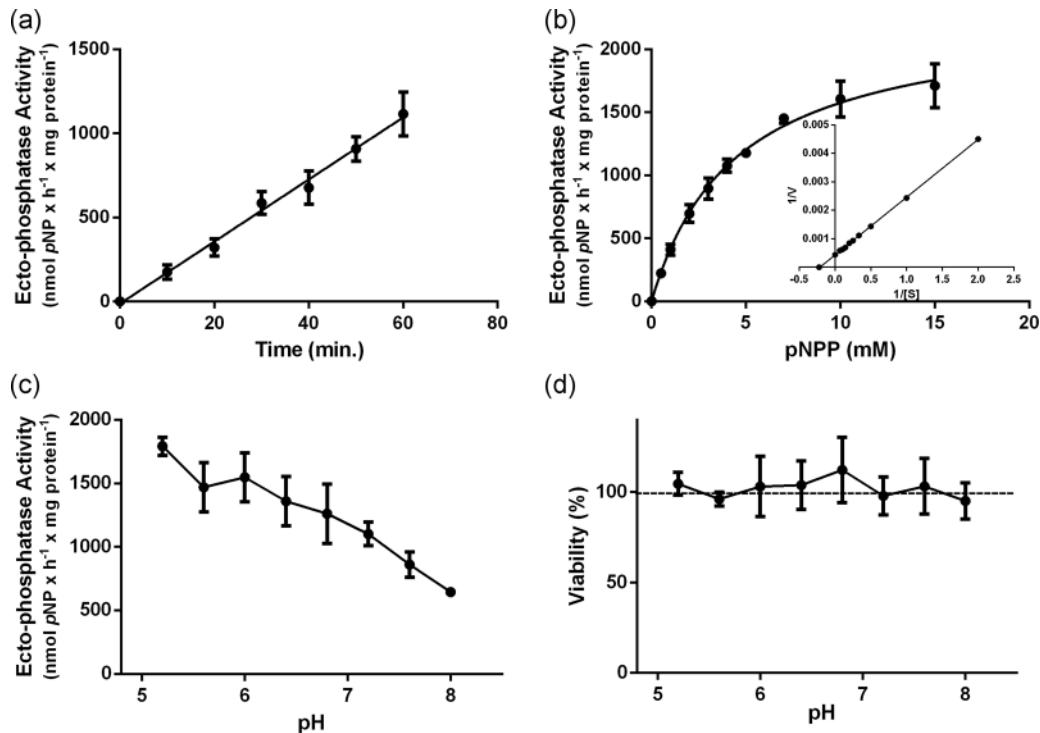


FIGURE 3 (a) Kinetic parameters of ectophosphatase activity of MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C, and ectophosphatase activity was measured at various time points in a reaction mixture as described in Figure 1a, with increasing concentrations of para-nitrophenylphosphate (*p*-NPP; 0–10 mM). (b) inset) Lineweaver–Burk plot for *p*-NPP concentrations between 0.5 and 10 mM *p*-NPP. (c) The pH values were adjusted from 5.0 to 8.0 using 15 mM magnesium acetate, 15 mM HEPES, 15 mM Tris, and 15 mM MES. (d) In these pH ranges, the cells remained viable throughout the experiment according to CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) results. The data are the means \pm SE of three experiments with different cell suspensions. pNP, *p*-nitrophenol

Moreover, the ectophosphatase inhibitors ammonium molybdate (0–1000 μ M), sodium orthovanadate (0–1000 μ M), and Pi (0–10 mM) showed dose-dependent inhibition of the ectophosphatase activity (Figure 5) in MDA-MB-231 cells.

The effect of sodium orthovanadate on extracellular nucleotide hydrolysis was also tested, and ATP, ADP, and AMP were used as substrates. However, only *p*-NPP hydrolysis was inhibited (Table 1). These results rule out the notion that

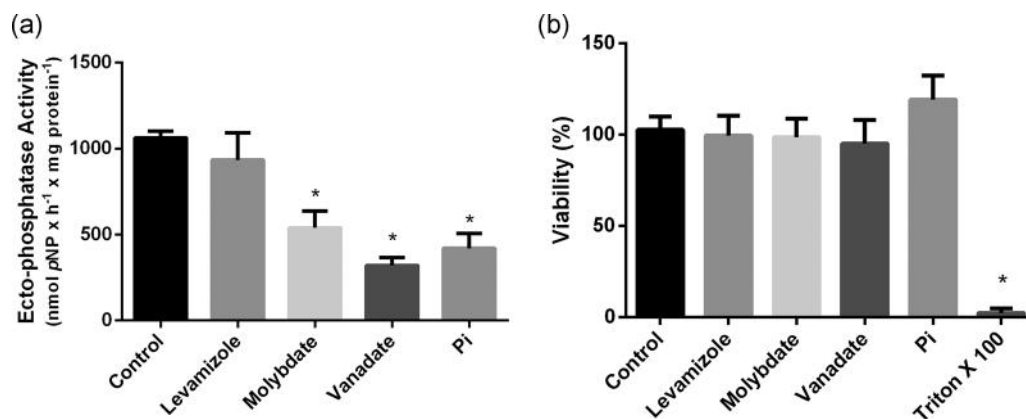


FIGURE 4 Effect of different phosphatase inhibitors on the ectophosphatase activity and viability of MDA-MB-231 cells. (a) Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C, and ectophosphatase activity was measured in a reaction mixture as described in Figure 1 in the presence of 1 mM levamisole, 10 mM sodium tartrate, 1 mM ammonium molybdate, 1 mM sodium orthovanadate, and 10 mM inorganic phosphate (Pi). (b) Under these conditions, the cells remained viable throughout the experiment according to CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) results. The data are the means \pm SE of three experiments with different cell suspensions. pNP, *p*-nitrophenol. *denotes significant differences ($p < .05$) from control, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test

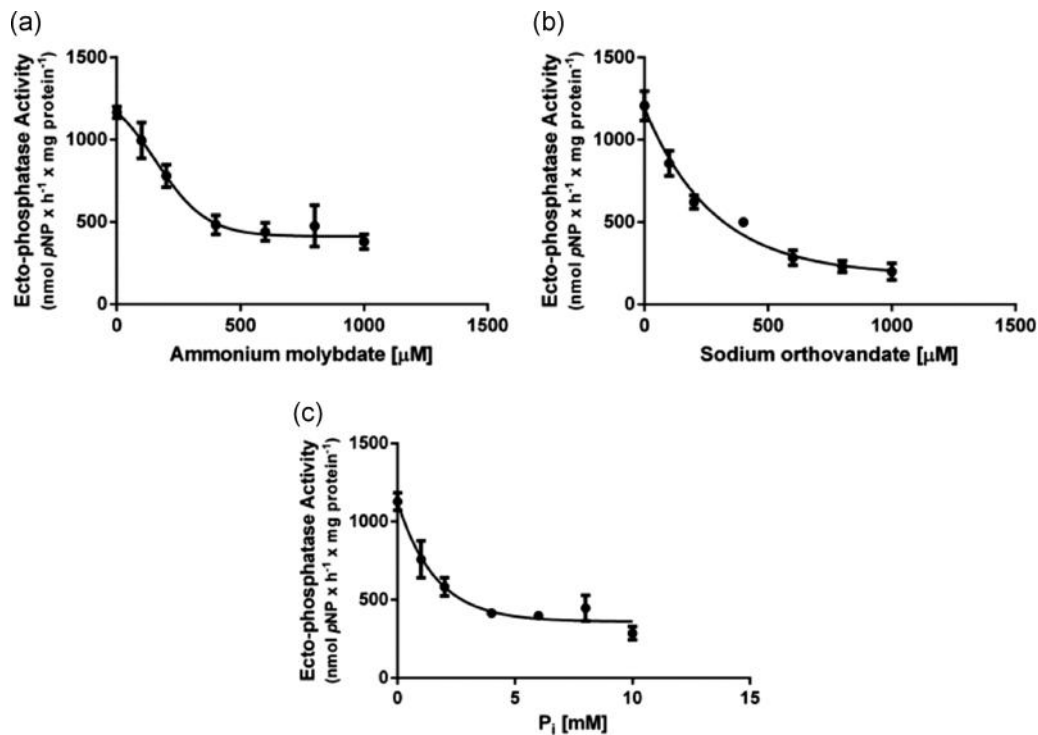


FIGURE 5 Influence of increasing concentrations of phosphatase inhibitors on the ectophosphatase activity of MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C, and ectophosphatase activity was measured in a reaction mixture as described in Figure 1 in the absence or presence of increasing concentrations of ammonium molybdate (0–1000 μ M) (a), sodium orthovanadate (0–1000 μ M) (b), and Pi (0–10 mM) (c). The data are the means \pm SE of three experiments with different cell suspensions. Pi, inorganic phosphate; p-NPP, para-nitrophenylphosphate

nucleotide hydrolysis is associated with ectophosphatase activity in MDA-MB-231 cells.

Phosphotyrosine, phosphoserine, and phosphothreonine were hydrolyzed by ectophosphatase in MDA-MB-231 cells. However, similar to p-NPP, only phosphotyrosine hydrolysis was inhibited by sodium orthovanadate, suggesting a contribution of at least two ectophosphatases (Figure 6a). To test this hypothesis, p-NPP hydrolysis was measured in the presence of different phosphoamino

acid concentrations. As shown in Figure 6b, only phosphotyrosine was able to significantly inhibit p-NPP hydrolysis.

3.4 | Effect of sodium orthovanadate on cell proliferation, viability, adhesion, and migration

Sodium orthovanadate was added to the growth medium of MDA-MB-231 cells, and the cell number and viability were monitored over a period of 0–72 h. Sodium orthovanadate was able to inhibit approximately 70% of the proliferative capacity of MDA-MB-231 cells (Figure 7a,b).

We further tested the effect of sodium orthovanadate on cell migration and adhesion. Sodium orthovanadate significantly reduced the migratory capacity by approximately 70% (Figure 7c). In the case of cell adhesion, sodium orthovanadate induced a 90% reduction in the ability of the MDA-MB-231 cells to adhere to an ECM (Figure 7d).

TABLE 1 Specific activities for the p-NPP, ATP, ADP, and AMP hydrolysis in the presence or absence of sodium orthovanadate (1 mM)

Substrate	Specific activities (nmol Pi \times h ⁻¹ \times mg protein ⁻¹)	
	Control	Sodium orthovanadate (1 mM)
p-NPP, 5 mM	1378.1 \pm 27.8	210.8 \pm 15.7*
ATP, 5 mM	1474.5 \pm 94.9	1424.3 \pm 133.0
ADP, 5 mM	764.2 \pm 54.5	750.18 \pm 118.4
AMP, 5 mM	23031.8 \pm 209.6	23221.2 \pm 425.5

Note: Data are means \pm SE of three experiments with different cell suspensions.

Abbreviations: Pi, inorganic phosphate; p-NPP, p-nitrophenylphosphate. *Significant differences ($p < .05$) after comparison with the control (no sodium orthovanadate).

4 | DISCUSSION

Tumor cells have high glycolytic activity, possibly to supply extra energy to enable cell proliferation and metastasis. Therefore, cells depend on a pool of Pi to support such mechanisms (Bobko et al., 2017;

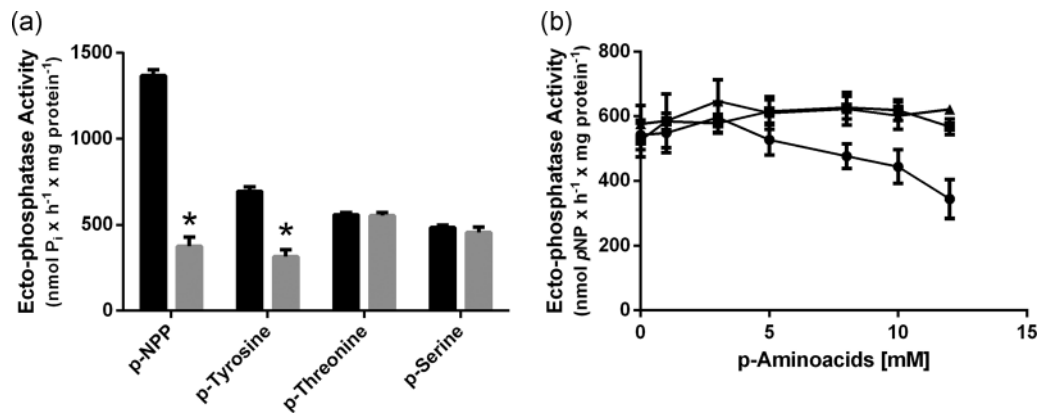


FIGURE 6 Substrate specificity for ectophosphatase activities of MDA-MB-231 cells. (a) Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C, and ectophosphatase activity was measured in reaction medium as described in Figure 1 in the absence (black bars) or presence of 1 mM sodium orthovanadate (gray bars) and with 5 mM of one of the following substrates: p-nitrophenylphosphate (p-NPP), phospho-tyrosine (p-Tyr), phosphothreonine (p-Thr), or phospho-serine (p-Ser). (b) The influence of increasing phospho-amino acid concentrations (0–12 mM) on 1 mM p-NPP hydrolysis; p-Tyr (black circle), p-Ser (black square), and p-Thr (black triangle). The data are the means \pm SE of three experiments with different cell suspensions. * $p < .05$ denotes significant differences compared with the control (no sodium orthovanadate). pNP, p-nitrophenol

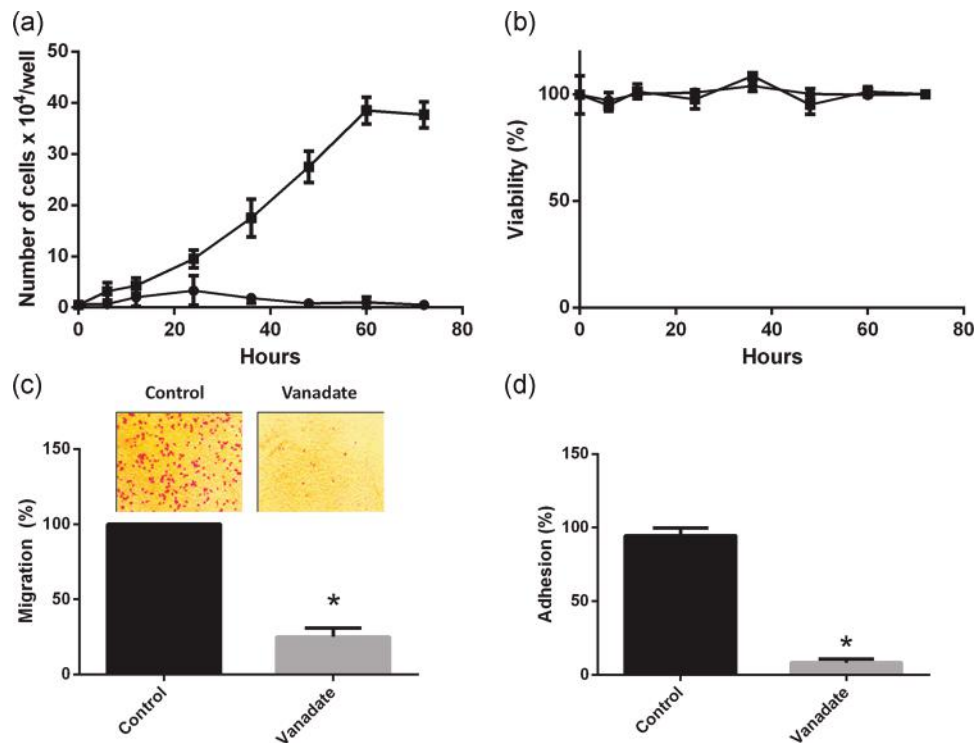


FIGURE 7 Effect of sodium orthovanadate on MDA-MB-231 cell proliferation, adhesion, and migration. (a) MDA-MB-231 cells (1×10^4 cells/well) were maintained in the absence (black circles) or presence of 1 mM sodium orthovanadate (black squares) and were quantified at an initial interval of 6 or 12 h and up to 72 h using a Neubauer chamber. (b) Under these conditions, the cells remained viable throughout the experiment according to CellTiter 96@Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) results. (c) MDA-MB-231 cell (5×10^4 cells/well) migration was assessed after pretreatment for 60 min in the presence or absence of sodium orthovanadate (vanadate 1 mM). Representative micrographs of transwell migration assays were selected to show each condition ($\times 20$ magnification). (d) MDA-MB-231 cell (5×10^4 cells/well) adhesion was assessed after pretreatment for 60 min in the presence or absence of sodium orthovanadate (vanadate 1 mM). The data are the means \pm SE of three experiments with different cell suspensions. * denotes significant differences ($p < .05$) from control, as determined by One-Way analysis of variance (ANOVA), using Turkey's multiple comparisons test

Brown & Razzaque, 2018; Moreno-Sánchez et al., 2007). Since Pi is an anionic molecule, its uptake from the extracellular medium to the cytosol is mediated by transporters (Biber et al., 2013; Lacerda-Abreu et al., 2018), which was recently described in breast cancer (Lacerda-Abreu et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018). Ectophosphatases may also participate in the process of obtaining Pi because these enzymes catalyze hydrolysis of phosphorylated molecules, releasing free Pi (Fontanillo & Köhn, 2016). The phosphorylated molecules could be phosphoproteins present in the extracellular environment (Chen et al., 2009; Olsen et al., 2006), eventually becoming substrates for ectophosphatase activity.

Pi plays important roles in reactions involving metabolic intermediates (Sapio & Naviglio, 2015). Thus, to obtain Pi, ectophosphatases in the plasma membrane with their catalytic site facing the extracellular environment could dephosphorylate phosphorylated molecules, which is an initial and possibly limiting step that may bypass Pi transporters, and, thus, fulfill the energy-related tumor phosphate demand (Fontanillo & Köhn, 2016; Lacerda-Abreu et al., 2019). On the basis of results shown in Figure 1, we suggest that enhanced ectophosphatase activity may contribute to greater migratory capacity. In this case, Pi release would be in keeping with a greater demand for Pi in connection with tumor cell energy metabolism (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019; Smith et al., 2014).

PAP is currently used as a target in prostate cancer therapy (A. M. Lin et al., 2006). There are two forms of PAP, secretory and nonsecretory, with different isoelectric points and molecular weights (Lacerda-Abreu et al., 2019; Quintero et al., 2007). Recently, a new PAP variant encoding a TM-PAP has been identified in various tissues, such as the brain, kidney, liver, lung, placenta, salivary gland, spleen, thyroid, and thymus (Quintero et al., 2019). Here, we detected higher ectophosphatase activity compared with the secreted form. In addition, we have shown the main kinetic characteristics of ectophosphatase in breast cancer cells: linear activity over time (at least up to 60 min) with a Michaelis–Menten kinetic profile and higher activity under more acidic pH conditions. It is plausible to speculate whether glycolysis-derived lactate contributes to acidification of the immediate cell vicinity, thus boosting ectophosphatase activity. The ectophosphatase activity described here presented a high K_m value (Figure 3b). This kinetic parameter was obtained using the artificial phosphorylated substrate *p*NPP, a phosphotyrosine analog (Amazonas et al., 2009), but the natural phosphorylated substrates outside of cells in tumoural microenvironments remain to be elucidated.

Breast cancer (MDA-MB-231) cells were able to hydrolyze three types of phosphorylated amino acids: *p*-tyrosine, *p*-threonine, and *p*-serine. Sodium orthovanadate, a tyrosine acid phosphatase inhibitor, showed strong inhibition of ectophosphate activity. Sodium orthovanadate was only able to inhibit hydrolysis of *p*-NPP and *p*-tyrosine. One explanation for this result is that *p*-NPP has a phosphate group attached to the aromatic ring, similar to *p*-tyrosine but different from *p*-serine and *p*-threonine. This leads to the assumption that *p*-NPP and *p*-tyrosine are hydrolyzed by the same catalytic site. To clarify this issue, we demonstrated (Figure 5b) that only one *p*-tyrosine was

able to inhibit *p*-NPP hydrolysis at increasing *p*-amino acid concentrations. The key findings of the present work are a strict correlation between the inhibition of *p*NPP and phosphotyrosine hydrolysis (Figures 5b and 6a), as well as the inhibition of proliferation, migration, and adhesion (Figure 7) by sodium orthovanadate. Therefore, it is likely that dephosphorylation of tyrosine residues in phosphorylated molecules in the tumor microenvironment could be involved in metastatic processes (Figure 8).

Levamisole, an alkaline phosphatase inhibitor, had no effect on ectophosphatase activity, corroborating the results showing lower ectophosphatase activity under alkaline pH conditions and ruling out the hypothesis of alkaline ecto-phosphatase activity (Dos-Santos et al., 2013).

In breast cancer (MDA-MB-231) cells, we observed that ectophosphatase activity is predominant in the extracellular environment compared to secreted phosphatase activity for *p*-NPP hydrolysis. Tartrate, a secreted phosphatase inhibitor had no effect on phosphatase activity, corroborating the previous result, which showed low secreted phosphatase activity and ruling out the notion that secreted phosphatase activity interferes with ectophosphatase activity.

The acid phosphatase inhibitors ammonium molybdate and sodium orthovanadate were able to inhibit ectophosphatase activity in a dose-dependent manner, corroborating the hypothesis that it is an acid ectophosphatase.

In addition, there are other important observations about the phosphatase, which has its catalytic site facing the extracellular medium, investigated in this study: cells were alive during the experiments, as detected by viability assays. Furthermore, the *p*-NPP hydrolysis was linear with time, and therefore, there was no evidence of cell lysis during the reaction time (Furuya et al., 1998, Fonseca-de-Souza et al., 2009).

Another factor to highlight is that sodium orthovanadate, a phosphate analog, was able to inhibit the ectophosphatase activity and the proliferation, migration, and adhesion of MDA-MB-231 cells. Sodium orthovanadate is a general inhibitor of tyrosine phosphatases and is known to have antiproliferative and antineoplastic activity and displays anticancer activities in some human cancer cell lines (Delwar et al., 2012; Jiang et al., 2018; Khalil & Jameson, 2017; Tian et al., 2016). It is important to note that vanadate can alter other orthophosphate-mediated processes because it is a potent inhibitor of cation transport P-ATPases (Cunha et al., 1992). However, vanadate is not a good inhibitor of these enzymes in intact cells because the oxidation reduction reactions that occur in the cytoplasm diminish its inhibitory effect (Dos-Santos et al., 2012; Cantley & Aisen, 1979; Martiny et al., 1996).

In human blood, Pi levels are approximately 0.7–1.55 mM, and Pi has been shown to be a key component in tumor growth (Camalier et al., 2010; Elser et al., 2007). Cancer cells present an example of a stoichiometry in which there are relationships between growth rate, RNA content (especially ribosomal RNA in biomass), and phosphorus biomass content to meet the demands of protein synthesis for accelerated proliferation (Elser et al., 2007). Pi plays a key role in

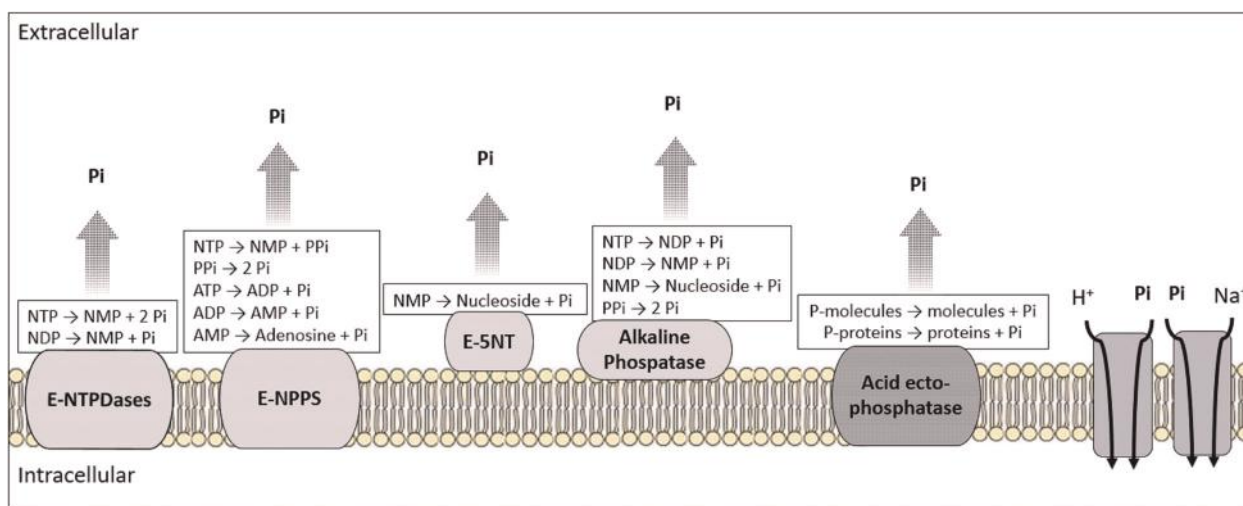


FIGURE 8 Proposed model of the role of ectoenzymes in inorganic phosphate (Pi) generation in the breast cancer tumor microenvironment. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) catalyze dephosphorylation of nucleotide triphosphate (NTP) and nucleotide diphosphate (NDP) (Zimmermann, 2000; Do Carmo-Araújo et al., 2005). phosphodiesterases/phosphodiesterases (E-NPPs) catalyze NTP dephosphorylation. In addition, NPP2 catalyzes ATP, ADP, AMP, and PPi dephosphorylation (Zimmermann, 2000; Yang et al., 2002). Ecto-5'-nucleotidase (E-5NT) catalyzes nucleotide monophosphate (NMP) dephosphorylation (Canbolat et al., 1996; Zimmermann, 2000). Alkaline phosphatase catalyzes NTP, NDP, NMP, and PPi dephosphorylation (Zimmermann, 2000; Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019; Loose et al., 1984). Acid ectophosphatase catalyzes the dephosphorylation of phosphorylated molecules (P-molecules) and phosphorylated proteins (P-proteins). The Pi released by ectonucleotidase and ectophosphatase enzymes is taken up by Pi transporters (Na⁺-dependent or H⁺-dependent) in breast cancer cells (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019; Lacerda-Abreu et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018)

energy metabolism, either by participating as a substrate in the sixth stage of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase glycolytic pathway and contributing to ATP formation or by directly participating in the ATP molecule (Kwiatkowska et al., 2016).

Recently, it has been demonstrated that two Pi transporters, a Na⁺-dependent Pi transporter (with high affinity to Pi) and a H⁺-dependent Pi transporter (with low affinity to Pi), participate in making phosphate available to breast tumor cells (Lacerda-Abreu et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018). In addition to NTPDases, NPPs, and ecto-5'-nucleotidases, acid phosphatase should be considered another important enzyme for release of Pi in the tumor microenvironment, possibly captured by Pi transporters to meet the high Pi demand required for cell proliferation, adhesion, and migration.

We observed that cell proliferation, adhesion, and migration were affected in the presence of the ectophosphatase inhibitor sodium orthovanadate. The dephosphorylation reactions catalyzed by ectophosphatases could be involved in cancer cell proliferation (Channar et al., 2018; Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019). Sodium orthovanadate could inhibit the ectophosphatase activity by inhibiting its hydrolysis capacity and Pi generation (Lacerda-Abreu & Meyer-Fernandes, 2019). Sodium orthovanadate has already been described as a protein tyrosine phosphatase inhibitor (Delwar et al., 2012; Furuya et al., 1998; Jiang et al., 2018; Khalil & Jameson, 2017; Martiny et al., 1996; Tian et al., 2016). In MDA-MB-231 cells, sodium orthovanadate might act similarly against ectophosphatase activity. However, no study has shown the molecular mechanism underlying sodium orthovanadate inhibition of ectophosphatases. These data suggest that cell adhesion and migration could be dependent on

intracellular Pi. Consequently, they could be directly associated with proteins that uptake Pi, which is consistent with the observation that ectophosphatase activity is much higher in metastatic cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Brazilian Agencies of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e (Grant Number: 401134/2014-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Grant Number: 0012017), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Grant Number: e-26/201.300/2014 to José Roberto Meyer-Fernandes). The authors would like to thank Mr. Fabiano F. Esteves, Mr. Edmilson Pereira, and Ms. Rosângela R. de Araújo for technical assistance.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

José R. Meyer-Fernandes  <http://orcid.org/0000-0003-2728-3138>

REFERENCES

- Al-Rashida, A., & Iqbal, J. (2014). Therapeutic potentials of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 34(4), 703–743. <https://doi.org/10.1002/med.21302>
- Amazonas, J. N., Cosentino-Gomes, D., Werneck-Lacerda, A., Pinheiro, A. A., Lanfredi-Rangel, A., De Souza, W., & Meyer-Fernandes, J. R. (2009).

- Giardia lamblia*: Characterization of ecto-phosphatase activities. *Experimental Parasitology*, 121(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.010>
- Biber, J., Hernando, N., & Forster. (2013). Phosphate transporters and their function. *Annual Review of Physiology*, 75, 535–550. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183748>
- Bobko, A. A., Eubank, T. D., Driesschaert, B., Dhimitruka, I., Evans, J., Mohammad, R., Tchekneva, E. E., Dikov, M. M., & Khrantsov, V. V. (2017). Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression. *Scientific Reports*, 24(7), 41233. <https://doi.org/10.1038/srep41233>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brown, R. B., & Razzaque, M. S. (2018). Phosphate toxicity and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta—Reviews on Cancer*, 1869(2), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.007>
- Buchegger, K., Ili, C., Riquelme, I., Letelier, P., Corvalán, A. H., Brebi, P., & Roa, J. C. (2016). Reprimo as a modulator of cell migration and invasion in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Biological Research*, 49(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0066-7>
- Camalier, C. E., Young, M. R., Bobe, G., Perella, C. M., Colburn, N. H., Jr., & Beck, G. R. (2010). Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis. *Cancer Prevention Research*, 3(3), 359–370. <https://doi.org/10.1158/1940-6207>
- Camici, G., Manao, G., Cappugi, G., Modesti, A., Stefani, M., & Ramponi, G. (1989). The complete amino acid sequence of the low molecular weight cytosolic acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 2560–2567.
- Canbolat, O., Durak, I., Çetin, R., Kavutcu, M., Demirci, S., & Öztürk, S. (1996). Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Research and Treatment*, 37(2), 189–193. <https://doi.org/10.1007/bf01806500>
- Cantley, L. C., Jr., & Aisen, P. (1979). The fate of cytoplasmic vanadium—Implications on (NA,K)-ATPase Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 254(6), 1781–1784.
- Channar, P. A., Afzal, S., Ejaz, S. A., Saeed, A., Larik, F. A., Mahesar, P. A., Lecka, J., Sévigny, J., Erben, M. F., & Iqbal, J. (2018). Exploration of carboxy pyrazole derivatives: Synthesis, alkaline phosphatase, nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase inhibition studies with potential anticancer profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 461–478. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.002>
- Chen, Y., Lu, B., Yang, Q., Fearn, C., Yates, J. R., & Lee, J.-D. (2009). Combined integrin phosphoproteomic analyses and small interfering RNA-based functional screening identify key regulators for cancer cell adhesion and migration. *Cancer Research*, 69(8), 3713–3720. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2515>
- Cunha, V. M. N., Meyer-Fernandes, J. R., & Noël, F. (1992). A (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase from *Schistosoma mansoni* is coupled to an active transport of calcium. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 52(2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90049-p](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90049-p)
- Delwar, Z. M., Avramidis, D., Follin, E., Hua, Y., Siden, Å., Cruz, M., Paulsson, K. M., & Yakisich, J. S. (2012). Cytotoxic effect of menadione and sodium orthovanadate in combination on human glioma cells. *Investigational New Drugs*, 30, 1302–1310. <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9680-y>
- Do-Carmo-Araújo, M., Batista Teixeira Rocha, J., Morsch, A., Zanin, R., Bauchspiess, R., Maria Morsch, V., & Rosa Chitolina Schetinger, M. (2005). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects*, 1740(3), 421–426.
- Dos-Santos, A. L. A., Dick, C. F., Alves-Bezerra, M., Silveira, T. S., Paes, L. S., Gondim, K. C., & Meyer-Fernandes, J. R. (2012). Interaction between *Trypanosoma rangeli* and the *Rhodnius prolixus* salivary gland depends on the phosphotyrosine ecto-phosphatase activity of the parasite. *International Journal for Parasitology*, 42(9), 819–827. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.05.011>
- Dos-Santos, A. L., Dick, C. F., Silveira, T. S., Fonseca-de-Souza, A. L., & Meyer-Fernandes, J. R. (2013). *Trypanosoma rangeli*: An alkaline ecto-phosphatase activity is involved with survival and growth of the parasite. *Experimental Parasitology*, 135(2), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.014>
- Dutra, P. M., Rodrigues, C. O., Jesus, J. B., Lopes, A. H., Souto-Padrón, T., & Meyer-Fernandes, J. R. (1998). A novel ecto-phosphatase activity of *Herpetomonas muscarum muscarum* inhibited by platelet-activating factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(1), 164–169. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9774>
- Elser, J. J., Kyle, M. M., Smith, M. S., & Nagy, J. D. (2007). Biological stoichiometry in human cancer. *PLoS One*, 10, e1028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001028>
- Fiske, C. H., & Subbarow, J. W. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66, 375–392.
- Fonseca-de-Souza, A. L., Dick, C. F., Santos, A. L. A., Fonseca, F. V., & Meyer-Fernandes, J. R. (2009). *Trypanosoma rangeli*: A possible role for ecto-phosphatase activity on cell proliferation. *Experimental Parasitology*, 122, 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.006>
- Fontanillo, M., & Köhn, M. (2016). Phosphatases: Their roles in cancer and their chemical modulators. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 917, 209–240. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_10
- Freitas-Mesquita, A. L., & Meyer-Fernandes, J. R. (2014). Ecto-nucleotidases e Ecto-fosfatases de parasitas de Leishmania e Trypanosoma. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma Subcellular Biochemistry*, 74, 217–252. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_10
- Furuya, T., Zhong, L., Meyer-Fernandes, J. R., Lu, H., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (1998). Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92, 339–348. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00246-6](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00246-6)
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389, 18–1150.
- Jiang, W., Li, G., Li, W., Wang, P., Xiu, P., Jiang, X., Liu, B., Sun, X., & Jiang, H. (2018). Sodium orthovanadate overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Na⁺/K⁺-ATPase activity and hypoxia-inducible pathways. *Scientific Reports*, 8(1):9706. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28010-y>
- Khalil, A. A., & Jameson, M. J. (2017). Sodium orthovanadate inhibits proliferation and triggers apoptosis in oral squamous cell carcinoma in vitro. *Biochemistry. Biokhimiia*, 82(2), 149–155. <https://doi.org/10.1134/S0006297917020067>
- Kwiatkowska, E., Wojtala, M., Gajewska, A., Soszyński, M., Bartosz, G., & Sadowska-Bartos, I. (2016). Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48, 23–32. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9637-5>
- Lacerda-Abreu, M. A., & Meyer-Fernandes, J. R. (2019). Release of inorganic phosphate into the tumor environment: Possible roles of ecto-nucleotidases and ecto-phosphatases. *Novel Approaches in Cancer Study*, 3(4), 289–293. <https://doi.org/10.31031/NACS.2019.03.000568>
- Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Cosentino-Gomes, D., Nascimento, M. C. T., Carvalho-Kelly, L. F., Gomes, T., Rodrigues, M. F., König, S., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2019). H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1865(9), 2180–2188. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2019.04.015>

- Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Monteiro, R. Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer*, 1870(2), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.05.001>
- Lin, A. M., Hershberg, R. M., & Small, E. J. (2006). Immunotherapy for prostate cancer using prostatic acid phosphatase loaded antigen presenting cells. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 24(5), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.08.010>
- Lin Y., Mckinnon K. E., Ha Jr. S. W., Beck G. R. (2014). Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXC2) regulated osteopontin expression. *Molecular Carcinogenesis*, 54, 926–934. <https://doi.org/10.1002/mc.22153>
- Loose, J. H., Damjanov, I., & Harris, H. (1984). Identity of the neoplastic alkaline phosphatase as revealed with monoclonal antibodies to the placental form of the enzyme. *American Journal of Clinical Pathology*, 82(2), 173–177. <https://doi.org/10.1093/ajcp/82.2.173>
- Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., Borges, V. M., Meyer-Fernandes, J. R., Assreuy, J., Cunha e Silva, N. L., & de Souza, W., et al. (1996). Leishmania-induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. *European Journal of Cell Biology*, 71(2), 206–215.
- Moreno-Sánchez, R., Rodrigues-Enriquez, S., Marin-Hernandes, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells, *The FEBS Journal*, 4, 1393–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>
- Nagini, S. (2017). Breast cancer: Current molecular therapeutic targets and new players. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(2), 152–163. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3), 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Quintero, I. B., Araujo, Pulkka, C. L., Wirkkala, Herrala, R. S., Eskelinen, A. M., & Vihko, P. T. (2007). Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Research*, 67(14), 6549–6554. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-1651>
- Russo-Abrahão, T., Lacerda-Abreu, M. A., Gomes, T., Cosentino-Gomes, D., Carvalho-de-Araújo, A. D., Rodrigues, M. F., Oliveira, A. C. L., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PLoS One*, 13(2), e0191270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191270>
- Santos, A. L., Souto-Pradón, T., Alviano, C. S., Lopes, A. H. C., Soares, R. M., & Meyer-Fernandes, J. R. (2002). Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405(2), 191–198. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00403-4](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00403-4)
- Sapio, L., & Naviglio, S. (2015). Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: A Janus Bifrons? *World Journal of Clinical Oncology*, 6(6), 198–201. <https://doi.org/10.5306/wjco.v6.i6.198>
- Smith, B. N., Burton, L. J., Henderson, V., Randle, D. D., Morton, D. J., Smith, B. A., Taliaferro-Smith, L., Nagappan, P., Yates, C., Zayzafoon, M., Chung, L. W. K., & Odero-Marah, V. A. (2014). Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. *PLoS One*, 8, e104987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104987>
- Tian, X., Fan, J., Hou, W., Bai, S., Ao, Q., & Tong, H. (2016). Sodium orthovanadate induces the apoptosis of SH-SY5Y cells by inhibiting PIWIL2. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 874–880. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4616>
- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., Meyer-Fernandes, J. R., & De Souza, W. (1995). Leishmanial protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *European Journal of Cell Biology*, 67, 112–119.
- Vincent, J. B., Crowder, M. W., & Averill, B. A. (1992). Hydrolysis of phosphate monoesters: A biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(3), 105–110. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90246-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90246-6)
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, G., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, 465, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
- World Health Organization. (2019). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Yang, S. Y., Lee, J., Park, C. G., Kim, S., Hong, S., Chung, H. C., Min, S. K., Han, J. W., Lee, H. W., & Lee, H. Y. (2002). Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 19(7), 603–608. <https://doi.org/10.1023/a:1020950420196>
- Zimmermann H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362, (4-5), 299–309. <http://dx.doi.org/10.1007/s002100000309>
- Zimmermann, H. (2009). Prostatic acid phosphatase, a neglected ectionucleotidase. *Purinergic Signalling*, 5(3), 273–275. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9157-z>

How to cite this article: Lacerda-Abreu MA, Russo-Abrahão T, Leite Tenório Aguiar R, Monteiro RdQ, Rumjanek FD, Meyer-Fernandes JR. Ectophosphatase activity in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cell Biol Int*. 2021;45:411–421. <https://doi.org/10.1002/cbin.11497>



Review

The Roles of Sodium-Independent Inorganic Phosphate Transporters in Inorganic Phosphate Homeostasis and in Cancer and Other Diseases

Marco Antonio Lacerda-Abreu ^{1,2}, Thais Russo-Abrahão ^{1,2}
and Jose Roberto Meyer-Fernandes ^{1,2,*}

¹ Laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-901, Brazil; marcoantoniolacerdaabreu@gmail.com (M.A.L.-A.); trusso@bioqmed.ufrj.br (T.R.-A.)

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

* Correspondence: meyer@bioqmed.ufrj.br; Tel.: +55-21-3938-6781; Fax: +55-21-2270-8647

Received: 12 November 2020; Accepted: 2 December 2020; Published: 6 December 2020



Abstract: Inorganic phosphate (Pi) is an essential nutrient for the maintenance of cells. In healthy mammals, extracellular Pi is maintained within a narrow concentration range of 0.70 to 1.55 mM. Mammalian cells depend on Na⁺/Pi cotransporters for Pi absorption, which have been well studied. However, a new type of sodium-independent Pi transporter has been identified. This transporter assists in the absorption of Pi by intestinal cells and renal proximal tubule cells and in the reabsorption of Pi by osteoclasts and capillaries of the blood–brain barrier (BBB). Hyperphosphatemia is a risk factor for mineral deposition, the development of diseases such as osteoarthritis, and vascular calcifications (VCs). Na⁺-independent Pi transporters have been identified and biochemically characterized in vascular smooth muscle cells (VSMCs), chondrocytes, and matrix vesicles, and their involvement in mineral deposition in the extracellular microenvironment has been suggested. According to the growth rate hypothesis, cancer cells require more phosphate than healthy cells due to their rapid growth rates. Recently, it was demonstrated that breast cancer cells (MDA-MB-231) respond to high Pi concentration (2 mM) by decreasing Na⁺-dependent Pi transport activity concomitant with an increase in Na⁺-independent (H⁺-dependent) Pi transport. This Pi H⁺-dependent transport has a fundamental role in the proliferation and migratory capacity of MDA-MB-231 cells. The purpose of this review is to discuss experimental findings regarding Na⁺-independent inorganic phosphate transporters and summarize their roles in Pi homeostasis, cancers and other diseases, such as osteoarthritis, and in processes such as VC.

Keywords: inorganic phosphate; sodium-independent Pi transport; inorganic phosphate homeostasis; cancer

1. Introduction

Inorganic phosphate (Pi) is an essential nutrient for the formation of ATP skeletal mineralization and the constituents of DNA, RNA, phospholipids and a variety of phosphorylated metabolic intermediates [1,2]. Due to the ability of Pi to donate H⁺ through OH⁻ groups, it contributes to the buffer system in the blood (pH 7.4), modulating the ratio of monovalent to bivalent phosphate based on pH [3].

Pi absorption is possible due to transporter-mediated translocation across cell membranes. Pi absorption through Na⁺/Pi cotransporters has been established in mammalian cells. These cotransporters constitute two large families of inorganic phosphate transporters:

SLC20 and SLC34 [4,5]. The SLC20 family comprises two members, i.e., PiT-1 (encoded by SLC20A1) and PiT-2 (encoded by SLC20A2), both of which are sodium–phosphate cotransporters that preferably carry monovalent inorganic phosphate (H_2PO_4^-) together with two sodium ions. These transporters are expressed almost exclusively in the kidney [4,5].

The SLC34 family contains three members, namely NaPi-IIa (SLC34A1), NaPi-IIb (SLC34A2) and NaPi-IIc (SLC34A3), all of which are sodium–phosphate cotransporters; however, they vary in their biochemical kinetics. These proteins transport divalent inorganic phosphate (HPO_4^{2-}) together with two or three sodium ions [5,6]. A Na^+ -dependent Pi transporter family (NaPi-I, NPTI) also exists, though it also carries anions other than Pi. NPTI is predominantly expressed in the proximal brush border tubular membrane and acts more as an intrinsic Pi transport modulator than as a Na^+ /Pi cotransporter [7,8].

Although Pi Na^+ -dependent transporters have been investigated in detail, another class of sodium-independent Pi transporters has been identified in intestinal [9] and renal cells [10], osteoclasts [11], chondrocytes [12], endothelial cells [13], blood–brain barrier (BBB) capillaries [14] and tumor cells [15]. Studies have reported the kinetic component as being Na^+ -independent with a Pi transporter, not as a nonspecific Pi transport, showing that it is not merely a consequence of increased diffusion. This transport exhibits specific characteristics of saturation, pH dependence and inhibition, and along with sodium-dependent Pi, plays a significant role in Pi homeostasis.

In healthy mammals, extracellular Pi is maintained within a narrow range of concentrations: between 0.70 and 1.55 mM [16,17]. Phosphate metabolism in the body involves complex interactions among several factors that can affect the digestion, absorption, distribution and excretion of this element, maintaining Pi homeostasis [8]. In this work, we review the mechanisms of Na^+ -independent phosphate transporters present in some tissues and discuss their possible roles in the regulation of Pi homeostasis and the development of some diseases.

2. Na^+ -Independent P_i Transport System for P_i Homeostasis

2.1. Pi Transport System in Intestinal Pi Absorption

The physiological luminal phosphate concentrations in the human jejunum range from 0.7 to 12.7 mM, depending on the food type ingested [18]. However, it has been demonstrated that phosphate uptake is critically dependent on sodium, which has an affinity for phosphate of ~ 0.1 mmol/L and is responsible for only 50% of transepithelial phosphate transport across the small intestine. The remaining 50% of transepithelial phosphate transport is Na^+ -independent (Figure 1) [19].

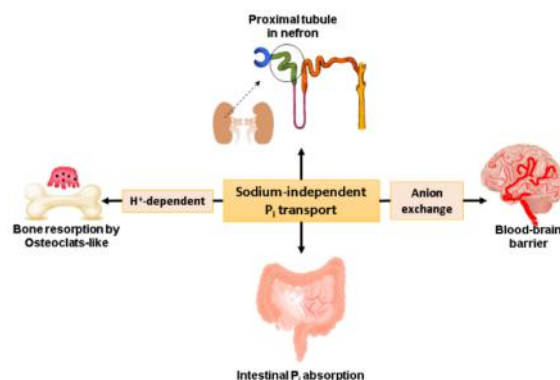


Figure 1. Schematic representation of the roles of sodium-independent Pi transport in Pi homeostasis. Na^+ -independent Pi transport facilitates the absorption of Pi in intestinal cells [9,19] and proximal tubule cells [10] and the reabsorption of Pi in bone by osteoclast-like cells derived from RAW264.7 cells (H^+ -dependent Pi transport) [11] and in capillaries of the blood–brain barrier (BBB) (anion exchange) [14].

A study using the human cell line Caco2BBE as a model of intestinal cells was performed to biochemically characterize the transport of Pi of cells grown at 1 mM Pi (control condition) or 4 mM Pi, the latter representing the high concentration of Pi in the intestinal lumen [9]. The cells in all conditions exhibited Na⁺-independent Pi transport, suggesting that type II and III Pi transporters are not involved. At 1 mM Pi, Na⁺-independent Pi transport was proton-activated, as evidenced by its inhibition by two proton ionophores (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone-FCCP and Carbonyl cyanide- m-chlorophenyl hydrazine-CCCP) [9]. In addition, increased Pi uptake was observed to be insensitive to FCCP and CCCP at 4 mM Pi (Table 1) [9].

Table 1. Kinetic parameters of sodium-independent Pi transport in mammalian cells.

Cell Type or Tissue	Pi Transport	Affinity	K _m (mM Pi)	V _{max}	Ref
Intestinal Caco2BBE cells at 1 mM Pi	Na ⁺ -independent proton-activated	High *	0.071 ± 0.020	0.073 ± 0.017 nmol Pi·mg cell protein ⁻¹ ·min ⁻¹	[9]
Intestinal Caco2BBE cells at 4 mM Pi	Na ⁺ -independent	High *	0.155 ± 0.025	0.849 ± 0.11 nmol Pi·mg cell protein ⁻¹ ·min ⁻¹	[9]
Vascular smooth muscle cells	Na ⁺ -independent	High	0.10 ± 0.04	180.7 ± 32.8 pmol/mg protein ⁻¹ ·min ⁻¹	[13]
Chondrocytes from articular cartilage	Na ⁺ -independent	High	0.22 ± 0.07	0.50 ± 0.005 mmol (L cells) ⁻¹ (10 min) ⁻¹	[12]
Matrix vesicles from articular cartilage	Na ⁺ -independent	High	0.16 ± 0.04	0.67 ± 0.04 nmoles (mg protein) ⁻¹ (min) ⁻¹	[20]
Osteoclast-like cells	H ⁺ -dependent	High	0.35	~15 nmol/mg/10 min	[11]
	H ⁺ -dependent	Low	7.5	~55 nmol/mg/10 min	[11]
Capillaries of the blood-brain barrier	Anion exchanger	High	0.16	0.37 nmol/mg protein/30 s	[14]
Renal basolateral membranes	Na ⁺ -independent	Low	10.1 ± 1.2	13.6 ± 2.0 nmol (mg protein) ⁻¹ min ⁻¹	[10]
Breast cancer cells MDA-MB-231	H ⁺ -dependent	Low	1.387 ± 0.1674	198.6 ± 10.23 Pi × h ⁻¹ × mg protein ⁻¹	[15]

* The affinity was not defined by the authors; however, comparing with other K_m values in this table, we suggest that these transporters have high-affinity parameters.

Candéal et al. attempted to identify potential transporters involved in Na⁺-independent Pi transport in several models by analyzing either RNA expression differences between cells maintained at 1 or 4 mM Pi or the siRNA-induced downregulation of specific transporters. None of these approaches were successful, but they helped to eliminate SLC26, SLC20, SLC17 and SLC34 family members as possible candidates [9].

In other animal models, Na⁺-independent Pi transport has been studied; however, no conclusions about sodium-independent Pi transporters have been possible, although much speculation has been offered. In intestinal brush border membrane vesicles (BBMVVs) prepared from rat jejunum, the Na⁺-independent, diffusional component of intestinal Pi transport represents approximately 40–50% of the total uptake [21]. This component is significantly higher in the rat ileum than in the rat jejunum. Intestinal Pi transport occurs by both a sodium-independent, unsaturated process and an active, sodium-dependent component of phosphate absorption, mainly in the duodenum and jejunum [21].

The relative contributions of Na⁺-dependent and Na⁺-independent phosphate transport along the rat intestine have been characterized using duodenal, jejunal and ileal regions of the small intestine and proximal and distal colon. These contributions suggest that transepithelial phosphate absorption in vivo is predominately Na⁺-independent, with Na⁺-dependent (presumably NaPi-IIb-mediated) transport playing a lesser role than currently thought [22]. The authors responsible for these findings discussed two possibilities regarding sodium-independent Pi transport: (1) some tight junction proteins, such as claudin, might function as channels that provide a selective paracellular route for passive ion flow. Apparently, it plays a role in the absorption of calcium in the small intestine, but paracellular phosphate transport has not been investigated [22,23]. (2) A yet-to-be identified pathway for Na⁺-independent phosphate transport may exist [22].

Another research group studying the small intestine of rats found substantial sodium-independent Pi uptake. The authors responsible for this finding argue that at least some of this sodium-independent Pi transport could be explained by the activity of PiT-2, as this transporter is still capable of functioning in the absence of sodium, although with minimal activity [24]; however, this hypothesis has not yet been tested.

Some studies of ruminant intestines have shown the additional participation of Pi Na⁺-independent transporters in Pi absorption [25]. Shirazi-Beechey et al. showed the existence of H⁺- rather than Na⁺-coupling for Pi transport in the ruminant intestine [26]. This finding was achieved by the use of compounds that are capable of dissipating the imposed H⁺ gradient (4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazole, TTFB) and inhibiting the uptake of phosphate into ovine duodenal brush-border membrane vesicles. The pH at the site of Pi transport in the ovine intestine is 3 to 4. At this pH range, the majority (98%) of the orthophosphate is in the monovalent form, suggesting that the species to be transported is H₂PO₄ [26]. In goats, it was demonstrated that two different transport systems mediate intestinal Pi transport. In goat duodenum, an H⁺-dependent and Na⁺-sensitive Pi transport system was identified that does not belong to the NaPi type II family. In contrast, in the goat jejunum, Na⁺-dependent, H⁺-sensitive Pi transport is mainly mediated by NaPi-IIb [27].

2.2. Bone Resorption and Pi Transport Coupled to the Proton Gradient

The skeleton is continually changing in its mass or form via the activities of osteoblasts (the cells responsible for bone formation) and osteoclasts (the cells responsible for bone resorption) [28]. Bone resorption depends on the ability of osteoclasts to generate extracellular acid compartments containing vacuolar-type H⁺-adenosine triphosphatase (V-type ATPase), which degrades hydroxyapatite ([Ca₃(PO₄)₂]3Ca(OH)₂) into Ca⁺, water and phosphate [28].

Researchers have characterized Pi transport in osteoclast-like cells derived from RAW264.7 cells after treatment with receptor activator of NF-κB ligand (RANKL). Osteoclast cell differentiation was confirmed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and calcitonin receptor (CTR) staining. The addition of K₂HPO₄ induced a slight decrease in intracellular pH. The results suggested that H⁺ flowed into osteoclast-like cells along with Pi. The osteoclast-like cells that were exposed to bone particles showed an increase in H⁺-dependent Pi transport [11]. One possible explanation for these findings is that HCl secretion by osteoclasts produces Ca²⁺, water and phosphate from the CaPO₄ salt hydroxyapatite. Osteoclast-like cells with a Pi transport system capable of H⁺-dependent stimulation at acidic pH are necessary for bone resorption or production of the massive amounts of energy required by V-type ATPase for acidification of the extracellular environment [11].

2.3. The Pi Transport System in Proximal Renal Tubule

In the kidney, a considerable number of functional nephrons play a significant role in Pi homeostasis, where 75% of the filtered Pi is reabsorbed in the proximal tubule; in the distal tubule, only 10% is reabsorbed, and the remaining 15% is lost in the urine [29]. The proximal tubule is an intensively active region because two-thirds of the glomerular filtrate is reabsorbed as ions, water and other molecules

within the lumen of the proximal tubule by brush-border membrane microvilli (BBM). The molecules absorbed by the BBM pass into the blood plasma through the cells of the basolateral membrane (BLM) of the proximal tubule [30].

The electrochemical potential of sodium across the BBM provides the driving force for intracellular phosphate accumulation [31]. In renal membranes from the rat kidney cortex, a sodium-phosphate cotransport system localized in the BBM and sodium-independent Pi transport through the BLM have been demonstrated [32].

Phosphate is taken up by the BBM by a sodium–phosphate cotransporter (usually as $2\text{Na}^+ - \text{HPO}_4^{-2}$), which has a high affinity for Pi (0.1–0.2 mM) and concentrates phosphate in the cytosol [32]. It is speculated that phosphate exits across the BLM by moving down an electrical gradient; as the cytosolic free phosphate concentration is approximately 1.0 mM and the plasma Pi concentration is 2.5–3.0 mM, the transmembrane voltage plays an essential role in BLM transport [10]. Azzarolo et al. analyzed BLM vesicles isolated from porcine kidneys and demonstrated that Pi transfer across the cytoplasm at the basolateral cell side is facilitated by a form of sodium-independent phosphate transport that is specific for phosphate with low affinity (Figure 1 and Table 1) [10].

2.4. Pi Uptake by Capillaries of the Blood–Brain Barrier

The BBB restricts the free diffusion of nutrients, hormones and pharmaceuticals between the blood and brain in either the blood-to-brain direction or the brain-to-blood direction [33]. The capillaries of the brain are formed by a specialized endothelium, the function of which is to regulate the movement of solutes between the blood and brain. The concentration of inorganic phosphate in the interstitial fluid of the brain is maintained between 0.5 and 1.0 mM [14].

In bovine brain capillaries, Pi transport is a high-affinity process not regulated by sodium and is not coupled to cations for the translocation of phosphate across capillary membranes. The uptake of phosphate in the capillaries of the BBB reflects transport via a high-affinity system (Table 1) [14].

In addition, Pi uptake has been found to be sensitive to inhibition by arsenate and phosphonoformic acid (PFA). Phosphate transport by isolated capillaries was found to be partially inhibited by inhibitors of anion exchangers, DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate), SITS (4-acetamido-4-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate), and competitively inhibited by low concentrations of various anions, pyruvate, acetate, citrate, glutamate and sulfate, which are subsequently metabolized by the cell in the Krebs cycle to produce ATP [14]. No correlation was shown suggesting the contribution of NaPi-I to Pi transport/anion exchange. Together with these results, Na^+ -independent Pi transport is concluded to be an anion exchanger (Figure 1). Such transport would provide phosphate ions to the cell to supply energy demands and phosphorylation processes and help maintain a low concentration of inorganic phosphate in the brain interstitial fluid [14].

For the same group, it was examined whether BBB phosphate transport is influenced by hormonal and nonhormonal stimuli. Three distinct pathways involving various receptors and second messengers were identified, wherein (1) the stimulation of adenylate cyclase decreases Pi transport, (2) the activation of phospholipase C stimulates Pi transport and (3) the stimulation of tyrosine kinases reduces Pi uptake [34].

3. High Phosphate and Pi Transport Mechanisms and Cancer Promotion

3.1. Extracellular Pi and Tumorigenesis

In 2007, Pi was shown to be a limiting factor for biological growth; it is a limiting factor mainly because it is one of the fundamental elements necessary for the synthesis of nucleic acids, such as DNA and RNA [35]. Elser et al. published a mathematical calculation based on the growth rate hypothesis (GRH), which predicts a three-quarter reduction in tumor size if the patient halves phosphate intake [35].

Because Pi is an essential nutrient for energy metabolism and because high levels of Pi promote signaling aberrations in tumor cells, much research has focused on the association between

hyperphosphatemia and cancer development [17,36]. A clinical study by Papaloucas et al. showed that patients diagnosed with head, neck, lung and cervical cancer had a high serum Pi concentration of $2.52 (\pm 0.72)$, a concentration twice as high as that in healthy patients without cancer: $1.09 (\pm 0.19)$ mM [37]. However, the authors of that study did not clarify whether the increase in serum phosphate was a cause or consequence of the disease [37].

Similar to cytokines and various growth factors, phosphate can induce the growth of cancer cells through various growth-promoting signals [37]. In skin cancer cells (JB6), high concentrations of Pi (3 mM Pi) have been found to promote cell transformation and stimulate cell proliferation by activating the N-Ras signaling pathway ERK1/2 [16]. However, by adding an inhibitor of Pi transport (PFA or foscarnet), activation of the N-Ras pathway was blocked at high Pi concentrations. In a mouse model of tumorigenesis induced by a highly carcinogenic chemical agent (7,12-dimethylbenz (a) anthracene-12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate), administration of a high-Pi diet (3.25 ± 0.58 mM Pi) versus a normal-Pi diet (2.17 ± 0.19 mM Pi) accelerated the induction of papilloma formation [16].

In a mouse model of lung cancer induced by K-rasLA1 mutation, researchers observed that the incidence of lung tumors and tumor diameter were larger in mice fed a high (1.0%)-Pi diet for four months than in those fed a normal (0.5%)-Pi diet for four months [38]. In addition, the same group found that an excessive-Pi diet or Pi restriction can decrease the expression of phosphatase and tensin homologue (PTEN), activate the Akt pathway and increase the expression of the NaPi-IIb transporter at high Pi [39].

3.2. Na^+ -Independent Pi Transport Mechanisms in Breast Cancer

In some studies of breast cancer, a role of the sodium-dependent Pi transporter (NaPi-IIb) in tumorigenesis has been proposed [40–42]. Russo-Abrahão et al. reported higher Na^+ -dependent Pi transport in MDA-MB-231 cells than in other types of breast cancer cells (MCF-7 and T47-D) [42]. In addition, Na^+ -dependent Pi transport presented Michaelis–Menten kinetics ($K_m = 0.08$ mM; high affinity) [42].

Because the serum Pi range reaches up to 1.2 mM [37], one year later, it was demonstrated that there is another manifestation of Michaelis–Menten kinetics of $K_m = 1.38 \pm 0.16$ mM, indicating low-affinity Pi transport acting in a sodium-independent manner [15]. In addition to the lack of dependence of sodium, H^+ -dependent Pi transport stimulated by acidic conditions was verified, suggesting that protons present in the extracellular environment might be transported together with inorganic phosphate by an H^+ -dependent Pi cotransporter [15]. Consistent with these observations, FCCP (an H^+ ionophore), bafilomycin A1 (an inhibitor of vacuolar H^+ -ATPase) and SCH28080 (an H^+ , K^+ -ATPase inhibitor), which deregulate the intracellular levels of protons, inhibited H^+ -dependent Pi transport. Notably, no effect was observed when anions and anion-carrier inhibitors (DIDS) were tested [15].

Recently, in mammary gland tumors of mice, an acidic region and a high concentration of Pi in the tumor microenvironment (1.8 ± 0.2 mM) compared to that in normal mammary gland (0.84 ± 0.07 mM) were identified as markers of tumor progression [43]. Decreased Na^+ -dependent Pi transport and NaPi-IIb expression in the presence of 2 mM Pi were observed, concomitant with an increase in H^+ -dependent Pi transport [15]. These observations led the researchers involved to suggest the occurrence of a compensatory mechanism for Pi transport in situations where the transport of Na^+ -dependent Pi is compromised [15]. The excess Pi might be able to compensate for the energetically expensive biochemical features of tumor cells. The H^+ -dependent Pi transporter could confer on tumors a biological advantage by endowing cells with the ability to incorporate extra Pi even when sodium-dependent Pi transport is saturated by high extracellular Pi in the tumor microenvironment (approx. 2 mM) [15].

3.3. Na^+ -Independent Pi Transport and Metastasis

Based on the growth rate hypothesis, it has been hypothesized that metastasis establishes and forms secondary tumors at organs with higher Pi content than that of the organ containing the original tumor [44]. Lin et al. sought to evaluate the effects of elevated Pi on metastasis and angiogenesis in lung cancer cells (A549) and breast cancer cells (MDA-MB-231). They observed that elevated Pi enhanced cell migration and the expression of angiogenic markers such as VEGF, osteopontin and “Forkhead box protein C2”, a transcription factor related to vasculogenesis and angiogenesis [45].

In a study of breast cancer, a sodium-dependent Pi transport inhibitor (PFA) was found to yield an approximately 50% inhibition of cell adhesion and migration, suggesting the participation of this Pi transporter in cellular motility processes [42]. Recently, Lacerda-Abreu et al. demonstrated the inhibition of the Pi H^+ -dependent transporter by phosphonoacetic acid (PPA), which is able to inhibit cell adhesion and migration by approximately 40% [15].

In fact, these two studies show that the two Pi transporters are important for metastatic processes; however, the biochemical behavior of these transporters differs, and when the Pi concentration in the tumor microenvironment changes, the roles of these Pi transporters in tumor processes might change as well (Figure 2). For example, Lacerda-Abreu et al. used cells that migrated through the Transwell membrane for their Pi transport assays. The migrating cells displayed higher H^+ -dependent Pi transport activity than nonmigrating cells. In contrast, there was no difference between these two conditions when Pi transport activity was measured at 100 μM Pi, a suitable condition for high-affinity Na^+ -dependent Pi transporters [15].

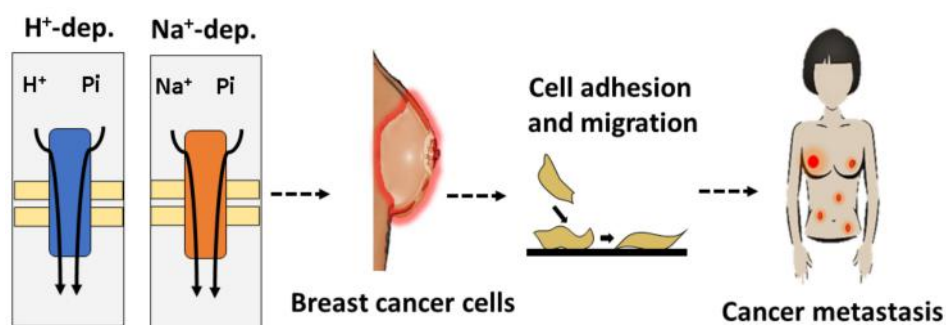


Figure 2. Schematic of the role of sodium-independent Pi transport in the development of breast cancer. Na^+ -independent Pi transport and Na^+ -dependent Pi transport in breast cancer cells promote cell adhesion and migration, which are important for maintaining cancer metastasis [15,42].

The migration cascade and metastatic invasion are regulated by a multistage process called the epithelial–mesenchymal transition (EMT), in which transformed epithelial cells acquire mesenchymal characteristics, including motility and invasiveness [46]. During EMT, epithelial cells lose epithelial markers (E-cadherin, occludin and cytokeratins) and begin to express mesenchymal markers (vimentin and fibronectin) [46]. Triple-negative breast cancer cells, such as MDA-MB-231 cells, have an EMT morphology (presenting low expression of E-cadherin and high expression of vimentin) and a greater invasive capacity than luminal breast cancer cells (MCF7 and T47-D cells) [15,46]. MDA-MB-231 cells grown in the presence of phosphonoacetic acid (PAA) for 24 h present induced expression of E-cadherin. These observations strongly suggest that when H^+ -dependent Pi transport is inhibited, MDA-MB-231 cells could revert from a mesenchymal phenotype to an epithelial phenotype and consequently exhibit low migratory capacity [15].

3.4. Pi Transport Stimulated by $[\text{H}^+]$ in Ehrlich Ascites Tumor Cells

In Ehrlich ascites tumor cells, Na^+ -dependent Pi transport plays a principal role in the maintenance of intracellular Pi concentration. However, a Na^+ -independent component of Pi transport comprises

approximately 12% of the total Pi flux [47]. Therefore, Na⁺-dependent and Na⁺-independent Pi transport processes appear to involve, at least functionally, different transporters.

Furthermore, H⁺-stimulated Na⁺-independent Pi transport with saturation kinetics with respect to [H⁺] has been observed. Additionally, it appears that the stimulation of Pi Na⁺-independent transport by H⁺ decreases the intracellular pH (below approximately 6.5), which affects the inhibition of Pi Na⁺-dependent transport, consistent with the interaction of H⁺ with an intracellular site that regulates Na⁺-dependent Pi transport [47].

4. Disease Development Related to Hyperphosphatemia and Hypercalcemia

In general, Pi homeostasis and the regulation of renal and intestinal Pi transport are crucial for the normal functioning of human organs. For example, when the renal and intestinal transport of Pi is compromised, hypophosphatemia is promoted, which leads to the dysfunction of several organ systems, including the musculoskeletal system. On the other hand, the dysregulation of the renal and intestinal transport of Pi can also result in hyperphosphatemia, leading to impaired cardiovascular function and soft tissue calcification [5].

Hyperphosphatemia is defined as a serum phosphorus concentration >4.5 mg/dL (1.45 mM). It is a major cause of morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease (CKD) and can also be a cause of acute kidney injury (AKI). A decline in renal function leads to phosphate retention, high levels of parathyroid hormone (PTH) and low levels of 1,25-dihydroxy vitamin D [48]. The most common clinical manifestation of hyperphosphatemia is hypocalcemia due to the precipitation of calcium phosphate in soft tissue, which can lead to clinical manifestations of hypocalcemia [7].

4.1. Vascular Smooth Muscle Calcification

Vascular calcifications (VCs) are actively regulated biological processes that involve cellular ossification and the participation of factors that either promote or inhibit the organized deposition of hydroxyapatite in vascular smoothing [49]. Susceptibility to VC is genetically determined and actively regulated by many factors. One of these factors is hyperphosphatemia, which promotes VC and is a nontraditional risk factor for cardiovascular disease mortality in end-stage renal disease patients [50].

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) in rats were kinetically characterized for phosphate transport. VSMCs exhibit both Na⁺-dependent and Na⁺-independent Pi transport components with similar kinetic behavior and high affinity (Table 1). Both components contribute almost equally to the total uptake of Pi by VSMCs. These kinetic characteristics are very relevant to VC as they are associated with increasing levels of serum phosphate due to hyperphosphatemia, consistent with the theory that Pi influx works as an exact sensor of calcifying conditions (Figure 3) [13].

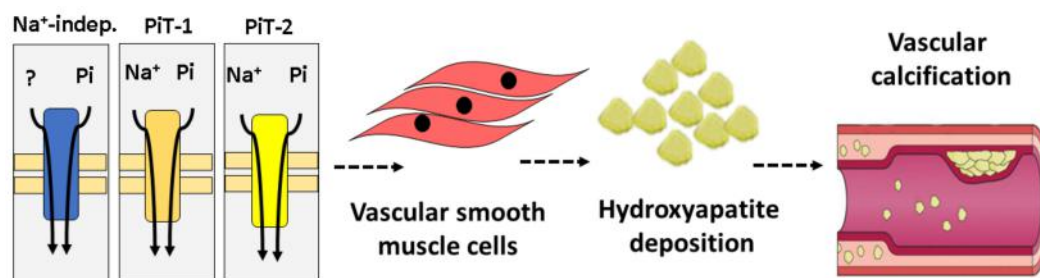


Figure 3. Schematic of the role of sodium-independent Pi transport in the development of vascular calcification (VC). Na⁺-independent and Na⁺-dependent Pi transport (PiT-1 and PiT-2) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) contributes to hydroxyapatite deposition in these cells [13,51].

A study of Pi transport in rat VSMCs revealed that the sodium-independent Pi uptake system is competitively inhibited by sulfate, bicarbonate and arsenate and weakly inhibited by DIDS, SITS and phosphonoformate. These findings indicated that the Pi transport system is most likely

coupled to the exit of anions [51]. In addition, an exit pathway from the cell that is partially chloride-dependent and unrelated to the known anion exchangers expressed in VSMCs has been shown to be resistant to DIDS/SITS [51].

To clarify which transporter is responsible for sodium-independent Pi transport, several genes were silenced (SLC4a2, SLC4a3, SLC4a7, SLC26a2, SLC26a6, SLC26a8, SLC26a10 and SLC26a11) using siRNA transfections. None of the interfering transporters were found responsible for a significant part of the sodium-independent influx or efflux of Pi in VSMCs [51].

4.2. Crystal Formation in Articular Cartilage and Osteoarthritis Development

Many joint diseases, such as osteoarthritis, are characterized by the eventual destruction of the articular cartilage. Some arthritic conditions are associated with the deposition of crystals, such as hydroxyapatite crystals, in the synovial fluid of articular cartilage of the joint. These crystalline materials include calcium pyrophosphate dihydrate and other forms of calcium phosphate [52]. Calcium and inorganic phosphate are taken up by matrix vesicles (MVs) derived from chondrocytes to form hydroxyapatite crystals, which propagate on collagen fibrils to mineralize the extracellular matrix [53].

Although previous studies of phosphate transport in articular chondrocytes have described high-affinity Pi transport mediated by a PiT system [54], inorganic phosphate transport has been identified in bovine articular chondrocytes, and it appears that high-affinity Na⁺-independent processes contribute to Pi uptake [12]. Regarding Pi transporter inhibitors, PAA and arsenate exhibit low affinities for the Na⁺-dependent component, but markedly higher affinities for the Na⁺-independent component (Table 1) [12]. In addition to chondrocytes, which uptake Pi and Ca²⁺, matrix vesicles have Pi and Ca²⁺ transporters [20]. Solomon et al. characterized the Pi transporters in matrix vesicles (Table 1) [20].

Solomon et al. detected not only high-affinity Pi Na⁺-dependent transport, but also high-affinity Na⁺-independent Pi transport [20]. They proposed that Pi transport systems in chondrocytes or matrix vesicles could contribute to the deposition of minerals in cartilage, thus promoting degenerative joint disorders such as osteoarthritis. Hence, the pathways identified here constitute potential targets for pharmacological intervention to prevent crystal formation and osteoarthritis (Figure 4) [12,20].

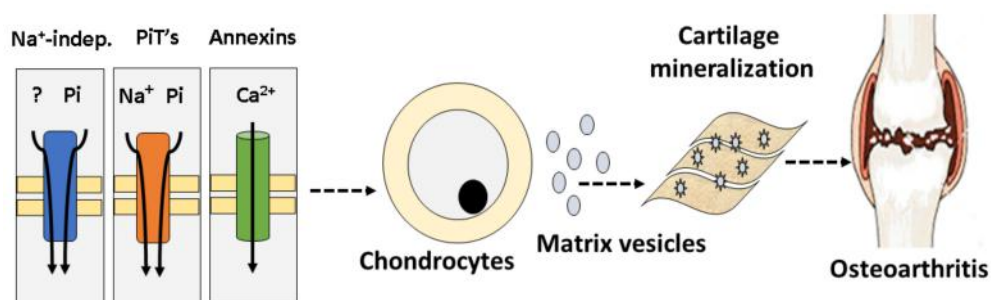


Figure 4. Schematic of the role of sodium-independent Pi transport in the development of osteoarthritis. Na⁺-independent and Na⁺-dependent Pi transport (PiT-1 and PiT-2) and annexins (Ca²⁺ channels) in chondrocytes or matrix vesicles promote cartilage mineralization and consequently osteoarthritis [12,20].

5. Conclusions

Pi is essential for many, if not all, living organisms because of its roles in several biochemical processes, such as kinase/phosphatase signaling; ATP formation; and lipid, carbohydrate and nucleic acid biosynthesis. Although the importance of sodium-dependent Pi transporters (NaPi type II and NaPi type III) in different tissues and their physiological functions have been demonstrated, an increasing number of studies have reported the presence of another kind of sodium-independent Pi transporter that aids in Pi absorption in intestinal cells and proximal tubule cells as well as reabsorption of Pi by osteoclasts in bone and by capillaries of the BBB.

Sodium-independent Pi transporters also contribute to the accumulation of Pi and other minerals in cartilage and vascular smooth muscles, causing osteoarthritis and VC, respectively. Additionally, Pi is absorbed by a sodium-independent Pi transporter (H⁺-dependent) in breast cancer cells, which enhances the migration and adhesion processes that lead to the development of metastases. The studies included in this review have improved our understanding of Pi homeostasis and have clarified the development of Pi-related diseases.

Author Contributions: Conceptualization and original draft preparation, M.A.L.-A. and J.R.M.-F.; review and editing, M.A.L.-A., T.R.-A. and J.R.M.-F.; funding, M.A.L.-A. and J.R.M.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Brazilian Agencies of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq—Grant Number: 401134/2014–8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—Grant Number: 0012017) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ- Grant Number: e-26/201.300/2014 to JRM-F).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sapio, L.; Naviglio, S. Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: A Janus Bifrons? *World J. Clin. Oncol.* **2015**, *6*, 198–201. [[CrossRef](#)]
2. Takeda, E.; Taketani, Y.; Morita, K.; Tatsumi, S.; Katai, K.; Nii, T.; Yamamoto, H.; Miyamoto, K.-I. Molecular mechanisms of mammalian inorganic phosphate homeostasis. *Adv. Enzym. Regul.* **2000**, *40*, 285–302. [[CrossRef](#)]
3. Iheagwara, O.S.; Ing, T.S.; Kjellstrand, C.M.; Lew, S.Q. Phosphorus, phosphorous, and phosphate. *Hemodial. Int.* **2012**, *17*, 479–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Forster, I.C.; Hernando, N.; Biber, J.; Murer, H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol. Asp. Med.* **2013**, *34*, 386–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Levi, M.; Gratton, E.; Forster, I.C.; Hernando, N.; Wagner, C.A.; Biber, J.; Sorribas, V.; Murer, H. Mechanisms of phosphate transport. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 482–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wagner, C.A.; Hernando, N.; Forster, I.C.; Biber, J. The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters. *Eur. J. Physiol.* **2013**, *466*, 139–153. [[CrossRef](#)]
7. Christov, M.; Jüppner, H. Phosphate homeostasis disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *32*, 685–706. [[CrossRef](#)]
8. Jacquillet, G.; Unwin, R. Physiological regulation of phosphate by vitamin D, parathyroid hormone (PTH) and phosphate (Pi). *Pflügers Archiv* **2019**, *471*, 83–98. [[CrossRef](#)]
9. Candéal, E.; Caldas, Y.A.; Guillén, N.; Levi, M.; Sorribas, V. Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2014**, *307*, C1113–C1122. [[CrossRef](#)]
10. Azzarolo, A.M.; Ritchie, G.; Quamme, G.A. Some characteristics of sodium-independent phosphate transport across renal basolateral membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1991**, *1064*, 229–234. [[CrossRef](#)]
11. Ito, M.; Matsuka, N.; Izuka, M.; Haito, S.; Sakai, Y.; Nakamura, R.; Segawa, H.; Kuwahata, M.; Yamamoto, H.; Pike, W.J.; et al. Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast-like cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2005**, *288*, C921–C931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Solomon, D.H.; Wilkins, R.J.; Meredith, D.; Browning, J.A. Characterisation of inorganic phosphate transport in bovine articular chondrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **2007**, *20*, 099–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Villa-Bellosta, R.; Bogaert, Y.E.; Levi, M.; Sorribas, V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1030–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dallaire, L.; Béliveau, R. Phosphate transport by capillaries of the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22323–22327.
15. Lacerda-Abreu, M.A.; Russo-Abrahão, T.; Cosentino-Gomes, D.; Nascimento, M.T.C.; Carvalho-Kelly, L.F.; Gomes, T.; Rodrigues, M.F.; König, S.; Rumjanek, F.D.; Monteiro, R.Q.; et al. H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 2180–2188. [[CrossRef](#)]
16. Camalier, C.E.; Young, M.R.; Bobe, G.; Perella, C.M.; Colburn, N.H.; Beck, G.R. Elevated phosphate activates N-ras and promotes cell transformation and skin tumorigenesis. *Cancer Prev. Res.* **2010**, *3*, 359–370. [[CrossRef](#)]

17. Lacerda-Abreu, M.A.; Russo-Abrahão, T.; Monteiro, R.D.Q.; Rumjanek, F.D.; Meyer-Fernandes, J.R. Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2018**, *1870*, 291–298. [[CrossRef](#)]
18. Davis, G.R.; Zerwekh, J.E.; Parker, T.F.; Krejs, G.J.; Pak, C.; Fordtran, J.S. Absorption of phosphate in the jejunum of patients with chronic renal failure before and after correction of vitamin D deficiency. *Gastroenterology* **1983**, *85*, 908–916. [[CrossRef](#)]
19. Lee, G.J.; Marks, J. Intestinal phosphate transport: A therapeutic target in chronic kidney disease and beyond? *Pediatr. Nephrol.* **2014**, *30*, 363–371. [[CrossRef](#)]
20. Solomon, D.H.; Browning, J.; Wilkins, R.J. Inorganic phosphate transport in matrix vesicles from bovine articular cartilage. *Acta Physiol.* **2007**, *190*, 119–125. [[CrossRef](#)]
21. Katai, K.; Tanaka, H.; Tatsumi, S.; Fukunaga, Y.; Genjida, K.; Morita, K.; Kuboyama, N.; Suzuki, T.; Akiba, T.; Miyamoto, K.; et al. Nicotinamide inhibits sodium-dependent phosphate cotransport activity in rat small intestine. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1999**, *14*, 1195–1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Marks, J.; Lee, G.J.; Nadaraja, S.P.; Debnam, E.S.; Unwin, R.J. Experimental and regional variations in Na⁺-dependent and Na⁺-independent phosphate transport along the rat small intestine and colon. *Physiol. Rep.* **2015**, *3*, e12281. [[CrossRef](#)]
23. Fujita, H.; Sugimoto, K.; Inatomi, S.; Maeda, T.; Osanai, M.; Uchiyama, Y.; Yamamoto, Y.; Wada, T.; Kojima, T.; Yokozaki, H.; et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 1912–1921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Candeal, E.; Caldas, Y.A.; Guillén, N.; Levi, M.; Sorribas, V. Intestinal phosphate absorption is mediated by multiple transport systems in rats. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2017**, *312*, G355–G366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Muscher-Banse, A.S.; Breves, G. Mechanisms and regulation of epithelial phosphate transport in ruminants: Approaches in comparative physiology. *Pflügers Archiv Eur. J. Physiol.* **2018**, *471*, 185–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shirazi-Beechey, S.P.; Penny, J.I.; Dyer, J.; Wood, I.S.; Tarpey, P.S.; Scott, D.; Buchan, W. Epithelial phosphate transport in ruminants, mechanisms and regulation. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 992–996. [[CrossRef](#)]
27. Huber, K.; Walter, C.; Schröder, B.; Breves, G. Phosphate transport in the duodenum and jejunum of goats and its adaptation by dietary phosphate and calcium. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, *283*, R296–R302. [[CrossRef](#)]
28. Teitelbaum, S.L.; Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 638–649. [[CrossRef](#)]
29. Goyal, R.; Jialal, I. *Hyperphosphatemia*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
30. Carlson, B.M. The urinary system. In *The Human Body*; Academic Press: London, UK, 2019; pp. 357–372. [[CrossRef](#)]
31. Burckhardt, B.C.; Burckhardt, G. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2003**, *146*, 95–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hoffmann, N.; Thees, M.; Kinne, R. Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles. *Pflügers Archiv Eur. J. Physiol.* **1976**, *362*, 147–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pardridge, W.M. The Isolated Brain Microvessel: A Versatile experimental model of the blood-brain barrier. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dallaire, L.; Giroux, S.; Béliveau, R. Regulation of phosphate transport by second messengers in capillaries of the blood-brain barrier. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1992**, *1110*, 59–61. [[CrossRef](#)]
35. Elser, J.J.; Kyle, M.M.; Smith, M.S.; Nagy, J.D. Biological stoichiometry in human cancer. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Brown, R.B.; Razaque, M.S. Phosphate toxicity and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergy* **2018**, *1869*, 303–309. [[CrossRef](#)]
37. Papaloucas, C.; Papaloucas, M.; Kouloulis, V.E.; Neandis, K.; Pisteovou-Gompaki, K.; Kouvaris, J.; Zygogianni, A.; Mystakidou, K.; Papaloucas, A. Measurement of blood phosphorus: A quick and inexpensive method for detection of the existence of cancer in the body. Too good to be true, or forgotten knowledge of the past? *Med. Hypotheses* **2014**, *82*, 24–25. [[CrossRef](#)]
38. Jin, H.; Xu, C.-X.; Lim, H.-T.; Park, S.-J.; Shin, J.-Y.; Chung, Y.-S.; Park, S.-C.; Chang, S.-H.; Youn, H.-J.; Lee, K.-H.; et al. High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters akt signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *179*, 59–68. [[CrossRef](#)]

39. Xu, C.-X.; Jin, H.; Lim, H.-T.; Ha, Y.-C.; Chae, C.-H.; An, G.-H.; Lee, K.-H.; Cho, M.-H. Low Dietary inorganic phosphate stimulates lung tumorigenesis through altering protein translation and cell cycle in K-rasLA1Mice. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 525–532. [[CrossRef](#)]
40. Ge, G.; Zhou, C.; Ren, Y.; Tang, X.; Wang, K.; Zhang, W.; Niu, L.; Zhou, Y.; Yan, Y.; He, J. Enhanced SLC34A2 in breast cancer stem cell-like cells induces chemotherapeutic resistance to doxorubicin via SLC34A2-Bmi1-ABCC5 signaling. *Tumor Biol.* **2015**, *37*, 5049–5062. [[CrossRef](#)]
41. Chen, D.; Chien, S.-Y.; Kuo, S.-J.; Teng, Y.-H.; Tsai, H.-T.; Kuo, J.-H.; Chung, J.-G. SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 4135–4140.
42. Russo-Abrahão, T.; Lacerda-Abreu, M.A.; Gomes, T.; Cosentino-Gomes, D.; Carvalho-De-Araújo, A.D.; Rodrigues, M.F.; De Oliveira, A.C.L.; Rumjanek, F.D.; Monteiro, R.D.Q.; Meyer-Fernandes, J.R. Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191270. [[CrossRef](#)]
43. Bobko, A.A.; Eubank, T.D.; Driesschaert, B.; Dhimitruka, I.; Evans, J.; Mohammad, R.; Tchekneva, E.E.; Dikov, M.M.; Khramtsov, V.V. Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, srep41233. [[CrossRef](#)]
44. De Carvalho, C.C.; Caramujo, M.J.; De Carvalho, C.C.C.R. Tumour metastasis as an adaptation of tumour cells to fulfil their phosphorus requirements. *Med. Hypotheses* **2012**, *78*, 664–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lin, Y.; McKinnon, K.E.; Ha, S.W.; Beck, G.R., Jr. Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXC2) regulated osteopontin expression. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 926–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yang, J.; Weinberg, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* **2008**, *14*, 818–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bowen, J.W.; Levinson, C. Phosphate concentration and transport in Ehrlich ascites tumor cells: Effect of sodium. *J. Cell. Physiol.* **1982**, *110*, 149–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kestenbaum, B.R.; Sampson, J.N.; Rudser, K.D.; Patterson, D.J.; Seliger, S.L.; Young, B.; Sherrard, D.J.; Andress, D.L. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *16*, 520–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lanzer, P.; Boehm, M.; Sorribas, V.; Thiriet, M.; Janzen, J.; Zeller, T.; Hilaire, C.S.; Shanahan, C. Medial vascular calcification revisited: Review and perspectives. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 1515–1525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Giachelli, C.M. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 890–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hortells, L.; Guillén, N.; Sosa, C.; Sorribas, V. Several phosphate transport processes are present in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2020**, *318*, H448–H460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hayes, A.; Harris, B.; Dieppe, P.A.; Clift, S.E. Wear of articular cartilage: The effect of crystals. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **1993**, *207*, 41–58. [[CrossRef](#)]
53. Michigami, T. Skeletal mineralization: Mechanisms and diseases. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2019**, *24*, 213–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cecil, D.L.; Rose, D.M.; Terkeltaub, R.; Liu-Bryan, R. Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52*, 144–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESEARCH ARTICLE

Resveratrol is an inhibitor of sodium-dependent inorganic phosphate transport in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells

Marco Antonio Lacerda-Abreu^{1,2} | Thais Russo-Abrahão^{1,2} |
José Roberto Meyer-Fernandes^{1,2} 

¹Laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

José Roberto Meyer-Fernandes, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.
Email: meyer@bioqmed.ufrj.br

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 0012017; Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Grant/Award Number: e-26/201.300/2014; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 401134/2014-8

Abstract

Metastasis is a major cause of death in patients with breast cancer. A growing body of evidence has demonstrated the antitumour effects of resveratrol, a non-flavonoid polyphenol. Resveratrol inhibits metastatic processes, such as the migration and invasion of cancer cells. In several cancer types, the importance of inorganic phosphate (Pi) for tumor progression has been demonstrated. The metastatic process in breast cancer is associated with Na⁺-dependent Pi transporters. In this study, we demonstrate, for the first time, that resveratrol inhibits the Na⁺-dependent Pi transporter. Results from kinetic analysis shows that resveratrol inhibits Na⁺-dependent Pi transport non-competitively. Resveratrol also inhibits adhesion/migration in MDA-MB-231 cells, likely related to inhibition of the Na⁺-dependent Pi transporter.

KEYWORDS

breast cancer, MDA-MB-231 cell, metastasis, migration, Pi uptake, resveratrol

1 | INTRODUCTION

Distant metastasis to specific target organs is responsible for more than 90% of breast cancer-related deaths (Xie et al., 2017). In neoplastic cells, cell-cell adhesion is lost, and motility is required for their migration and adhesion to the extracellular matrix (ECM), where the intracellular ATP ratio is directly correlated with the cell migration velocity (Yang et al., 2004; Zanotelli et al., 2018). Consequently, tumor cells penetrate the blood endothelium and/or lymphatic vessels to enter the systemic circulation and leak through the capillary endothelium at distal sites. In this new host environment, the cells

successfully proliferate, changing from minimally growing cells to malignant secondary tumors (Fidler, 2003).

A growing body of evidence has shown the antitumour effects of the non-flavonoid polyphenol (3,4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) resveratrol (Ko et al., 2017). Recently, resveratrol showed increased capacity to decrease the proliferation of highly metastatic (MDA-MB-231) and less aggressive metastatic (MCF-7) breast cancer cells (Rodríguez-Enríquez et al., 2019). Resveratrol treatment of breast cancer inhibits cell migration by decreasing matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, p-phosphoinositide 3 kinase (p-PI3K), p-AKT, Vimentin, Snail1, and Slug levels (Sun et al., 2019).

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium; PFK, 6-phosphofructo-1-kinase; Pi, inorganic phosphate.

Regarding energy metabolism, resveratrol decreases the ATP content and cell viability by disrupting glucose metabolism once it directly inhibits 6-phosphofructo-1-kinase (PFK) activity in breast cancer cells (Gomez et al., 2013). Additionally, resveratrol suppresses glucose uptake by inhibiting the intracellular reactive oxygen species levels, thus downregulating hypoxia-inducible factor-1 α accumulation (Jung et al., 2013). Inorganic phosphate (Pi) is associated with energy metabolism because it is a constituent of ATP and, in its free form, is a substrate for intermediates of metabolic pathways (Lacerda-Abreu et al., 2018; Lacerda-Abreu et al., 2019). Pi enters cells via Na/Pi cotransporters belonging to two large families, SLC20 and SLC34. The SLC34 family comprises three members: NaPi-IIa (SLC34A1), NaPi-IIb (SLC34A2), and NaPi-IIc (SLC34A3) (Forster et al., 2013). SLC34A2 gene expression is significantly increased in breast cancer compared with its expression in adjacent normal breast tissues (Chen et al., 2010). Our group described the kinetic parameters of Na⁺-dependent Pi transport in the MDA-MB-231 human breast cancer cell line and found that they were associated with cell migration and adhesion capacity (Russo-Abrahão et al., 2018). More recently, other Na⁺-independent (H⁺-dependent) Pi transporters have been characterized in MDA-MB-231 cells (Lacerda-Abreu et al., 2019). Here, we evaluated the effect of resveratrol on Na⁺-independent (or H⁺-dependent) and Na⁺-dependent Pi transporters and suggest that resveratrol acts as an inhibitor of the Na⁺-dependent Pi transporter. Additionally, we demonstrate that resveratrol inhibits adhesion and cell migration in MDA-MB-231 cells, likely related to inhibition of the Na⁺-dependent Pi transporter.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Materials

All the reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis). The distilled water used to prepare all the solutions was deionized using a Milli-Q system of resins (Millipore Corp.). Radioactive Pi (³²Pi) was purchased from Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares as orthophosphoric acid and was purified by extraction in a phosphomolybdate complex with a mixture of 2-butanol/benzene followed by re-extraction into the aqueous phase with ammonium hydroxide and then precipitation as a MgNH₄PO₄ complex (Vieyra et al., 1991). Resveratrol was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final stock concentration of 10 mM. The controls in the experimental tests were performed in the absence or presence of 1% DMSO to ensure that DMSO did not induce cytotoxicity.

2.2 | Cell culture

Triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231) were grown at 37°C in Iscove's modified Dulbecco's medium (LCG Biotechnology) supplemented with sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (Cripion Biotechnology), 100 U/ml penicillin, and streptomycin (Thermo Fisher Scientific).

For experiments, the cells were harvested from the culture medium and washed twice with buffer comprising 116 mM NaCl or 116 mM choline chloride, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂, and 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.2). The number of cells was estimated by counting them in a Neubauer chamber. The protein concentration was measured using a Bradford method protocol (Berredo-Pinho et al., 2001; Bradford, 1976).

2.3 | Assay for ³²P_i transport

MDA-MB-231 cells (5 × 10⁴ cells per well) were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 60 min in a reaction mixture comprising 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂, 50 mM HEPES (pH 7.2), and 100 μM KH₂PO₄ (³²Pi specific activity: 2.5 μCi/nmol) to create Na⁺-dependent conditions. For the Na⁺-independent conditions (H⁺-Dependent), the same reaction mixture was used but 116 mM NaCl was replaced with 116 mM choline chloride. After the reactions were stopped, the cells were washed with 0.5 ml of ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2), followed by lysis with 0.5 ml of 0.1% SDS. The internalized ³²Pi released by cell lysis was transferred to filter paper, which was then immersed in scintillation liquid (Lacerda-Abreu et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018). Nonspecific uptake (blank values) was obtained by exposing the cells to a cold ³²Pi-reaction mixture incubated on ice for 60 min (Russo-Abrahão et al., 2018).

To determine Na⁺-dependent Pi transport, values of Pi uptake in the presence of 116 mM NaCl were subtracted the values obtained in the absence of sodium (116 mM Chloride Choline) (Lacerda-Abreu et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018).

2.4 | Cell viability

The viability of the MDA-MB-231 cells was evaluated using a CellTiter 96® AQueous One Solution Cell proliferation assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium (MTS) was used in combination with phenazine methosulfate, an electron coupling reagent, to generate a formazan reaction. The quantity of the formazan product released into the supernatant was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 490 nm. The quantity of formazan released into the culture supernatant is directly proportional to the number of viable cells, and the values were converted to percentages of the control.

2.5 | Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase activity

The Na⁺/K⁺ ATPase activity was measured in a mixture reaction comprising 20 mM HEPES-Tris (pH 7.2), 10 mM MgCl₂, 120 mM NaCl, 30 mM KCl, and 5 mM ATP ([³²P] ATP specific activity: 0.25 μCi/nmol) in a final volume of 0.1 ml. To evaluate the Na⁺-ATPase activity, a

reaction mixture was used comprising 20 mM HEPES-Tris (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 120 mM NaCl, and 5 mM ATP ([³²P] ATP specific activity: 0.25 μCi/nmol). For both tests, the reaction was initiated by adding cell lysate (0.5 mg protein/ml) and stopped after 60 min by adding 1.0 ml of ice-cold 25% charcoal in 0.1 M HCl (Bradford, 1976). The tubes were centrifuged at 1500g for 10 min at 4°C. To avoid Pi contamination, the charcoal suspension was washed at least 20 times with 0.1 N HCl before it was used (Guilherme et al., 1991).

Aliquots (0.5 ml) of the supernatants containing the released ³²Pi were transferred to vials. The amount of ³²Pi released was measured using a scintillation counter. The Na⁺/K⁺ ATPase activity was calculated as the difference between the amount of ³²Pi released in the absence and presence of 2 mM ouabain, whereas the measurement of Na⁺-ATPase activity was determined in the absence and presence of 1 mM furosemide (de Almeida-Amaral et al., 2007; Rocco-Machado et al., 2015; Caruso-Neves et al., 1998).

2.6 | Cell adhesion assay

Each well of a 96-well culture plate was precoated with 100 μl of 32 μg/ml of ECM gel (E1270; Sigma Chemical Co.) obtained from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma liquid diluted in PBS, which was maintained for 12 h at 4°C and then blocked with 1 mg/ml of BSA. One hundred microliters of MDA-MB-231 cells suspended in serum-free medium at 2.5 × 10⁴ cells/well was added to each well and maintained at 37°C and 5% CO₂ for 3 h in the presence or absence of resveratrol. For reversibility tests, the MDA-MB-231 cells were incubated with resveratrol for 60 min and washed before they were applied to the ECM gel. After this incubation period, the non-adherent cells were washed twice with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min. The fixed cells were then washed with PBS twice, stained with 100 μl of 0.5% crystal violet for 5 min and washed 2X with PBS. The washed cells were lysed with 100 μl of acetic acid (1% in ethanol) and stained with crystal violet. The content of the cell lysate was read spectrophotometrically at 570 nm. The results are expressed as the percentage of the control (Lacerda-Abreu et al., 2019; Wang et al., 2008).

2.7 | Migration assay

Twenty-four-well Corning Transwell© plates with permeable supports and 6.5-mm inserts and polycarbonate membrane pores of 8.0 μm were used for the migration assays. MDA-MB-231 cells (5 × 10⁴ cells/well) were suspended in serum-free medium maintained at 37°C and 5% CO₂ for 6 h. After incubation, the migrated cells were washed twice with PBS, fixed with 100% methanol, and stained for 15 min in crystal violet solution (0.5% crystal violet in 25% methanol/PBS). Cells that did not migrate to the lower compartment were removed with a cotton swab. Five random fields in each insert were photographed at a magnification of ×20. Quantification is expressed as the percentage of the area covered with migrated cells determined using ImageJ software (Lacerda-Abreu et al., 2021).

2.8 | Statistical analysis

In all cases, at least three independent experiments with different cell suspensions were performed in triplicate. The values shown in all experiments represent the mean ± SE. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined by logarithmic regression analysis (sigmoidal dose-response) using GraphPad Prism software. The following equation was used: $v = V_0 + (V_{100} - V_0) / (1 + 10^{e[\log EC_{50} - \text{Resveratrol concentration}]})$, where V_{100} is the velocity of transport at zero concentration of resveratrol and V_0 is the minimal transport rate obtained with the maximal concentration of resveratrol (Candea et al., 2014). Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max} values) were calculated using non-linear regression analysis of the data based on the Michaelis-Menten equation. Linear regression analysis of Lineweaver-Burk plots was also performed. The significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance and Tukey's multiple comparisons test, and differences were considered statistically significant at $p < .05$. All statistical analyses were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Resveratrol inhibited Na⁺-dependent Pi transport, showing no effect on H⁺-dependent Pi transport (Figure 1). Cancer cells have elevated phosphorus demands associated with protein synthesis and accelerated proliferation, as explained by the "growth rate hypothesis" (Elser et al., 2007). Hence, resveratrol has been described as an inhibitor of cell migration and is associated with decreased ATP, glycolytic enzyme, and glucose transporter levels (Gomez et al., 2013; Jung et al., 2013; Sun et al., 2019). Here, resveratrol acts to reduce the phosphorus uptake.

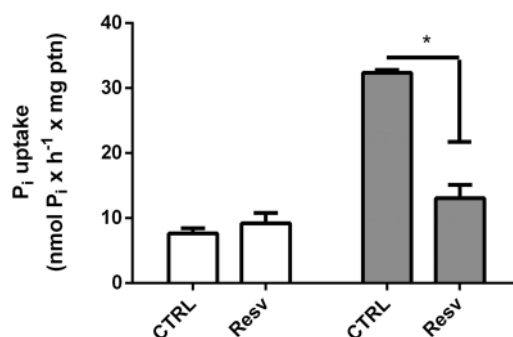


FIGURE 1 Resveratrol inhibits Na⁺-dependent inorganic phosphate (Pi) transport (gray bars) but does not affect H⁺-dependent Pi transport (white bars) in MDA-MB-231 cells. Intact MDA-MB-231 cells (5 × 10⁴ cells/ml = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C for 60 min in the reaction mixture described in the Section 2 with 100 μM KH₂PO₄ without (control [CTRL], 1% dimethyl sulfoxide [DMSO]) or with 100 μM resveratrol (Resv), whereas a solution contained 116 mM choline chloride (white bars) and a solution contained 116 mM NaCl (black bars). The results are presented as the mean ± SE of at least three experiments with different cell suspensions. *Denotes significant differences ($p < .05$) after comparison with the control

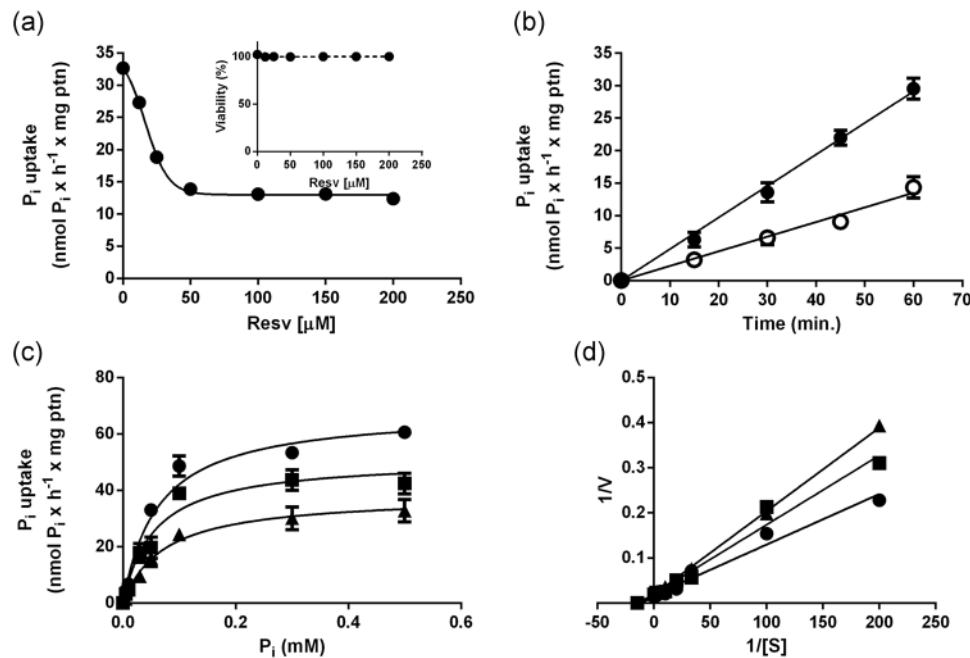


FIGURE 2 Noncompetitive inhibition of Na^+ -dependent P_i transport by resveratrol in MDA-MB-231 cells. Intact cells (5×10^4 cells/well = 1.45 mg protein/ml) were incubated at 37°C for 60 min in the reaction mixture described in the Materials and Methods section. (a) Dose-dependent inhibition of Na^+ -dependent P_i transport with $100 \mu\text{M}$ KH_2PO_4 at increasing concentrations of resveratrol is shown on the abscissa. (b) Time course of the P_i -transport activity with $100 \mu\text{M}$ KH_2PO_4 in the presence of resveratrol ($100 \mu\text{M}$, open circles) or absence of resveratrol (control, closed circles). (c) Dependence of P_i transport on increasing concentrations of KH_2PO_4 , as shown on the abscissa, in the presence of resveratrol ($12.5 \mu\text{M}$, closed squares; $100 \mu\text{M}$, closed triangles) or absence of resveratrol (control, closed circles). (d) Lineweaver-Burk plot of the data presented in Panel c with resveratrol ($12.5 \mu\text{M}$, closed squares, $r^2 = 0.976$; $100 \mu\text{M}$, closed triangles, $r^2 = 0.975$) or absence of resveratrol (control, closed circles, $r^2 = 0.998$). At various resveratrol concentrations, the cells remained viable throughout the experiment, according to the CellTiter 96[®] Aqueous One Solution cell proliferation assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium [MTS]) (panel A inset). The results are presented as the mean \pm SE of at least three experiments with different cell suspensions. P_i , inorganic phosphate

Using these initial results, we specifically focused on the effect of resveratrol on Na^+ -dependent P_i transport in MDA-MB-231 cells. Thereafter, dose-dependent inhibition was demonstrated by resveratrol, with an IC_{50} of $16.37 \pm 4.72 \mu\text{M}$ (Figure 2a). Under all of our conditions, the cell viability of the MDA-MB-231 cells was not affected, indicating that decreases in P_i transport levels were not caused by the loss of cell integrity (Figure 2a, inset). We also observed the linearity of cell transport as a function of time for as long as 60 min in the presence or absence of resveratrol (Figure 2b). To evaluate the type of inhibition caused by resveratrol, the dependence of P_i uptake on different P_i concentrations was evaluated in the absence or presence of different resveratrol concentrations (12.5 and $100 \mu\text{M}$). Previously, Na^+ -dependent P_i transport was characterized as occurring through a high-affinity P_i transporter (Russo-Abraão et al., 2018). A Michaelis-Menten kinetic profile of Na^+ -dependent P_i transport in the absence or presence of resveratrol concentrations was generated, and similar K_m values were obtained. However, a significant reduction in the V_{\max} value with both resveratrol concentrations (Figure 2, Panels c and d, and Table 1) suggested Noncompetitive inhibition by resveratrol.

Some studies have shown that resveratrol affects cancer cells by inhibiting protein targets (Gomez et al., 2013; Park et al., 2016; Wang et al., 2010). Resveratrol can decrease breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting PFK and induces autophagy directly by

inhibiting mTOR (Gomez et al., 2013; Park et al., 2016). Here, we show, for the first time, the inhibitory noncompetitive effect of resveratrol on Na^+ -dependent P_i transport in breast cancer cells. Resveratrol exerts an antitumour effect by regulating various targets in cancer cells (Ko et al., 2017). Resveratrol can fully recover Na^+ and K^+ -ATPase activity in spleen tissue from diabetic rats after hyperglycemia has altered the energetic homeostasis of this tissue by reducing enzyme activity levels (Kolling et al., 2019). Because the Na^+ gradient, maintained actively by

TABLE 1 Kinetic parameters of the Na^+ -dependent P_i transporter in the absence or presence of resveratrol in MDA-MB-231 cells

Condition	K_m (μM P_i)	V_{\max} (nmol $\text{P}_i \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}$ ptn)
CTRL	62.33 ± 7.70	68.39 ± 2.73
$12.5 \mu\text{M}$ Resveratrol	60.39 ± 1.12	51.09 ± 3.42^a
$100 \mu\text{M}$ Resveratrol	68.02 ± 10.57	38.15 ± 2.57^a

Note: The individual K_m and V_{\max} values were obtained from Figure 2c by the fit to the experimental points by using nonlinear regression with the Prism 6.0 software (GraphPad Software). Data are presented as mean \pm SE of experiments with three different cell suspensions, which were performed in triplicate.

Abbreviations: CTRL, control; P_i , inorganic phosphate.

^aDenotes significant differences ($p < .05$) after comparison with the control.

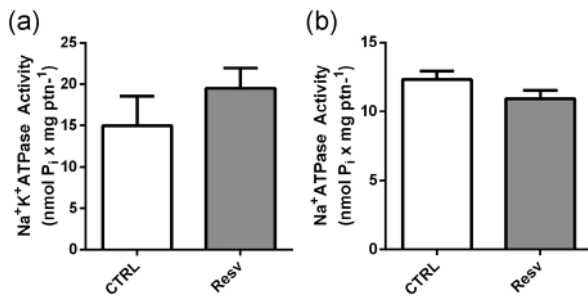


FIGURE 3 Resveratrol does not affect Na⁺, K⁺-ATPase, or Na⁺-ATPase activity. (a) Na⁺, K⁺ ATPase was measured in a mixture reaction containing 20 mM HEPES-Tris, pH 7.2; 10 mM MgCl₂; 120 mM NaCl; 30 mM KCl and 5 mM ATP ([³²P] ATP specific activity: 0.25 μCi/nmol) in a final volume of 0.1 ml without (CTRL, 1% DMSO) or with 100 μM resveratrol (Resv) for 60 min at 37°C. (b) To determine Na⁺-ATPase activity, a reaction mixture was used containing 20 mM HEPES-Tris, pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 120 mM NaCl and 5 mM ATP ([³²P] ATP specific activity: 0.25 μCi/nmol), without (CTRL, 1% DMSO) or with 100 μM resveratrol (Resv). The results are presented as the mean ± SE of at least three experiments with different cell suspensions. CTRL, control; DMSO, dimethyl sulfoxide; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Na⁺, K⁺-ATPase, and/or Na⁺-ATPase enzymes, plays a crucial role in inward Pi flux (Levi et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018), the ability of resveratrol to inhibit Na⁺-ATPase or Na⁺, K⁺-ATPase was investigated, as well as the consequent uptake of sodium-dependent Pi. No inhibition was observed when Na⁺, K⁺-ATPase (Figure 3a), or Na⁺-ATPase (Figure 3b) activity was measured in the presence of resveratrol, suggesting an effect of resveratrol on Na⁺-dependent Pi transport.

The inhibitory effect of resveratrol on F1 ATP synthase and its contribution to increase AMP:ATP and/or ADP:ATP ratios in the cell have already been described, in which it compromises Na⁺/K⁺ ATPase function because of the lack of ATP (Gledhill et al., 2007). Additionally, energy depletion stimulates AMPK and inhibits several ion channels and transporters, including Na⁺/K⁺ ATPase (Florian & Michael, 2014). Thus, it is possible that the stimulation of AMPK would promote the deregulation of the sodium gradient and inhibit the Na⁺-dependent Pi transport in MDA-MB-231 cells (Florian & Michael, 2014).

Recently, treatment with resveratrol was shown to inhibit cell migration by decreasing the signaling from labeled MMP-2, MMP-9, p-PI3K, p-AKT, Smad2, Smad3, p-Smad2, p-Smad3, Vimentin, Snail1, and Slug (Sun et al., 2019). Because of their high energy requirements, metastatic cells require more Pi, and Pi transporter inhibition leads to migration and adhesion impairment (Lacerda-Abreu et al., 2019; Russo-Abrahão et al., 2018). To assess whether resveratrol impairs cell adhesion and migration by inhibiting Na⁺-dependent Pi transport, we must first determine whether resveratrol can inhibit Pi transport reversibly. MDA-MB-231 cells were pre-incubated with buffer solution in the absence (control) or presence of 100 μM resveratrol. After repeated washings, resveratrol that had been added for pre-incubation was removed, and Na⁺-dependent Pi transport remained inhibited, at the same level as that in cells for which resveratrol was added and not removed by washing, showing that resveratrol could inhibit Na⁺-dependent Pi transport irreversibly (Figure 4a) or resveratrol would enter cells through passive diffusion or carrier-mediated process (Lançon et al., 2004) and therefore

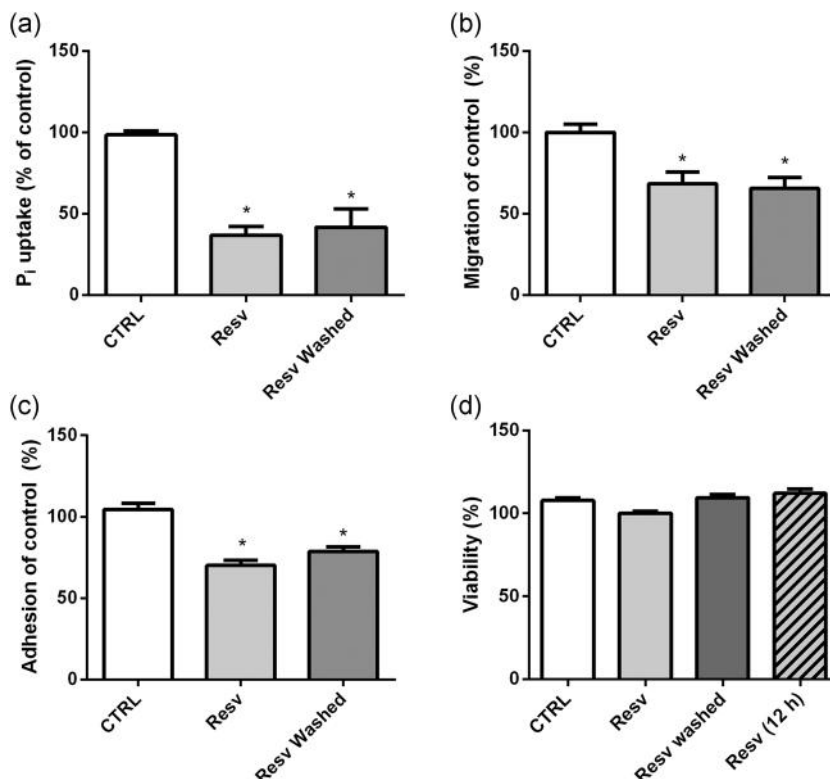


FIGURE 4 Irreversible inhibition of Na⁺-dependent Pi transport by resveratrol impairs migration and cell adhesion. MDA-MB-231 cells were pre-incubated with buffer solution in the absence (CTRL) or presence of 100 μM resveratrol (Resv) or pre-incubation of 100 μM resveratrol for 1 h, following repeated washings (Resv Washed), and (a) Na⁺-dependent Pi transport was measured for 60 min with 100 μM KH₂PO₄, (b) migration for 6 h, (c) adhesion 3 h, and (d) cell viability for 1 and 12 h. The results are presented as the mean ± SE of at least three experiments with different cell suspensions. *Denotes significant differences (*p* < .05) after comparison with the CTRL. CTRL, control; Pi, inorganic phosphate

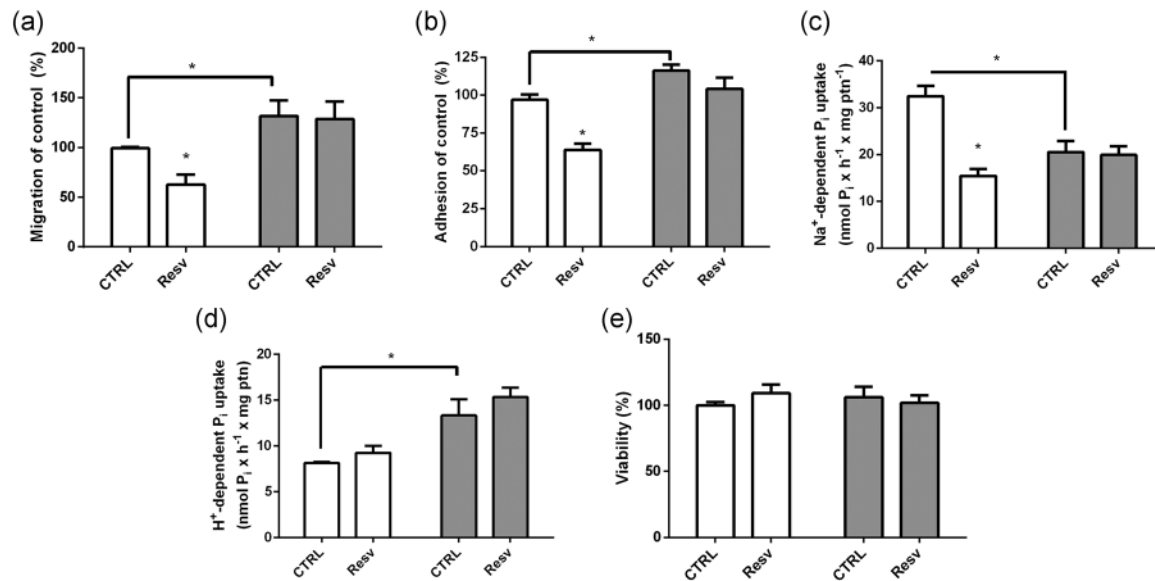


FIGURE 5 Effect of resveratrol on migration, adhesion, Pi transport and viability at different extracellular Pi concentrations. MDA-MB-231 cells were exposed to 1 mM Pi (control, white bars) and 2 mM Pi for 24 h (gray bars) and (a) migration, (b) adhesion, (c) Na⁺-dependent Pi transport with 100 μ M KH₂PO₄, (d) H⁺-dependent Pi transport with 100 μ M KH₂PO₄, and (e) cell viability were measured in the absence or presence of 100 μ M resveratrol (Resv) for 60 min. The results are presented as the mean \pm SE of at least three experiments with different cell suspensions. *Denotes significant differences ($p < .05$) after comparison with the control. Pi, inorganic phosphate

could not be eliminated successfully by washing returning to the extracellular environment or acting as an intracellular inhibitor. The same effect was also observed in migration and adhesion assays (Figure 4b,c). After treating cells with resveratrol for at least 1 h, we observed that the percentage of cells adhered and migrated remains reduced after repeated washings, without altering cell viability (Figure 4d). Additionally, no difference was observed when resveratrol was evaluated for 12 h for its effect on cell viability (Figure 4d, hatched bar), excluding the possibility that inhibition of Na⁺-dependent Pi transport regulates cell viability and the possibility that cell damage caused by resveratrol impacts migration and adhesion.

Our group recently showed a decrease in NaPi-IIb expression and Na⁺-dependent Pi transport in the presence of 2 mM Pi concomitant with an increase in H⁺-dependent Pi transport in MDA-MB-231 cells. This result suggests the occurrence of a compensatory mechanism for Pi acquisition when Na⁺-dependent Pi transport is compromised (Lacerda-Abreu et al., 2019). Here, in the presence of 1 mM extracellular Pi, we observed potential inhibition in migration (Figure 5a) and cell adhesion (Figure 5b) by resveratrol. However, no effect of resveratrol was observed with 2 mM Pi. Possibly, at a high Pi concentration (2 mM Pi), the expression of the Na⁺-dependent Pi transporter would already be impaired (Figure 5c) and, using a compensatory mechanism, the H⁺-dependent Pi transporter (insensitive to resveratrol) would be stimulated in this condition (Figure 5d) without affecting cell viability (Figure 5e). Thus, the migration and cell adhesion would be insensitive to resveratrol at 2 mM Pi.

If resveratrol regulates different cellular properties, including glucose uptake and other metabolic pathways, inhibition of Na⁺-dependent Pi transport can also be another antimetastatic

target for resveratrol. The antimetastatic effect of resveratrol has been established. Recently it has been shown in breast cancer cells, MDA-MB-231 that NaPi-IIb is responsible for the Na⁺-dependent Pi transport, which is important for cell migration and adhesion (Russo-Abraão et al., 2018). A possible knock-down of NaPi-IIb would reduce metastatic processes, as has already been demonstrated in lung and skin cancer (Hong et al., 2013; Jin et al., 2009; Xu et al., 2010). Therefore, no correlation with NaPi-IIb knockout would be evident because resveratrol also reduces migration and cell adhesion.

4 | CONCLUSION

It is possible to confirm that the Na⁺-dependent Pi transporter is inhibited by resveratrol and not by other mechanisms that might regulate Pi uptake, such as Na⁺K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase. Treatment with resveratrol in breast cancer cells for 1 h impaired the Na⁺-dependent Pi transporter possibly in an irreversible way. Resveratrol also inhibits adhesion/migration in MDA-MB-231 cells, likely related to inhibition of the Na⁺-dependent Pi transporter.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Mr. Fabiano Ferreira Esteves, Mr. Edimilson Pereira, and Ms. Rosangela Rosa de Araújo for their valuable technical assistance. This study was supported by grants from the Brazilian Agencies of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e (CNPq; Grant number: 401134/2014-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Grant

number: 0012017), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ- Grant Number: e-26/201.300/2014 to JRM-F).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

José Roberto Meyer-Fernandes  <https://orcid.org/0000-0003-2728-3138>

REFERENCES

- de Almeida-Amaral, E. E., Caruso-neves, C., Lara, L. S., Pinheiro, C. M., & Meyer-Fernandes, J. R. (2007). Leishmania amazonensis: PKC-like protein kinase modulates the (Na+K+)ATPase activity. *Experimental Parasitology*, 116, 419–426.
- Berredo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C. E., Chrispim, P. P., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., & Meyer-Fernandes, J. R. (2001). A Mg-dependent ecto-ATPase in Leishmania amazonensis and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391, 16–24.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Candeal, E., Caldas, Y. A., Guillén, N., Levi, M., & Sorribas, V. (2014). Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 307(12), C1113–C1122.
- Caruso-Neves, C., Meyer-Fernandes, J. R., Saad-Nehme, J., Proverbio, F., Marín, R., & Lopes, A. G. (1998). Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 119, 807–811.
- Chen, D. R., Chien, S. Y., Kuo, S. J., Teng, Y. H., Tsai, H. T., Kuo, J. H., & Chung, J. G. (2010). SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Research*, 30(10), 4135–4140.
- Elser, J. J., Kyle, M. M., Smith, M. S., & Nagy, J. D. (2007). Biological stoichiometry in human cancer. *PLOS One*, 2(10), e1028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001028>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: The “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Florian, L., & Michael, F. (2014). Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). *Channels*, 8(1), 20–28. <https://doi.org/10.4161/chan.27423>
- Forster, I. C., Hernando, N., Biber, J., & Murer, H. (2013). Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.007>
- Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2007). Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13632–13637. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706290104>
- Gomez, L. S., Zancan, P., Marcondes, M. C., Ramos-Santos, L., Meyer-Fernandes, J. R., Sola-Penna, M., & Da Silva, D. (2013). Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochimie*, 95(6), 1336–1343. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.02.013013>
- Guilherme, A., Meyer-Fernandes, J. R., & Vieyra, A. (1991). Reversible inhibition by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid of the plasma membrane calcium-magnesium ATPase from kidney proximal tubules. *Biochemistry*, 30, 5700–5706. <https://doi.org/10.1021/bi00237a010>
- Hong, S., Minai-Tehrani, A., Chang, S., Jiang, H., Lee, S., Lee, A., Seo, H. W., Chae, C., Beck, G. R., & Cho, M. (2013). Knockdown of the sodium-dependent phosphate co-transporter 2b (NPT2b) suppresses lung tumorigenesis. *PLOS One*, 8(10), e77121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077121>
- Jin, H., Xu, C., Lim, H., Park, S., Shin, J., Chung, Y., Park, S., Chang, S., Youn, H., Lee, K., Lee, Y., Ha, Y., Chae, C., Beck, G. R., & Cho, M. (2009). High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters Akt signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(1), 59–68. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-306OC>
- Jung, K.-H., Lee, J. H., Thien Quach, C. H., Paik, J.-Y., Oh, H., Park, J. W., Lee, E. J., Moon, S.-H., & Lee, K.-H. (2013). Resveratrol suppresses cancer cell glucose uptake by targeting reactive oxygen species-mediated hypoxia-inducible factor-1 activation. *Journal of Nuclear Medicine*, 54(12), 2161–2167. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.115436>
- Ko, J.-H., Sethi, G., Um, J.-Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., & Ahn, K. S. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2589. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>
- Kolling, J., Kolling, J., Franceschi, I. D., Nishihira, V. S. K., Baldissera, M. D., Pinto, C. G., Mezzomo, N. J., Carmo, G. M. D., Feksa, L. R., Fernandes, L. S., Orengo, G., Vaucher, R. A., Giongo, J. L., Wyse, A. T. S., Wannmacher, C. M. D., & Rech, V. C. (2019). Resveratrol and resveratrol-hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex recovered the changes of creatine kinase and Na⁺, K⁺-ATPase activities found in the spleen from streptozotocin-induced diabetic rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3), e20181330. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181330>
- Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Leite Tenório Aguiar, R., Monteiro, R. Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2021). Ectophosphatase activity in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cell Biology International*, 45, 411–421.
- Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Monteiro, R., de, Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer*, 1870, 291–298.
- Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Cosentino-Gomes, D., Nascimento, M. T. C., Carvalho-Kelly, L. F., Gomes, T., Rodrigues, M. F., König, S., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2019). H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1865(9), 2180–2188.
- Lançon, A., Delmas, D., Osman, H., Thénot, J. P., Jannin, B., & Latruffe, N. (2004). Human hepatic cell uptake of resveratrol: Involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(4), 1132–1137.
- Levi, M., Gratton, E., Forster, I. C., Hernando, N., Wagner, C. A., Biber, J., Sorribas, V., & Murer, H. (2019). Mechanisms of phosphate transport. *Nature Reviews Nephrology*, 15(8), 482–500. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0159-y>
- Park, D., Jeong, H., Lee, M. N., Koh, A., Kwon, O., Yang, Y. R., Noh, J., Suh, P.-G., Park, H., & Ryu, S. H. (2016). Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Scientific Reports*, 6(1), 21772. <https://doi.org/10.1038/srep21772>
- Rocco-Machado, N., Cosentino-Gomes, D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2015). Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through Heme in *L. amazonensis*. *PLOS One*, 10(6), e0129604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129604>
- Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Velázquez, S. C., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Robledo-Cadena, D. X., Hernández-Reséndiz, I.,

- García-García, J. D., Belmont-Díaz, J., López-Marure, R., Hernández-Esquivel, L., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2019). Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 370, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.008>
- Russo-Abrahão, T., Lacerda-Abreu, M. A., Gomes, T., Cosentino-Gomes, D., Carvalho-de-Araújo, A. D., Rodrigues, M. F., Oliveira, A. C. L., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PLOS One*, 13(2), e0191270.
- Sun, Y., Zhou, Q.-M., Lu, Y.-Y., Zhang, H., Chen, Q.-L., Zhao, M., & Su, S.-B. (2019). Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecules*, 24(6), 1131. <https://doi.org/10.3390/molecules24061131>
- Vieyra, A., Caruso-Neves, C., & Meyer-Fernandes, J. R. (1991). ATP in equilibrium with 32Pi exchange catalyzed by plasma membrane Ca (2+)-ATPase from kidney proximal tubules. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10324–10330.
- Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., & Zhou, P. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration, and adhesion of human breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134(3), 365–372. [pmid:17671792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17671792/).
- Wang, Y., Romigh, T., He, X., Orloff, M. S., Silverman, R. H., Heston, W. D., & Eng, C. (2010). Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Human Molecular Genetics*, 19(22), 4319–4329. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq354>
- Xie, H.-Y., Shao, Z.-M., & Li, D.-Q. (2017). Tumor microenvironment: Driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, 36(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0202-y>
- Xu, C., Jin, H., Lim, H., Ha, Y., Chae, C., An, G., Lee, K., & Cho, M. (2010). Low dietary inorganic phosphate stimulates lung tumorigenesis through altering protein translation and cell cycle in K-rasLA1Mice. *Nutrition and Cancer*, 62(4), 525–532. <https://doi.org/10.1080/01635580903532432>
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7), 927–939.
- Zanotelli, M. R., Goldblatt, Z. E., Miller, J. P., Bordeleau, F., Li, J., Vanderburgh, J. A., Lampi, M. C., King, M. R., & Reinhart-King, C. A. (2018). Regulation of ATP utilization during metastatic cell migration by collagen architecture. *Molecular Biology of the Cell*, 29(1), 1–9. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0041>

How to cite this article: Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., & Meyer-Fernandes, J. R. (2021). Resveratrol is an inhibitor of sodium-dependent inorganic phosphate transport in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Biol Int*, 45, 1768–1775. <https://doi.org/10.1002/cbin.11616>

Curriculum Vitae

- Nome: **Marco Antonio Lacerda Abreu**
- Nascimento: 30/01/1993
- Naturalidade: **Itamaraju – BA.**

Formação Acadêmica

- Graduação: Ciências Biológicas: Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012-2016.
- Mestrado: Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meies, 2016-2018.
- Doutorado: Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meies, 2018-2021.

Orientação de Estudante

1. Raíssa Teonório Leite Aguiar – 2018-2019.
2. Thais Vieira Nascimento – 2019-2021.

Publicações

1. Russo-Abrahão, T., Lacerda-Abreu, M. A., Gomes, T., Cosentino-Gomes, D., Carvalho-de-Araújo, A. D., Rodrigues, M. F., Oliveira, A., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. *PLoS one*, 13(2), e0191270.
2. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Monteiro, R. Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2018). Inorganic phosphate transporters in cancer: Functions, molecular mechanisms and possible clinical applications. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1870(2), 291–298.
3. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Cosentino-Gomes, D., Nascimento, M., Carvalho-Kelly, L. F., Gomes, T., Rodrigues, M. F., König, S., Rumjanek, F. D., Monteiro, R. Q., & Meyer-Fernandes, J. R. (2019). H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(9), 2180–2188.
4. Lacerda-Abreu, M.A. Meyer-Fernandes, J.R.(2019) Release of Inorganic Phosphate into the Tumor Environment: Possible Roles of EctoNucleotidases and Ecto-Phosphatases. *Nov Appro in Can Study*. 3(4). NACS.000568.2019.
5. Lacerda-Abreu MA, Meyer-Fernandes JR (2020) Possible roles of CD73 (ecto-5′-nucleotidase) and clinical significance in metastasis human cancer. *Hematol Med Oncol* 5: DOI: 10.15761/HMO.1000200.
6. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., Leite Tenório Aguiar, R., Monteiro, R. Q., Rumjanek, F. D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2021). Ectophosphatase activity in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cell biology international*, 45(2), 411–421.
7. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., & Meyer-Fernandes, J. R. (2020). The Roles of Sodium-Independent Inorganic Phosphate Transporters in Inorganic Phosphate Homeostasis and in Cancer and Other Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9298.
8. Lacerda-Abreu, M. A., Russo-Abrahão, T., & Meyer-Fernandes, J. R. (2021). Resveratrol is an inhibitor of sodium-dependent inorganic phosphate transport in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell biology international*, 10.1002/cbin.11616. Advance online publication.