

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – PATOLOGIA BUCAL**

Sérgio Edgar Campos de Mattos

Metabolismo no carcinoma espinocelular oral: papel no prognóstico e efeitos sobre a mitocôndria

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Porto Alegre, 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – PATOLOGIA BUCAL**

Sérgio Edgar Campos de Mattos

Metabolismo no carcinoma espinocelular oral: papel no prognóstico e efeitos sobre a mitocôndria

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final à obtenção do título de mestre em Odontologia
Área de Concentração: Patologia Bucal
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

de Mattos, Sergio Edgar Campos
Metabolismo no carcinoma espinocelular oral:
papel no prognóstico e efeitos sobre a mitocôndria /
Sergio Edgar Campos de Mattos. -- 2018.
59 f.
Orientador: Marcelo Lazzaron Lamers.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. câncer bucal . 2. metabolismo . 3. mitocôndria.
I. Lamers, Marcelo Lazzaron, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Dedico esse Agradecimento a todas as pessoas que de certa forma contribuíram para essa conquista contando um pouco da minha trajetória. Não foi fácil chegar até aqui, pois vim de família humilde e tinha muitos sonhos desde pequeno, como ser jogador de futebol, vôlei ou basquete, porém o tempo e a vida financeira acabaram com essas expectativas. Tive que enfrentar as dificuldades vendendo figo, laranja azeda, doces em compota que a família produzia, e fazendo pequenos trabalhos para ajudar a renda familiar. Um dia minha amada mãe me chamou pra conversar e eu a vi chorando, pediu para que realizasse o sonho dela, me formar e nunca desistir dos meus sonhos porque não poderia ajudar nos meus estudos naquele momento difícil. Então orei pela primeira vez a Deus, daquele dia em diante tudo começou a mudar na minha vida. Consegui um trabalho na Universidade de Cruz Alta – RS como ajudante de pedreiro e ingressei no curso de Biologia, mudei de setores na UNICRUZ até parar como técnico em laboratório e conseguir terminar o curso. Nessa etapa já tinha perdido minha mãe e meu pai aos quais queria muito ter dado essa alegria. Mas Deus queria algo maior para mim, tinha um objetivo de fazer Mestrado e continuar nos estudos em uma das melhores universidades do país “Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tive decepções e vitórias nessa caminhada que tenho que agradecer. A Deus todo poderoso, minha mãe Maria de Lourdes Campos de Mattos, meu Pai Davi de Mattos in memórium, que não estão mais aqui para ver minhas realizações. Minhas duas amadas mãezinhas de coração que me adotaram como filho, Sonia Mattos e Professora Carmem Iraci Eisman. Minha Esposa Giane Lucia Rodrigues dos Santos, filhos Agnes Maria Mattos e João Davi Rodrigues de Mattos, grande presente em minha vida. Aos meus queridos irmãos, familiares e amigos. E em especial ao meu grupo de pesquisa Lamoc constituído por essas pessoas maravilhosas como: Franciele, Luisa Brand, Gabrieli, Marcos, Luize, Luiza, Grasieli, Silvia, Natalia Shneider, Natália Koerch, Alessandro, Bibiane, Paloma, Nadia, Angela, Marjoe e Maurício e ao Programa de Pós Graduação em Odontologia pela oportunidade impar. Dedico uma homenagem mais que especial a essas cinco pessoas maravilhosas que nos momentos mais difíceis do caminho foram minha luz, Carlos amigo que não vou esquecer pela amizade e pelos conselhos de seguir em frente, grande “Carlitos Tevez”. Francisca pessoa meiga luz de conhecimento sobre metabolismo, meu muito obrigado. Leonardo Diel (amigo Leo leo) você foi um irmão que pedi a Deus, que nossa amizade e compreensão possa durar a vida toda, obrigado por tudo “Mano Veio”. Lisiane de Bernardi você foi o norte, a direção do meu caminho na busca do conhecimento, aprendi muito com você, não esquecerei tudo o que fez por mim, que Deus ilumine sempre você e sua família linda. Marcelo Lazzaron Lamers, obrigado pela oportunidade única, através do seu grupo realizou um sonho de um auxiliar de pedreiro a concluir Mestrado em uma das melhores Universidades do Brasil, meu muito obrigado de coração, pela orientação, pelo conhecimento e pela amizade

RESUMO

Mattos, S. E. C. Metabolismo no carcinoma espinocelular oral: papel no prognóstico e efeitos sobre a mitocôndria. 2018. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

O câncer de boca é considerado um problema de saúde pública em diversos países, sendo o carcinoma espinocelular (CEC) a forma mais comum. Apesar dos avanços nos conhecimentos sobre os processos moleculares, a taxa de sobrevivência está em torno de 50% em cinco anos. Entre os mecanismos moleculares que estão alterados no câncer, as mudanças no metabolismo energético têm sido analisadas quanto ao seu efeito no crescimento e invasão tumoral. Em geral, os tumores possuem uma alta dependência de glicose para a produção de energia, sendo observado um aumento de transportadores GLUT na membrana citoplasmática. Adicionalmente, células cancerígenas reprogramam rotas metabólicas, o que ocasiona alterações moleculares e morfológicas nas células, alterações no número de mitocôndrias e suas interconexões e ainda o conteúdo mitocondrial. O objetivo desta dissertação foi avaliar se componentes do metabolismo energético podem ser relacionados com o prognóstico de pacientes com carcinoma espinocelular bucal e observar potenciais alterações mitocondriais neste tipo de tumor. Para isso, desenvolvemos uma revisão sistemática de literatura com buscas nas bases de dados Pubmed, Scopus e Web ISI, associando os termos relacionados ao câncer de boca, metabolismo e prognóstico. De um total de 721 trabalhos, 21 artigos foram selecionados após leitura de título e resumo. O manuscrito foi categorizado em 2 subtópicos principais: (1) via glicolítica; (2) diagnóstico. A maioria dos componentes do metabolismo energético do tumor relacionados nesta revisão foram preditores de sobrevivência importantes em casos de pacientes com CEC oral. Após, buscamos verificar experimentalmente as alterações na morfologia mitocondrial em linhagens de carcinoma espinocelular oral. As linhagens celulares utilizadas foram SCC9, SSC25 e HACAT, as quais foram processadas e submetidas a microscopia eletrônica de transmissão. As características morfométricas das mitocôndrias foram analisadas no Software Image J. Nossos resultados preliminares sugerem um aumento de mitocôndrias em linhagens tumorais o que pode estar relacionado ao aumento do processo de fissão, e a degradação nas cristas mitocondriais. Concluímos que os tumores orais possuem profundas alterações metabólicas as quais podem envolver mudanças na morfologia mitocondrial, sendo que os marcadores metabólicos podem ser utilizados para determinar o prognóstico de pacientes com CEC.

Palavras-Chave: piruvato quinase, GLUT, lactato, prognóstico, hipóxia, glicólise e câncer bucal

ABSTRACT

Mattos, S. E. C. Metabolism in oral squamous cell carcinoma: its role in prognosis and effects on mitochondria. 2018. 59. Dissertation (Master degree) - Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

Oral cancer is considered a public health problem in several countries, and the oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common form. Despite advances in knowledge about the molecular processes involved in disease progression, the survival rate is around 50% in five years. Among the molecular mechanisms that are altered in cancer, changes in energetic metabolism have been analyzed for their effect on tumor growth and invasion. In general, tumors have a high glucose dependency for energy production, with an increase in glucose transporters (GLUT) in the cytoplasmic membrane. Additionally, cancer cells reprogram metabolic pathways, which results in molecular and morphological changes in cells, such as changes in the number of mitochondria and their interconnections, and mitochondrial content. The aim of this dissertation was to evaluate if components of energy metabolism could be related to the prognosis of patients with OSCC and to observe potential mitochondrial alterations in this type of tumor. We developed a systematic review with searches in Pubmed, Scopus and ISI Web databases, associating terms related to cancer, metabolism and prognosis. From a total of 721 papers, 21 articles were selected after reading the title and abstract. The manuscript was categorized into 2 main subtopics: (1) glycolytic pathway; (2) diagnosis. Most of the components of energetic metabolism of the tumor related in this review were important predictors of survival in patients with OSCC. Afterwards, we verified changes in mitochondrial morphology in OSCC. The cell lines used were SCC9, SSC25 and HACAT, which were processed and submitted to transmission electron microscopy. The morphometric characteristics of the mitochondria were analyzed with the Image J Software. Our preliminary results suggest an increase of mitochondria number in tumoral lineages which may be related to the increase of the fission process and the degradation in mitochondrial ridges. We conclude that oral tumors have profound metabolic alterations which may involve changes in mitochondrial morphology, and metabolic markers can be used to determine the prognosis of patients with OSCC.

Keywords: pyruvate kinase, GLUT, lactate, prognosis

Sumário

Referencial Teórico	7
Objetivo geral	17
Objetivo específico	17
Capítulo I.....	18
Artigo 1.....	19
Capítulo II.....	38
Artigo 2.....	39
Considerações Finais	48
REFERÊNCIAS.....	49

Referencial Teórico

Câncer Bucal

O Câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular desordenado, sendo que tais células podem invadir os tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos através da circulação sanguínea e linfática levando a formação de outros tumores a distância (metástases).

O estabelecimento do câncer pode ser explicado pelo acúmulo de mutações do DNA o qual permite que as células desenvolvam capacidades proliferativas e anti-apoptóticas. Entre os fatores que influenciam o surgimento e ação das mutações estão: as causas externas, que se relacionam a hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural, como o consumo de álcool, tabaco e; as causas internas, que são ocasionadas por desordens moleculares, as quais levam a diversas mutações genéticas que alteram a proliferação e o perfil de diferenciação celular (Oeffinger, Baxi, Novetsky Friedman, & Moskowitz, 2013).

O câncer de boca é considerado um problema de saúde pública em diversos países, devido ao grande número de casos e altas taxas de morte (Albuquerque & Richards, 2016). O carcinoma espinocelular bucal (CEC bucal) ocupa a oitava posição no ranking de incidência de câncer, com 300.000 novos casos diagnosticados a cada ano em todo o mundo. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, estima-se 11.140 novos casos em homens e 4350 em mulheres em 2016. A maior ocorrência em homens está relacionada à maior tendência deste grupo em desenvolver hábitos, como alcoolismo e tabagismo (Antunes, Prolla, de Barros Lopes, da Rocha, & Fagundes, 2013).

O CEC oral pode ser precedido por lesões denominadas desordens potencialmente malignas (DPMs). Clinicamente, as DPMs se classificam em leucoplasias (mancha ou uma placa branca, não removível por raspagem e que não pode ser classificada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra doença) ou eritroplasias (placa vermelha que não pode ser diagnosticada

clínica ou patologicamente como qualquer outra condição) (Giri, Agarwal, Sinha, Srivastava, & Mishra, 2016) (Khan et al., 2016). Estas lesões tendem a se manifestar em indivíduos do sexo masculino com idade aproximadamente de 40 anos, sendo que a prevalência aumenta com a idade (J. Zhang et al., 2016). Histologicamente, as DPMs são caracterizadas inicialmente por um aumento do espessamento da camada de queratina (hiperceratose) e da atividade proliferativa da camada basal do epitélio (hiperplasia). Com o acúmulo de mutações, podem ser observadas modificações no tamanho e forma, além de um grande número de alterações mitóticas (displasia). O carcinoma *in situ* é identificado quando ocorre o aumento do número de alterações histológicas, porém sem invasão do tecido conjuntivo. A presença de displasia epitelial é considerada o fator principal mais importante na determinação do risco de transformação em lesões cancerígenas (Jimson, Murali, Zunt, Goldblatt, & Srinivasan, 2016), porém, há relatos de que lesões hiperplásicas podem evoluir para lesões malignas (Alamgir, Jamal, & Mirza, 2016).

A taxa de sobrevivência dos pacientes com CEC oral continua baixa, 50% após 5 anos (Scully & Bagan, 2009), muito devido ao diagnóstico tardio da doença e a falta de biomarcadores que sejam capazes de identificar indivíduos com alto risco para desenvolvimento de tumores a partir das DPMs ou de recidivas e metástases, após o CEC oral já estar estabelecido. Nesse contexto, alguns fatores envolvidos na regulação do metabolismo energético tumoral têm sido descritos como possíveis ferramentas preditoras da taxa de sobrevivência de pacientes com CEC oral, podendo, assim, ocupar importância na individualização dos tratamentos e, mesmo, talvez, no controle de pacientes com DPMs (Kurhanewicz et al., 2011; Tanaka & Ishigamori, 2011; Vander Heiden, 2011).

Metabolismo energético da glicose

A glicose é uma das principais fontes de energia celular, sendo transportada na maioria das células por difusão facilitada, através de uma família de transportadores de glicose (GLUT1-GLUT7) presentes na membrana plasmática (Xie, Guo, Kang, & Ou, 2018). Após ser captada pela célula, a glicose

é direcionada para diferentes vias metabólicas que resultam na geração de energia, sendo a via glicolítica a mais comum em condições fisiológicas.

O processo metabólico celular normal da glicose tem por função principal a oxidação da glicose para obtenção de energia na forma de ATP. São gerados 38 ATPs por molécula de glicose, sendo que esta via é realizada em três etapas: glicólise, ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) e fosforilação oxidativa. A glicólise ocorre no citosol com a quebra da molécula de glicose gerando duas moléculas de piruvato e a produção de 2 moléculas de ATPs e duas de NADH₂. Sob condições aeróbicas, o piruvato é o produto final da glicólise. Já, em condição anaeróbica, o piruvato é convertido em lactato (Figura1) (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009).

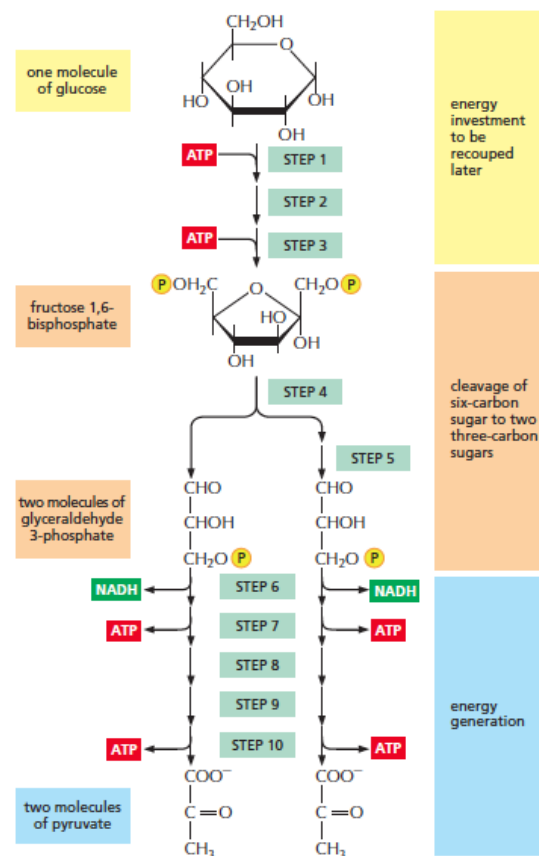


Figura 1 - Metabolismo glicolítico no citoplasma: Uma molécula de glicose é quebrada por ação sequencial de 10 etapas gerando duas moléculas de piruvato, 2 ATPs e 2 NADH₂, processo denominado glicólise. Sob condições aeróbicas o piruvato atravessa a membrana mitocondrial desencadeando as demais etapas (ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa). Já sob condições anaeróbicas o piruvato é convertido em lactato. Adaptada de (Alberts et al., 2015).

As duas moléculas de piruvato atravessam a membrana externa e interna da mitocôndria e atingem a matriz mitocondrial, onde se fazem presentes várias enzimas, dentre elas desidrogenases e as descarboxilases. Estas enzimas atuam sobre o piruvato gerando um NADH₂ uma acetilcoenzima A por molécula de piruvato, totalizando 2 NADH₂ e duas moléculas de acetilcoenzima A.

O ciclo de Krebs ocorre na mitocôndria e consiste na reação da acetil coenzima A com oxalacetato, dando origem ao citrato. Durante o ciclo do ácido cítrico, um sistema multienzimático origina diferentes compostos orgânicos, sendo que ao final obtém-se 3 NADH₂, 1FADH₂ e 1ATP por acetilcoenzima A. Portanto, na mitocôndria uma molécula de glicose origina 8 NADH₂, 2 FADH₂ e 2 ATP (Devic, 2016)

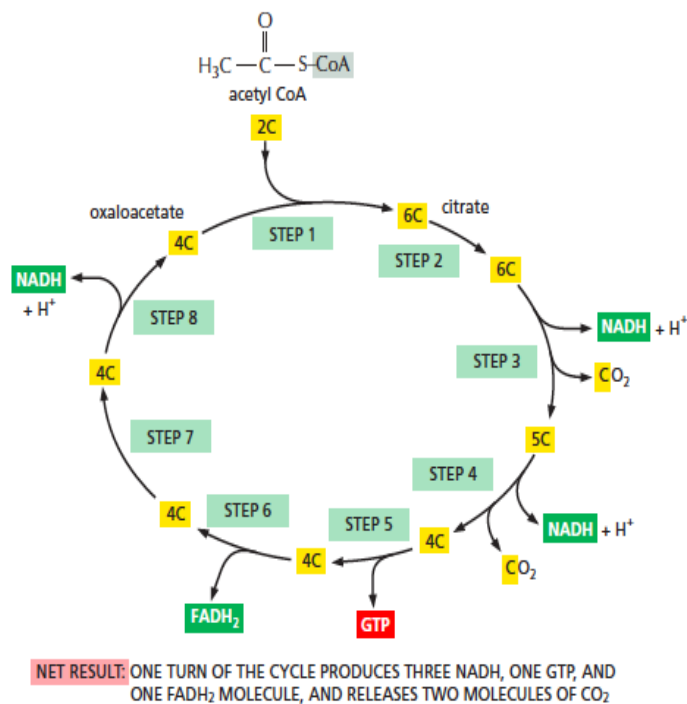


Figura 2 - Ciclo de Krebs: No interior da mitocôndria o piruvato é convertido em Acetilcoenzima A, (AcetilCoA) o que libera 2 NADH₂. AcetilCoA se condensa com o oxalacetato formando o citrato, componente inicial do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). Através da ação de enzimas intermediárias (desidrogenases e descarboxilases), o citrato é convertido em diferentes compostos orgânicos, durante esse processo ocorre a formação de 3 NADH₂, 1 FADH₂ e 1 ATP, para cada molécula de piruvato. Adaptada de (Alberts et al., 2015)

A terceira etapa é a cadeia de transporte elétrons. Nesta etapa, cada NADH_2 , gerado na glicólise e ciclo do ácido cítrico, chega até as cristas da membrana interna da mitocôndria, mais especificamente a uma sequência de citocromos, onde os elétrons dos hidrogênios são ativados circulando de um a outro citocromo, até chegar no citocromoxidase que contém $\frac{1}{2} \text{O}_2$. Assim, a energia vai sendo liberada aos poucos através dessas moléculas integrantes da cadeia transportadora de elétrons e somente no final da mesma o hidrogênio se une ao oxigênio formando água. Cada NADH_2 que passa na cadeia gera energia para formar 3 ATP e cada FADH_2 gera energia para formar 2 ATP (figura 3). Desta forma, no final da cadeia 34 ATP são gerados, que somados aos 2 ATPs produzidos na glicólise e aos 2 ATPs do ciclo do ácido cítrico, resultam em 38 ATPs totais (Griffiths, Gao, & Pararasa, 2017).

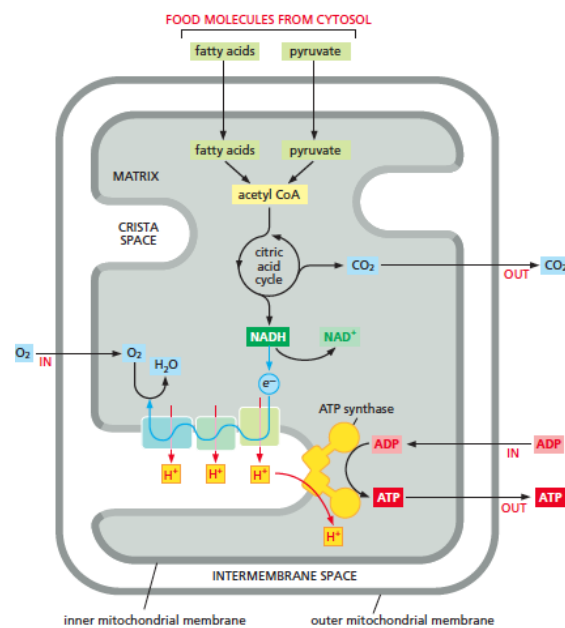


Figura 3 - Cadeia Transportadora de Elétrons: A Cadeia Transportadora de Elétron está localizada na membrana interna da mitocôndria, sendo formada por complexos proteicos I à IV. NADH_2 e FADH_2 ao percorrerem estes complexos se combinam sucessivamente com diversas substânciasceptoras intermediárias de elétrons chamadas de citocromo, liberando seus H^+ , que no complexo IV se ligam aos átomos de oxigênio formando molécula de água. Durante a transferência de elétrons, prótons são lançados da matriz mitocôndria para o espaço intermembrana, produzindo um gradiente através da membrana mitocondrial. A energia livre armazenada promove a síntese de ATP. Adaptada de (Alberts et al., 2015).

Metabolismo Energético da Glicose em Tumores

O metabolismo no câncer pode ser visto como a soma de um grande número de vias bioquímicas independentes, cada uma das quais fornece uma função específica para as células tumorais. Esse metabolismo é dirigido, fundamentalmente, para obtenção rápida da grande quantidade de energia necessária para manter a elevada taxa de divisão das células tumorais (Cuezva et al., 2002)

As células neoplásicas têm alta atividade glicolítica a qual é responsável pela produção da maior parte do ATP. Uma célula cancerígena em situação de hipóxia gera a sua energia através da glicólise e fermentação láctica, o que resulta em pouca quantidade de energia a cada ciclo. No entanto, para sobreviver, a célula maligna passa a captar cerca de 10 vezes ou mais glicose do que uma célula normal, pela modificação da proteínas de membrana GLUT. (Grimm, Cetindis, et al., 2014). Logo, pode-se afirmar que células tumorais resistem a ambientes anaeróbicos porque captam uma maior quantidade de glicose para conseguir produzir a energia necessária para sua sobrevivência e, por consequência, secretam maior quantidade de ácido no meio extracelular (Mookerjee, Gerencser, Nicholls, & Brand, 2017).

Otto Warburg (1956, apud DeBerardinis e Chandel 2016) observou pela primeira vez que mesmo com presença de oxigênio, as células tumorais eram capazes de reprogramar seu metabolismo glicolítico, convertendo a glicose em lactato e a assim sua produção de energia não fica limitada somente pela glicólise condições aeróbicas (DeBerardinis & Chandel, 2016).

A causa de uso desse tipo de metabolismo têm sido atribuída não somente a mutações nas proteínas envolvidas no ciclo de Krebs e na cadeia da fosforilação oxidativa, mas também a alterações das mitocôndrias (morfológicas, funcionais e mutação do mtDNA) (DeBerardinis & Chandel, 2016).

Atividade Mitocondrial

As mitocôndrias são organelas que preenchem uma porção substancial do volume citoplasmático de células eucarióticas e têm sido essenciais para a evolução de animais complexos, exercendo importante papel na obtenção de energia e no processo de morte celular via apoptose (Varanita et al., 2015). Nas últimas décadas, o conceito de mitocôndria como uma organela estática evoluiu para um modelo dinâmico, que as considera em conjunto, como uma rede de organelas fisicamente e funcionalmente interconectadas. O funcionamento das “redes mitocondriais” envolve os processos chamados de fusão e fissão, cujos distúrbios são causas reconhecidas de doenças humanas (Picard et al., 2015).

As mitocôndrias, no geral, têm formato de bastonete, com cerca de 2µm de comprimento por 0,5 µm de diâmetro. Seu número e tamanho varia de dezenas a centenas, dependendo do tipo e atividade celular. Morfologicamente, são compostas por duas membranas lipoproteicas: a externa e a interna. A membrana limitante externa é lisa e contém composição química igual as demais membranas celulares. Já a sua membrana interna tem composição química distinta e apresenta projeções de membrana chamadas de cristas mitocondriais. Os espaços entre as cristas, denominados de matriz mitocondrial, são preenchidos por um líquido viscoso, que contém diversas enzimas, proteínas e seu próprio material genético, o DNA mitocondrial (Luo et al., 2018). Nos pontos em que a membrana externa toca a membrana interna formam-se os chamados poros de permeabilidade transicional. Esses canais permitem a passagem de moléculas pequenas, de até 5kD. Com a permeabilidade controlada, moléculas maiores, como fatores apoptogênicos existentes na câmara mitocondrial, ficam isolados do citosol (Rostovtseva, Gurnev, Chen, & Bezrukov, 2012). Alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais externa e interna, podem ocorrer decorrentes de estresse celular, que danifiquem as mitocôndrias.

As mitocôndrias são sensíveis a aumentos de cálcio citosólico, espécies reativas de oxigênio e privação de oxigênio, tanto que tais agressões podem impossibilitar o retorno ao equilíbrio mitocondrial, tornando a morte celular inevitável (Bernardi, Di Lisa, Fogolari, & Lippe, 2015). Em tais situações patológicas, a abertura dos canais de porinas determina a perda do potencial de

membrana e alteração do pH da matriz mitocondrial, levando à falha na fosforilação oxidativa (Clemençon, Fine, & Hediger, 2016; Szabo & Zoratti, 2014). Nesse instante, a ativação de rotas de sobrevivência também age nas mitocôndrias, tentando evitar as alterações permanentes na sua permeabilidade e prevenir a morte celular (Bernardi et al., 2015). Esse mecanismo é, particularmente, utilizado pelas células tumorais, que, por exemplo, ao serem expostas a elevados níveis de estresse oxidativo, evadem da morte celular estimulando a liberação de antioxidantes.

Atividade mitocondrial no câncer

As células cancerosas desviam a maior parte dos seus meios de produção de energia para glicólise ao invés da fosforilação oxidativa mitocondrial. Esta redistribuição na energia celular, associada à regulação positiva das proteínas anti-apoptóticas, é que proporciona estabilidade adicional às mitocôndrias e, conseqüentemente, uma resistência adquirida à apoptose pela célula tumoral (Ma et al., 2017).

Células tumorais apresentam várias alterações e perda de funções mitocondriais, como: a diminuição da liberação de Ca^{++} , pouca produção de citrato de cálcio do ciclo de Krebs, altos níveis de algumas enzimas como glutaminase e alterações da ultra-estrutura da mitocôndria (Bhatti, Kumar, Vijayan, Bhatti, & Reddy, 2017). Adicionalmente, tais células agem como uma fonte importante na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) endógenas que escapam da cadeia de transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa (Baffy, Derdak, & Robson, 2011).

Embora a glicólise seja uma das principais características do metabolismo das células tumorais, sozinha esta via não pode explicar o uso de energia em todos os tipos de células cancerígenas e regiões do tumor, já que a fosforilação oxidativa mitocondrial e determinadas enzimas também desempenham papéis importantes no metabolismo do tumor. Nesse contexto, evidências sugerem que as mitocôndrias contribuem para a transformação neoplásica (Lommarini, Ghelli, Gasparre, & Porcelli, 2017), alterando as capacidades de obtenção de energia celular, aumentando o estresse oxidativo mitocondrial e modulando a apoptose

(Gao et al., 2017). Um indicativo do “status” da atividade mitocondrial, pode ser verificado a partir da observação da sua morfologia, das quais destacam-se: a cristólise, a fissão e a fusão mitocôndria (Arismendi-Morillo, 2009).

Cristólise, Fissão e Fusão Mitocondrial

A cristólise consiste na perda gradativa das cristas mitocondriais, devido ao aumento da expressão do HIF1 α no interior mitocôndria (Arismendi-Morillo, 2011). Os maiores níveis de HIF1 α são induzidos pelo aumento dos níveis de hipóxia no microambiente tumoral. A adaptação metabólica à hipóxia irá envolver mudanças na forma como a glicose é tratada pelas células cancerígenas, já que capacidade de gerar energia por fosforilação oxidativa, devido a sensibilidade celular à hipóxia, foi comprometida. Quando a disponibilidade de O₂ é limitada, a célula obterá energia, principalmente, por meio de glicólise (Kim & Bae, 2016)

Assim, a regulação ascendente dos genes que codificam a lactato desidrogenase (LDHA) e o monocarboxilato transportador 4 (MCT4), irão suportar o necessário aumento de fluxo glicolítico compensatório. Especificamente, o piruvato é convertido por LDHA em lactato, enquanto o MCT4 favorece a liberação passiva de lactato para fora das células ao longo do gradiente de concentração (Corbet & Feron, 2017). Algumas células do câncer, antes mesmo do aumento de influxo de Ca⁺ na mitocôndria, produzem mais antioxidantes e conseqüentemente evitando a cristólise. Já as células tumorais que produzem menos antioxidantes permitem o aumento de influxo de Ca⁺ na mitocôndria, o que pode levar as cristólises comprometendo a fosforilação oxidativa (Gatenby & Gillies, 2004; Hay, 2016; Martinez-Outschoorn, Peiris-Pages, Pestell, Sotgia, & Lisanti, 2017).

Os íons de hidrogênio e o ácido láctico gerados serão liberados para o citoplasma e, em seqüência, para o meio extracelular. Dessa forma, as células cancerosas geralmente têm um pH maior do que células normais, o que leva a um pH invertido ao gradiente em todas as membranas dessas células. Para deixar o pH favorável no seu interior, ocorre modificações de mecanismo em proteínas transmembranas como a NHE1, que, ao mesmo tempo, exporta íons de hidrogênio para o exterior da célula e capta bicarbonato para interior da célula

através do seu transportador NBC1/2. Os íons de hidrogênio acidificam o microambiente tumoral, favorecendo o desenvolvimento do tumor.

Alterações na dinâmica mitocondrial, ocasionando desequilíbrio no processo de fissão e fusão mitocondriais, também podem, potencialmente, contribuir para desenvolvimento de tumores. A ruptura da maquinaria de fissão/fusão altera fortemente a função orgânica celular, afetando tanto a morte celular programada como a produção de energia (McBride, Neuspiel, & Wasiak, 2006)

A fissão mitocondrial é caracterizada pela divisão dessa organela, a fim de facilitar o rápido acesso ao metabolismo, para regiões que precisam maior demanda energética (Maycotte et al., 2017). As proteínas que controlam a fissão mitocondrial incluem Drp1 e Fis1. Em relação à fusão, as proteínas que compõem são: mitofusinas (Mfn1 e Mfn2) e OPA1 (Maycotte et al., 2017). A Drp1 está localizada no citosol e é uma GTPase que tem como função hidrolisar GTP, uma purina cuja função é semelhante a do ATP. Através dessa locomoção, essa proteína liga-se à Fis1, que está ancorada na membrana externa da mitocôndria, resultando na formação de um anel circundante ao eixo mitocôndria, desencadeando a fissão dessa organela (Dimmer & Scorrano, 2006).

A fusão mitocondrial é caracterizada pela união de uma ou mais mitocôndrias. Este processo é regulado por duas classes de GTPases: mitofusinas Mfn1, Mfn2 e a OPA1 (Fujioka, Tandler, Consolo, & Karnik, 2013). As mitofusinas, encontradas ancoradas na membrana externa da mitocôndria, são responsáveis pela fusão da membrana externa, enquanto que a OPA1 atua fundindo as membranas mitocondriais internas. A OPA1 mantém o mtDNA e a ATP sintase é responsável pela estruturação da morfologia das cristas mitocondriais. Especificamente, a oligomerização da ATP sintase parece ter um impacto na curvatura da membrana interna e na curvatura das cristas (Bartolak-Suki, Imsirovic, Nishibori, Krishnan, & Suki, 2017).

Presença de cristólises e mudanças na taxa de fissão e fusão mitocondrial podem auxiliar na explicação do desenvolvimento do câncer e, assim, oferecer estratégias adicionais para intervenção terapêutica (Voccoli & Colombaioni, 2009).

Objetivo geral

Avaliar o papel do metabolismo energético no prognóstico de CEC oral e as alterações de morfologia mitocondrial em linhagens celulares de epitélio normal e de CEC.

Objetivos específicos

- Realizar uma revisão sistemática da literatura correlacionando fatores do metabolismo energético tumoral e prognóstico de pacientes com carcinoma espinocelular oral.
- Quantificar e analisar a morfologia das mitocôndrias (cristólise, fissão e fusão) em linhagens celulares de queratinócitos e de carcinoma espinocelular oral com diferentes níveis de diferenciação.

Capítulo I

Neste capítulo será apresentada uma revisão sistemática correlacionando diferentes marcadores metabólicos com o prognóstico de pacientes com CEC oral. Esta revisão será submetida à revista Archives of Oral Biology (fator de impacto 1.748 - Qualis A2).

Artigo 1

Glycolytic pathway and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a systematic review

Sergio Edgar Campos Mattos¹, Leonardo Francisco Diel¹, Francisca Gonçalves¹, Lisiane Bernardi¹, Marcelo Lazzaron Lamers^{1,2}.

¹Basic Research Center in Dentistry, Dentistry School, Federal University of Rio Grande of Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

²Department of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author:

Marcelo Lazzaron Lamers

Address: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Telefone +55 51 33085011; Fax +55 51 33085003, e-mail: marcelo.lamers@ufrgs.br

Abstract

Introduction: Molecular changes that cause impact on mitochondrial glycolysis have been associated to the maintenance of tumor cells. Considering some metabolism factors have already been described as predictor of disease severity and outcome, a search strategy was formulated to answer the question that guided this systematic review: "Is glycolytic pathway correlated to OSCCs prognosis?" **Methods:** Literature was selected through a search of PubMed, Scopus and ISI Web of Knowledge electronic databases without date restriction matching key words involving Oral squamous cell carcinoma, survival and glycolytic pathway. Only English language was applied to the search. **Results:** The following research results in a total of 721 files. After title and abstracts analysis, 21 articles fully attended the inclusion criteria. The manuscript was categorized into 2 main subtopics: (1) glycolytic pathways and (2) diagnosis. These subtopics describe the characteristics of glycolytic profile of OSCC tumors. **Conclusions:** The most of tumor energetic metabolism components related in this review were important survival predictors in OSCC patient cases.

Keywords: Oral cancer, survival, disease free survival, energy metabolism,

Introduction

Cancer is a disease characterized by a disorganized tissue growth where tumor cells are able to invade adjacent tissues and establish metastasis throughout blood and lymphatic vessels (Ishikawa et al., 2016). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the eighth most prevalent cancer worldwide, with more than 300,000 new cases being diagnosed every year. It is considered a public health problem since present poor prognosis, with a 5-year survival rate < 50% (Scully & Bagan, 2009).

Traditionally, OSCC prognosis is based on clinical TNM classification. However, this system is not sufficient to predict patient survival, mainly in cases of initial diagnosis. In reason of that, prognostic biomarkers more sensitive may be useful in first stages of the tumors, in order to personalize patient follow-up and treatment (Liyen Chen et al. 2014). In this context, it has increased the number of researches focusing in metabolic factors promoting tumor development and metastasis.

Molecular changes that cause impact on mitochondrial glycolysis have been associated to the maintenance of tumor cell acquired abilities to survival, proliferate and invade when cells are exposure to adverse conditions as hypoxia, lack of nutrients or immune system action (Baffy, Derdak, & Robson, 2011; Martinez-Outschoorn, Peiris-Pages, Pestell, Sotgia, & Lisanti, 2017).

Considering that some metabolism factors have already been described as predictor of disease severity and outcome, a metabolic biomarker may be important to identify OSCC relapse low-and high-risk patient (Kurhanewicz et al., 2011; Tanaka & Ishigamori, 2011; Vander Heiden, 2011). Therefore, a search

strategy was formulated to answer the question that guided this systematic review: “Is glycolytic pathway correlated to OSCCs prognosis?”

Methodology

Literature was selected through a search of PubMed, Scopus and ISI Web of Knowledge electronic databases matching key words involving Oral squamous cell carcinoma, survival and energetic metabolism. A search was performed to identify all the studies matching the following key words in the title or abstract: “Head and neck neoplasms” OR “Mouth neoplasms” OR “Oral squamous cell carcinoma” OR “Head and neck squamous cell carcinoma” OR “Head and neck cancer” OR “Oral cancer” AND “survival” OR “mortality” OR “prognosis” OR “disease free survival” OR “survival analysis” AND “energetic metabolism” OR “energy metabolism” OR “glucose metabolism” OR “mitochondrial metabolism” OR “ATP production” OR “oxidative phosphorylation” OR “positron emission tomography” OR “glucose transporters”. There was no date restriction (last accessed September, 2018). Only English language was applied to the search and duplicate studies were identified and discarded. After initial filter, the remaining articles were subjected to inclusion and exclusion criteria and reviewed by 3 reviewers (S.E.G.M., F.A.G. and L.B.). The papers that generated disagreement among reviewers were evaluated again until a consensus was reached. There was no contact to paper authors to obtain additional information.

Inclusion and Exclusion Criteria

It was included studies that related the impact of glycolytic tumor metabolism factors on the survival of human patients with OSCCs. Studies that were performed only using animal model or cell culture, report cases and literature reviews were excluded during title/abstract selection. During full-text reading, studies that had not presented the survival analysis and follow up time or those that patients had not finished the treatment or those that had not focused on glycolytic variables were also excluded.

Results

Literature search results yielded a total of 721 results. After 199 duplicate references were discarded, a subsequent title-level search and summary revealed 43 articles for full reading. At this level, 22 studies were removed (Figure 1). A total of 21 studies were included in this review. The results were categorized into 2 main subtopics, as shown in the present study: (1) Glycolysis pathway and (2) diagnosis. These subtopics describe the characteristics of the metabolic profile of the CEO tumors. Tables 1 and 2 provide information about the selected studies.

Glycolytic pathway

A total of 11 articles evaluated markers related to glycolysis pathway as follows: GLUT1 (Glucose transporter 1), TKTL1B (transketolase-like 1), LDHB (L-lactate dehydrogenase B chain), LDH5 (Lactate dehydrogenase 5), PKM2 (Pyruvate kinase), Aldoc (fructose-bisphosphate aldolase C expression), HMGCS2 (Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial) and Apo10 (binding protein

Apo10)(Chen et al., 2017; Eckert et al., 2011; Grimm, Munz, Teriete, Nadtotschi, & Reinert, 2014; Grimm, Schmitt, et al., 2013; Kondo et al., 2011; Kunkel, Reichert, et al., 2003; Li et al., 2016; Ohba et al., 2010; Sun et al., 2015; Y. Wang et al., 2015). Four papers (Eckert et al., 2011; Grimm et al., 2014; Kunkel, Reichert, et al., 2003; Ohba et al., 2010) correlated immunohistochemistry (IHC) GLUT1 expression levels with prognosis. Considering this set of articles, GLUT1 analysis was performed in 385 OSCC patient biopsies, during an interval (in mean/median) of follow-up from 17.6 to 72 months. Analysis of low and high GLUT1 expression was considered in uni and multivariate tests. For all papers, the expression of GLUT-1 was significantly correlated with disease-specific survival, where higher levels of the protein were related to worse prognosis with a minor median survival time.

The enzymes Aldoc, PKM2, LDHB and LDH5 were described in 4 papers (Grimm, Alexander, Munz, Hoffmann, & Reinert, 2013; Kondo et al., 2011; Li et al., 2016; Sun et al., 2015; Y. Wang et al., 2015). Low and high levels of mRNA for Aldoc and protein (by IHC assay) for the other proteins were correlated to survival. High expression of PKM2, LDHB and LDH5 were significantly associated to poorer survival, while patients with tumors expressing low Aldoc mRNA had longer survival time ($p=0.001$). Also, OSCC patients with low HMGCS2 mRNA (Chen et al., 2017) and Apo10 and TKTL1B (Grimm, Schmitt, et al., 2013) protein expression tumor survived significantly longer than did those with high expression. Considering the results, these metabolic factors involved to glycolysis pathway seem to play a key role in oral carcinoma progression.

Diagnosis

FDG (2-deoxy-2-[fluorine-18]fluoro- D-glucose) positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) is a diagnosis tool that consider the glucose cell absorption to identify tumor volume and localization. Eleven articles relating the result data from FDG PET-CT with patient survival were found during this review (Abd El-Hafez, Moustafa, Khalil, Liao, & Yen, 2013; Cho et al., 2015; Hofele, Freier, Thiele, Haberkorn, & Buchmann, 2009; Joo et al., 2013; Kunkel, Forster, Reichert, Jeong, et al., 2003; Kunkel, Forster, Reichert, Kutzner, et al., 2003; Kunkel et al., 2006; Shimizu et al., 2016; Suzuki, Fukuyama, et al., 2009; Suzuki, Hasegawa, et al., 2009; Zhang et al., 2014). Nine studies used the standardized uptake value (SUV) to classify OSCC tumors in low or high SUV levels (the subgroup classification was different among the studies rating from ≥ 4 or < 12 SUV levels) (Cho et al., 2015; Hofele et al., 2009; Joo et al., 2013; Kunkel, Forster, Reichert, Jeong, et al., 2003; Kunkel, Forster, Reichert, Kutzner, et al., 2003; Kunkel et al., 2006; Shimizu et al., 2016; Suzuki, Fukuyama, et al., 2009; Suzuki, Hasegawa, et al., 2009). Independently of subgroups and protocols, in all these papers, high levels of SUV prior surgery or follow-up predicted adverse outcome of patients with OSCC. Using the same tool, one paper considered the metabolic tumor volume (MTV) (Zhang et al., 2014) and other the total lesion glycolysis (TLG) (Abd El-Hafez et al., 2013). Both MTV and TLG variables were showed as independent prognostic factors for oral cancer patient survival.

Discussion

Oral cancer molecular alterations result in lesions with sequential histopathologic stages (Genden et al., 2010; Papagerakis et al., 2014; Ram et al., 2011). Among the molecular mechanisms are those involving the modification of tumor metabolism. This review focused on the literature information about the impact of tumor glycolytic factors on the survival of patients with OSCCs.

Although several studies address the investigation of metabolic changes in cancer, considering the inclusion criteria, it was found only 21 articles reporting the metabolic role in the prognosis and survival of patients with oral cancer. Ten studies gauge markers specific related to the glycolysis pathway and another ten used the PET-CT as diagnostic protocol. One paper used both GLUT1 marker and PET-CT.

All glycolytic pathway markers described here having high expression in tumor tissue, except Aldoc, were associated to poorer patient prognosis. From those, GLUT-1 was significantly correlated with disease-specific survival. This situation is justified since cancer cells produce ATP mainly via glycolysis compared to the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation and, consequently, the importation of large quantities of glucose to the cellular cytoplasm occurs to maintain high levels of ATP production. It has already demonstrated that cancer cells express high levels of glucose transporters in the cytoplasmic membrane (particularly GLUT1 and GLUT3) (Denko, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011).

This increase in the expression of glucose transporters is influenced by HIF-1, which also increases the expression of the genes involved in the enzymatic breakdown of glucose in pyruvate and the enzymes involved in the metabolism of pyruvate. In hypoxic cells, pyruvate is converted to lactate by lactate dehydrogenase (LDH). However, in cancer cells, the intense transformation of pyruvate to lactate persists with or without subsequent exposure to oxygen, a historical phenomenon known as the Warburg effect (Koukourakis, Giatromanolaki, Simopoulos, Polychronidis, & Sivridis, 2005). The high level of LDH was described by Sun et al (2015) and Grimm et al (2013) as predictor of poor survival in OSCC patients (Grimm, Alexander, et al., 2013; Sun et al., 2015). The presence of LDH would contribute to the increase of lactate released into the extracellular space and cause the decrease of the pH levels on tumor environment, promoting tumor migration, invasion and metastasis (Kato et al., 2013).

Lactate production is directly influenced by pyruvate levels. Pyruvate is converted from phosphoenolpyruvate by pyruvate enzymes. One of those enzymes called pyruvate kinase M2 (PKM2) is expressed in both cancer and normal tissue and has been related to support anabolic metabolism and Warburg effect (Kroemer & Pouyssegur, 2008; Xu et al., 2017). Additionally the nuclear translocation of PKM2 was showed acting as a transcriptional factor promoting EMT in colon cancer cells(Hamabe et al., 2014). PKM2 overexpression was correlated with worse overall survival in oral, gastric and bladder cancer tissues (Huang et al., 2018; C. Wang et al., 2017).

TKTL1 is postulated to be the key enzyme of a recently described metabolic pathway that binds to the pentoses-phosphate pathway providing a link

between anaerobic degradation of glucose and the production of fatty acids by the use of acetyl-CoA (Krockenberger et al., 2007). In glycolytic pathway, TKTL1 gene activation is involved to oxygen-independent metabolism, resulting in increased glucose intake and lactic acid formation and also is related to contribute to proliferation, repression of immune system, angiogenesis, invasion, metastasis and therapy resistance (Coy, 2017), and the expression of the TKTL1 protein was significantly correlated with increased tumor size, invasion, lymph node, metastasis, and TNM stage in gastric cancer (Song, Liu, & He, 2015).

In this review, HMGCS2, and Aldoc high expression were also involved to worst prognosis in OSCC. HMGCS2 is an enzyme involved in the conversion of fatty acids to carbon derivatives, acting in ketogenesis (Su et al., 2017). OSCC patients with low HMGCS2 expression survived significantly longer than did those with high HMGCS2 expression. *In vitro* studies have shown that the enzyme enhances cell migration and invasion into OSCC cells (Chen et al., 2017). ALDOC is an enzyme involved in the conversion of fructose-1,6-bisphosphate to glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate, high expression is related to suppress migration and invasion, its expression is negatively related to prognosis and cellular migration (Li et al., 2016).

There is heterogeneity in the use of glucose by different tumors and by different populations of tumor cells. Depending on the availability of nutrients, some cells in some tumors are predominantly glycolytic, while others primarily possess the metabolic phenotype for oxidative phosphorylation (Hay, 2016; Martinez-Outschoorn et al., 2017). In papers reviewed here, the increased glucose uptake, identified by PET-CT, was correlated with poor prognosis.

As the sample (age, tumor type, location, TNM) are different among the articles reported, besides the differences between the methodologies applied in the analysis of metabolic markers, it is difficult to define which would be the best choice in terms of prognosis. However, in general, the presence of metabolic alterations was related to the worst survival percentage.

Conclusion

The most of tumor energetic metabolism components related in this review were important survival predictors in OSCC patient cases. In the future, more studies focusing specifically in the investigation of the role of metabolic factors may be important to improve the knowledge resulting in new adjuvant therapeutic approaches and prognostic predictor biomarkers.

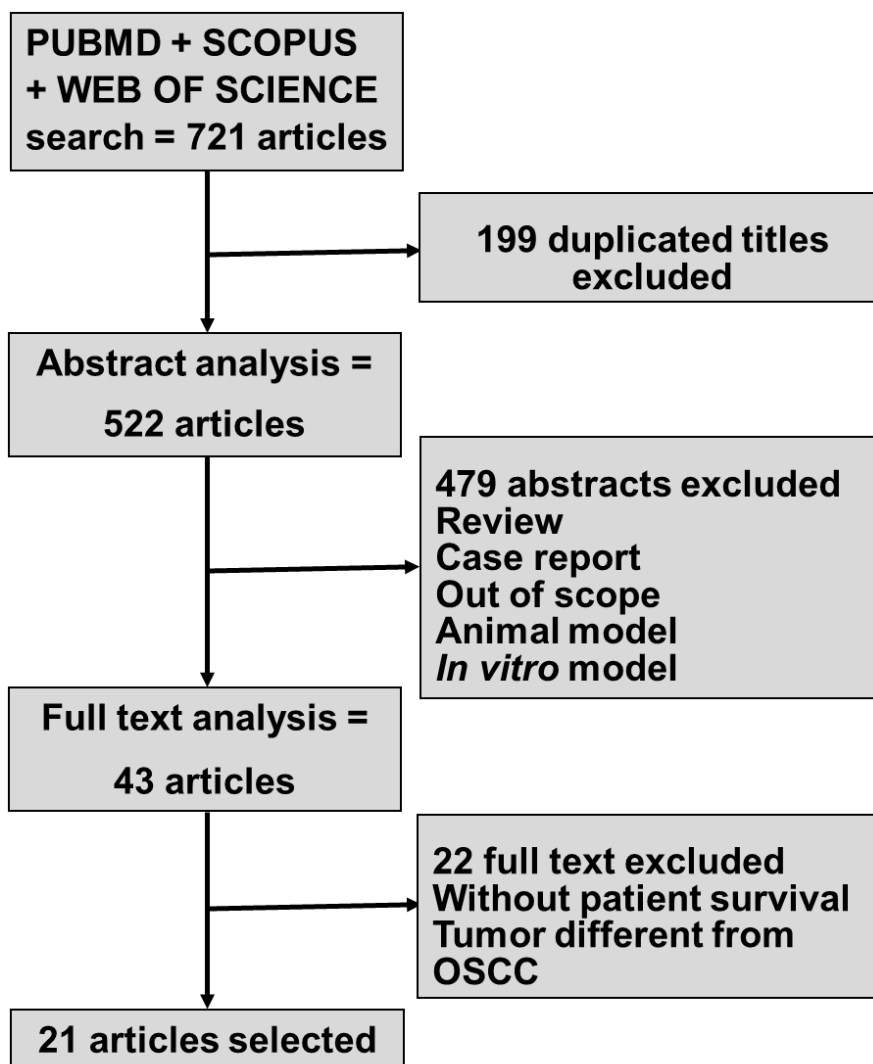


Figure 1. Flowchart showing results after the search strategy developed to find studies about the impact of tumor metabolism factors on the survival of patients with OSCC.

Table 1. Demographic and pathological characteristics of the selected studie

Author (year)	Tumor location and sample size (n)	Age (years) ^a	Gender	Smoking	Drinking	Tumor Differentiation	T stage	N stage	Clinical Stage
<i>Glycolysis pathway</i>									
Ohba et al (2010)	T (24)	61	145 (M) 10 (F)	NR	NR	NR	8 (T1), 10 (T2), 6 (T3), 0 (T4)	12 (N0), 6 (N1), 6 (N2), 0 (N3)	NR
Eckert et al (2011)	BM (4), FM/AR (30), P (17), T (31)	59	60 (M) 22 (F)	NR	NR	NR	22 (T1), 31 (T2), 10 (T3), 19 (T4)	43 (N0), 11(N1), 15 (N2), 1 (N3)	19 (I), 20 (II), 11 (III), 32 (IV)
Grimm et al (2014)	AR (22), BM(8), FM (64), Lip(11), P(15), T (41)	16 (<45 yrs) 145 (≥45 yrs)	122 (M) 39 (F)	117 (yes) 44 (no)	106 (yes) 55 (no)	NR	64(T1), 42(T2), 17(T3), 38 (T4)	118 (N0), 43 (N1-3)	48 (I), 36 (II), 31(III), 46(IV)
Kunkel et al (2002)	C(1), FM (10), G (6), Max/P (5), T (7), RT (6)	59	27 (M) 8 (F)	NR	NR	NR	NR	17 (N0), 6 (N1), 12 (N2)	8 (III), 27 (IV)
Kondo et al (2011)	BM(1), FM (5), G (43) Lips (3), OP (3), T (52)	63	61 (M) 46 (F)	NR	NR	WD (48), MD (45), PD (14)	16 (T1), 37 (T2), 28 (T3), 26 (T4)	65 (N0), 32(N1), 8(N2), 2 (N3)	14 (I), 25 (II), 41 (III), 27 (IV)
Sun et al (2015)	BM (30), G (22), Jaw (5), MF (3), P (7), T(40)	53 (<60 yrs) 54 (≥60 yrs)	61 (M) 46 (F)	NR	NR	NR	NR	NR	52 (I-II), 55 (III-IV)
Grimm et al (2013)	AR (22), BM (8), FM(64), Lips (11), P (15), T (41)	80 (<60 yrs) 81 (≥60 yrs)	122 (M) 39 (F)	NR	NR	NR	64 (T1), 42 (T2), 17 (T3), 38 (T4)	118 (N0), 43 (N1-3)	48 (I), 36 (II), 31 (III), 46 (IV)
Wang et al (2015)	BM (30), G (23), T (40) others(18)	52.8	60 (M) 61 (F)	NR	NR	NR	10 (T1), 29 (T2), 9 (T3-T4)	63 (N0), 48 (N+)	53 (I-II), 58 (III-IV)
Li et al (2015)	OSCC (65)	20 (<50 yrs) 45 (≥50 yrs)	55 (M) 10 (F)	NR	NR	WD/MD (58), PD(7)	47 (T1-T2), 18 (T3-T4)	44 (N0), 21 (N1- N2)	32 (I, II), 33 (III, IV)
Chen et al (2017)	OSCC (140)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Grimm et al (2013)	AR (27),BM (10),FM(84), Lips (11), P (17), T (42)	103(<62 yrs) 88 (≥62 yrs)	145 (M) 46 (F)	NR	NR	NR	75 (T1), 52 (T2), 18 (T3), 46 (T4)	133 (N0), 58 (N1-3)	57 (I), 42 (II), 34 (III), 58 (IV)
<i>Diagnosis</i>									

Shimizu et al (2016)	BM (1), FM (1), HP (1), LG (2), UG (15), T (49)	62	53 (M) 16 (F)	38 (yes) 31 (no)	NR	NR	14 (T2), 33 (T3), 22 (T4)	30 (N0), 13(N1), 23 (N2), 3 (N3)	8 (II), 20 (III), 41 (IV) A,B)
Kunkel et al (2005)	C (6), FM (11), Max/P (3), T (6), RT(6), otr (4)	58	NR	NR	NR	NR	NR	28 (N0), 6 (N1), 7 (N2)	16 (I), 7 (II), 5 (III), 13 (IV)
El-Hafez et al (2012)	AR (20), BM (49), FM(6), HP(1), Lip(2), T(38),RT(10)	49.5	8 (M) 118 (F)	110 (yes) 16 (no)	90 (yes) 36 (no)	WD (22), MD (82) PD (22)	65 (T2), 17 (T3), 44 (T4)	59 (N0), 21(N1), 39(N2b), 7(N2c)	34 (II), 25 (III), 67 (IV)
Hofele et al (2009)	OSCC (79)	62	60 (M) 19(F)	NR	NR	NR	22 (T1), 14 (T2), 7 (T3), 36 (T4)	38 (N0), 5 (N1), 35 (N2), 1 (N3)	21 (I), 10 (II), 4 (III), 44 (IV)
Kunkel et al (2003)	FM (31), G (10), Max/P (14), T (21), RT(9), otr (12)	55	NR	NR	NR	NR	NR	62 (N0), 15 (N1)m 20 (N2)	20 (I), 17 (II), 15 (III), 45 (IV)
Suzuki et al (2008)	OSCC (24)	12 (<61 yrs) 12 (≥61 yrs)	16 (M) 8 (F)	NR	NR	NR	7 (T1), 15 (T2), 1 (T3), 1 (T4)	21 (N0), 3 (N1- 2)	NR

^a Mean, median or interval

^b one paper related to diagnosis was described in glycolysis metabolism section

Abbreviations: AR, Alveolar ridge; BM, Buccal mucosa; C, Cheek; CG, Control group; F, Female; FM, Floor of mouth; HP, Hard Palate; P, Palate; LG, Lower gingiva; LNM, Lymph node metastasis; M, Male; Max, Maxilla; MD, Moderate Differentiate; N stage, node; na, not available; NR, not reported; OSCC, oral squamous cell carcinoma; Poor Differentiate; RT, Retromolar trigone; T, Tongue; ; T stage, tumor size UG, Upper gingiva; WD, Well differentiate; yrs, years

Table 2. Characteristics of the selected studies in the systematic review

Author (year)	Follow-up (months) ^a	Markers	Methods	p-value	Main Results
<i>Glycolysis pathway</i>					
Ohba et al (2010)	17.6	low or high GLUT1	IHC	p=0.046	The survival of patients who had overexpression of GLUT1 was significant shorter than that of patients with GLUT-1 weakly positive
Eckert et al (2011)	24.3	low GLUT1/ lowHIF1α low GLUT1/high HIF1α high GLUT1/low HIF1α high GLUT1/high HIF1α	IHC	p=0.017	Co-expression of high levels of HIF-1a and GLUT-1 is significantly correlated with prognosis in OSCC patients
Grimm et al (2014)	52.26	GLUT1 ⁺ /GLUT1 ⁻ GLUT1 ⁺ /TKTL1 ⁺ GLUT1 ⁺ /TKTL1 ⁻ GLUT1 ⁻ /TKTL1 ⁺ GLUT1 ⁻ /TKTL1 ⁻	IHC	p=0.0081 (GLUT1) p=0.0001 (GLUT1 ⁺ /TKTL1 ⁺)	GLUT1 expression and combined GLUT-1 ⁺ /TKTL1 ⁺ are associated with shorter survival in OSCC
Kunkel et al (2002)	74	Low or high GLUT1 in advanced or early stage SUV <5.6 or ≥5.6	FDG-PET-CT, IHC	p=0.045 (GLUT1 early) p=0.029 (GLUT1 advanced) p=0.038 (SUV)	High Glut-1 predicts an increased hazard of death in patients with both advanced disease and patients with early-stage disease. SUV≥ 5.6 was associated with an increased hazard of death
Kondo et al (2011)	60	CA9 <50% or ≥ 50%	IHC	p<0.05	CA9 higher expression was associated with worst prognosis
Sun et al (2015)	48	Low or high LDHB	IHC	p=0,001	LDHB high expression was associated with poor OS and DFS
Grimm et al (2013)	180	Low or high LDH5	IHC	p<0.0001	LDH5 high expression might be associated with tumor formation and metastasis
Wang et al (2015)	51.4	Low or high PKM2	IHC	p=0.010 (OV) p=0.008 (DS)	High PKM2 expression was significantly associated with short OS and DFS

Li et al (2015)	72	Low or high Aldoc	PCR	p=0.001 (DFS) p=0.035 (OSP)	Aldoc may be a prognosis marker clinically. High expression suppressed migration and invasion by its catalytic domain of Arg42 and Lys146
Chen et al (2016)	72	Low or high HMGCS2	RT-PCR	p<0.001	OSCC patients with low HMGCS2 expression survived significantly longer than did those with high HMGCS2 expression
Grimm et al (2013)	52.26	positive or negative Apo10 or TKTL1	IHC	p=0.0027 (Apo10) p<0.0001 (TKL1)	Apo10 and TKTL1 expression is significantly associated with poorer survival
Diagnosis					
Shimizu et al (2016)	26	RI< or ≥20.6 SUV <60.0 or ≥60.0%	FDG-PET-CT	p=0.013 (RI) p=0.001 (SUV)	Dual-time-point FDG-PET analysis may help predict outcomes for patients with OSCC
Kunkel et al (2005)	31	SUV≤4 or >4	FDG-PET-CT	p=0.01 (PET overall) p= 0.01 (SUV)	High FDGuptake (SUV > 4) was significantly associated with poor survival
El-Hafez et al (2012)	31.3	TLG <71.4 or ≥71.4	PET-CT	p= 0.007 (TLG)	Primary tumor TLG is an independent prognostic factor for cancer control and survival in patients with OSCC
Hofele et al (2009)	31.7	Low or high SUV	FDG-PET-CT	p=0.035 (OS) p=0.163 (DFS)	18FDG uptake detected by PET predicted adverse outcome of patients with OSCC
Kunkel et al (2003)	35.4	SUV=0.00-2.00 or SUV= 2.01-4.00 or SUV>4	FDG-PET-CT	p= 0.0089	High SUV was significantly associated with poor survival
Suzuki et al (2008)	38	SUV max <12 or ≥12	FDG-PET-CT	p<0.01	Patients with SUVmax ≥12 exhibited significant shorter overall survival than patients with SUVmax < 12
Suzuki et al (2009)	38	SUV max <12 or ≥12	FDG-PET-CT, IHC	p= 0.0052	Patients with SUVmax ≥12 exhibited significantly shorter 3-year overall survival than patients with SUVmax < 12. Tumor thickness≥=11.4 mm, depth of invasion ≥=11.8 mm and average Bcl-2 intensity≥=50% were significantly correlated with poor survival.

Zhan g et al (2014)	48	Lower or middle or upper MTV	PET-CT	p<0.001 (DR) p<0.05 (RD)	MTV delineated from PET-CT is an independent and robust prognostic marker for OCSCC treated with primary surgery. Cox-regression analysis showed an increase in MTV of 17.5 mL was associated with a 12.4 fold increase in risk of disease recurrence (p < 0.001) and a 11.2 fold increase in the risk of death (p < 0.05).
Joo et al (2013)	80	SUVmax > or ≤3.0 in patient	PET-CT	p=0.001	SUVmax >3.0 significantly predicted poor 5-year disease specific survival. N0/N+ECS+/N+ECS- were also found to be associated with 5-year disease specific survival (p = 0.001)
Cho et al (2015)	42	primary and node OS and DFS SUVmax MTV TLG	FDG-PET-CT	Univariate and multivariate analyses ^b	In univariate analyses, higher SUVmax, MTV and TLG values (different cut-off points) were associated to DFS worst prognosis for primary and node tumor (p<0.05), while OS worst prognosis was not associated to primary MTV and TLG values (p>0.05).

^a Mean, median or interval

^b Several p values

Abbreviations: ABTS, 2-2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinensulphonate]; Aldoc, fructose-bisphosphate aldolase C expression; Asb6, Ankyrin repeat SOCS box 6; CDGP, cis-diammine-glycolate platinum; DFS, disease-free survival; D-loop mtDNA, displacement loop of mitochondrial DNA; DTNB, 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; ECS, extracapsular spread; FDG, 2-deoxy-2-[fluorine-18]fluoro- D-glucose; GLUT1, Glucose transporter 1; GRP78, glucose-related protein 78; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; HIF-2 α , hypoxia-inducible factor 2 α ; HPA, heparanase; LNM, lymph node metastasis ; LPx, Lipid Peroxidation; MTV, Metabolic tumour volume; N stage, presence or absence of node (N0, N1, N2); OS, overall survival; PET-CT, Positron Emission Tomography-Computed Tomography ; SUV, standardized uptake value; SUV max, maximum standardized uptake value; TAS, Total Antioxidant Status; TBA, thiobarbituric acid; TLG, total lesion glycolysis; TKTL1, transketolase-like 1; TTL, Total Thiol Levels; vs, versus

References

- Abd El-Hafez, Y. G., Moustafa, H. M., Khalil, H. F., Liao, C. T., & Yen, T. C. (2013). Total lesion glycolysis: a possible new prognostic parameter in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 49(3), 261-268.
- Baffy, G., Derdak, Z., & Robson, S. C. (2011). Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *Br J Cancer*, 105(4), 469-474.
- Chen, S. W., Chou, C. T., Chang, C. C., Li, Y. J., Chen, S. T., Lin, I. C., . . . Lin, B. R. (2017). HMGCS2 enhances invasion and metastasis via direct interaction with PPARalpha to activate Src signaling in colorectal cancer and oral cancer. *Oncotarget*, 8(14), 22460-22476.
- Cho, J. K., Hyun, S. H., Choi, N., Kim, M. J., Padera, T. P., Choi, J. Y., & Jeong, H. S. (2015). Significance of lymph node metastasis in cancer dissemination of head and neck cancer. *Transl Oncol*, 8(2), 119-125.
- Coy, J. F. (2017). EDIM-TKTL1/Apo10 Blood Test: An Innate Immune System Based Liquid Biopsy for the Early Detection, Characterization and Targeted Treatment of Cancer. *Int J Mol Sci*, 18(4).
- Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 705-713.
- Eckert, A. W., Lautner, M. H., Schutze, A., Taubert, H., Schubert, J., & Bilkenroth, U. (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*, 58(7), 1136-1147.
- Genden, E. M., Ferlito, A., Silver, C. E., Takes, R. P., Suarez, C., Owen, R. P., . . . Rinaldo, A. (2010). Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267(7), 1001-1017.
- Grimm, M., Alexander, D., Munz, A., Hoffmann, J., & Reinert, S. (2013). Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 30(4), 529-540.
- Grimm, M., Munz, A., Teriete, P., Nadtotschi, T., & Reinert, S. (2014). GLUT-1(+)/TKTL1(+) coexpression predicts poor outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 117(6), 743-753.
- Grimm, M., Schmitt, S., Teriete, P., Biegner, T., Stenzl, A., Hennenlotter, J., . . . Coy, J. F. (2013). A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells. *BMC Cancer*, 13, 569.
- Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., . . . Ishii, H. (2014). Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(43), 15526-15531.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16(10), 635-649.
- Hofele, C., Freier, K., Thiele, O. C., Haberkorn, U., & Buchmann, I. (2009). High 2-[18F]fluoro-2-deoxy-d-glucose (18FDG) uptake measured by positron

- emission tomography is associated with reduced overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 45(11), 963-967.
- Huang, C., Huang, Z., Bai, P., Luo, G., Zhao, X., & Wang, X. (2018). Expression of pyruvate kinase M2 in human bladder cancer and its correlation with clinical parameters and prognosis. *Onco Targets Ther*, 11, 2075-2082.
- Ishikawa, S., Sugimoto, M., Kitabatake, K., Sugano, A., Nakamura, M., Kaneko, M., . . . Iino, M. (2016). Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Scientific Reports*, 6, 31520.
- Joo, Y. H., Yoo, I. R., Cho, K. J., Park, J. O., Nam, I. C., & Kim, M. S. (2013). Extracapsular spread and FDG PET/CT correlations in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 42(2), 158-163.
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., & Baba, Y. (2013). Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International*, 13, 89-89.
- Kondo, Y., Yoshikawa, K., Omura, Y., Shinohara, A., Kazaoka, Y., Sano, J., . . . Yamada, S. (2011). Clinicopathological significance of carbonic anhydrase 9, glucose transporter-1, Ki-67 and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 25(5), 1227-1233.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Simopoulos, C., Polychronidis, A., & Sivridis, E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*, 22(1), 25-30.
- Krockenberger, M., Honig, A., Rieger, L., Coy, J. F., Sutterlin, M., Kapp, M., . . . Kammerer, U. (2007). Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *Int J Gynecol Cancer*, 17(1), 101-106.
- Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472-482.
- Kunkel, M., Forster, G. J., Reichert, T. E., Jeong, J. H., Benz, P., Bartenstein, P., . . . Whiteside, T. L. (2003). Detection of recurrent oral squamous cell carcinoma by [18F]-2-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography: implications for prognosis and patient management. *Cancer*, 98(10), 2257-2265.
- Kunkel, M., Forster, G. J., Reichert, T. E., Kutzner, J., Benz, P., Bartenstein, P., & Wagner, W. (2003). Radiation response non-invasively imaged by [18F]FDG-PET predicts local tumor control and survival in advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 39(2), 170-177.
- Kunkel, M., Helisch, A., Reichert, T. E., Jeong, J. H., Buchholz, H. G., Benz, P., . . . Whiteside, T. L. (2006). Clinical and prognostic value of [(18)F]FDG-PET for surveillance of oral squamous cell carcinoma after surgical salvage therapy. *Oral Oncol*, 42(3), 297-305.
- Kunkel, M., Reichert, T. E., Benz, P., Lehr, H. A., Jeong, J. H., Wieand, S., . . . Whiteside, T. L. (2003). Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 97(4), 1015-1024.
- Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., Brindle, K., Chekmenev, E. Y., Comment, A., Cunningham, C. H., . . . Malloy, C. R. (2011). Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: prospects for translation to clinical research. *Neoplasia*, 13(2), 81-97.

- Li, Y. J., Huang, T. H., Hsiao, M., Lin, B. R., Cheng, S. J., Yang, C. N., . . . Chang, C. C. (2016). Suppression of fructose-bisphosphate aldolase C expression as a predictor of advanced oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 38 Suppl 1, E1075-1085.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pages, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1), 11-31.
- Ohba, S., Fujii, H., Ito, S., Fujimaki, M., Matsumoto, F., Furukawa, M., . . . Hino, O. (2010). Overexpression of GLUT-1 in the invasion front is associated with depth of oral squamous cell carcinoma and prognosis. *J Oral Pathol Med*, 39(1), 74-78.
- Papagerakis, S., Pannone, G., Zheng, L., About, I., Taqi, N., Nguyen, N. P., . . . Papagerakis, P. (2014). Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res*, 325(2), 111-129.
- Ram, H., Sarkar, J., Kumar, H., Konwar, R., Bhatt, M. L., & Mohammad, S. (2011). Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *J Maxillofac Oral Surg*, 10(2), 132-137.
- Scully, C., & Bagan, J. (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 45(4-5), 301-308.
- Shimizu, M., Mitsudo, K., Koike, I., Taguri, M., Iwai, T., Koizumi, T., . . . Tohnai, I. (2016). Prognostic value of 2-[(18) F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography for patients with oral squamous cell carcinoma treated with retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 121(3), 239-247.
- Song, Y., Liu, D., & He, G. (2015). TKTL1 and p63 are biomarkers for the poor prognosis of gastric cancer patients. *Cancer Biomark*, 15(5), 591-597.
- Su, S. G., Yang, M., Zhang, M. F., Peng, Q. Z., Li, M. Y., Liu, L. P., & Bao, S. Y. (2017). miR-107-mediated decrease of HMGCS2 indicates poor outcomes and promotes cell migration in hepatocellular carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*, 91(Pt A), 53-59.
- Sun, W., Zhang, X., Ding, X., Li, H., Geng, M., Xie, Z., . . . Huang, M. (2015). Lactate dehydrogenase B is associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 10(5), e0125976.
- Suzuki, H., Fukuyama, R., Hasegawa, Y., Tamaki, T., Nishio, M., Nakashima, T., & Tatematsu, M. (2009). Tumor thickness, depth of invasion, and Bcl-2 expression are correlated with FDG-uptake in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 45(10), 891-897.
- Suzuki, H., Hasegawa, Y., Terada, A., Hyodo, I., Nakashima, T., Nishio, M., & Tamaki, T. (2009). FDG-PET predicts survival and distant metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 45(7), 569-573.
- Tanaka, T., & Ishigamori, R. (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*, 2011, 603740.
- Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9), 671-684.
- Wang, C., Jiang, J., Ji, J., Cai, Q., Chen, X., Yu, Y., . . . Zhang, J. (2017). PKM2 promotes cell migration and inhibits autophagy by mediating PI3K/AKT

- activation and contributes to the malignant development of gastric cancer. *Sci Rep*, 7(1), 2886.
- Wang, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Zhu, Y., Yuan, C., Qi, B., . . . Cheng, J. (2015). Overexpression of pyruvate kinase M2 associates with aggressive clinicopathological features and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 16(6), 839-845.
- Xu, Q., Tu, J., Dou, C., Zhang, J., Yang, L., Liu, X., . . . Tu, K. (2017). HSP90 promotes cell glycolysis, proliferation and inhibits apoptosis by regulating PKM2 abundance via Thr-328 phosphorylation in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 16(1), 178.
- Zhang, H., Seikaly, H., Abele, J. T., Jeffery, D. T., Harris, J. R., & O'Connell, D. A. (2014). Metabolic tumour volume as a prognostic factor for oral cavity squamous cell carcinoma treated with primary surgery. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 43, 33.

Capítulo II

Considerando que os fatores envolvidos no metabolismo são indicativos de prognóstico clínico dos pacientes com CEC, o entendimento das alterações mitocondriais poderia contribuir como ferramenta para individualização de tratamento de pacientes com DPMs e CECs bucais. Assim, modificações na morfologia e número de mitocôndrias pode ser um indicativo de alteração de atividade/funcionalidade mitocondrial em epitélios normais, displásicos e tumorais.

Nesse contexto, este capítulo apresentará a descrição de resultados experimentais parciais relacionados à análise do perfil mitocondrial em linhagens celulares de queratinócitos e de carcinoma espinocelular oral.

Artigo 2

Resumo

Introdução: Considerando que os fatores envolvidos no metabolismo são indicativos de prognóstico clínico dos pacientes com CEC, o entendimento das alterações mitocondriais poderia contribuir como ferramenta para individualização de tratamento de pacientes com DPMs e CECs bucais. Assim, modificações na morfologia e número de mitocôndrias pode ser um indicativo de alteração de atividade/funcionalidade mitocondrial em epitélios normais, displásicos e tumorais. **Objetivos:** o presente estudo visa analisar a morfofometria e atividade mitocondrial de queratinócitos (HACAT) e de células de OSCC (SCC9 e SCC25). **Metodologia e Resultados preliminares:** As amostras celulares foram processadas, submetidas a microscopia eletrônica de transmissão e imagens seriadas obtidas de cada amostra. Até o momento 6 imagens de cada tipo celular foram capturadas. Em avaliação preliminar, foram identificadas mitocôndrias com morfologia compatível com normalidade em todos os tipos celulares. Dentre as alterações morfológicas, estiveram presentes as cristólises parciais e totais e, em relação a funcionalidade mitocondrial, situações de fissão e fusão foram identificadas. No seguimento da pesquisa, as imagens serão analisadas no software Image J, pelo qual serão avaliados: (1) o número de mitocôndrias por células e; (2) a morfologia das mitocôndrias em relação ao tamanho (medida de área mitocondrial), presença de cristólise parcial, total, fissão e fusão. A análise dos dados coletados será realizada no software SPSS17. A comparação entre os grupos será realizada com o teste One Way Anova, considerado um $p < 0,05$. Espera-se um aumento no número e alteração na morfologia das mitocôndrias quando comparadas lesões displásicas e carcinomas espinocelulares.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular, mitocôndria, MET

Introdução

Com o objetivo de estabelecer recursos terapêuticos mais eficazes e diminuir as elevadas taxas de mortalidade do câncer, um número expressivo de pesquisas científicas têm sido desenvolvidas para investigar os mecanismos envolvidos na indução, progressão e invasão tumoral (S. W. Chen et al., 2017). A alta demanda energética necessária para manter os processos de rápida divisão celular em tumores malignos, indica que o metabolismo tumoral talvez possa ser um ponto chave no processo de carcinogênese, tornando a compreensão das alterações na funcionalidade mitocondrial fundamentais (van der Mijn, Panka, Geissler, Verheul, & Mier, 2016).

O carcinoma espinocelular (CEC) bucal possui alta dependência glicolítica. Quando fatores envolvidos no metabolismo energético, como GLUT1, LDH e HIF, estão super-expressos em CEC bucais, piores prognósticos são relacionados, com menores taxa de sobrevida para os pacientes (Eckert et al., 2011; Grimm, Schmitt, et al., 2013; Sun et al., 2015). Talvez, esses fatores estejam relacionados a baixa taxa de sucesso dos tratamentos nesse tipo de tumor, que não atingem mais do 50% de taxa de sobrevida em 5 anos (Albuquerque & Richards, 2016; Sun et al., 2015).

As alterações no metabolismo podem ser indiretamente avaliadas pelas modificações na morfologia e número de mitocôndrias. Alteração da dinâmica mitocondrial tem sido associada a alterações na fisiologia da mitocôndria e ocasionando funções anormais nas células, implicando vários tipos de doenças humanas (Picard et al., 2015). Esse indicativo de alteração de atividade/funcionalidade mitocondrial talvez possa ser um critério para classificar o risco de pacientes com desordens potencialmente malignas (DPMs) a desenvolverem CEC e, nos casos de CEC já estabelecidos, possam apontar os casos com maiores chances de recidiva e metástases. Dentre as modificações mitocondriais estão: a cristólise, a fissão e a fusão.

A cristólise consiste na perda gradativa das cristas mitocondriais devido a hipóxia que leva a um aumento dos níveis de cálcio no interior da mitocôndria. Essa modificação na concentração deste íon, não é evitada devido a produção

insuficiente de antioxidantes pela célula. Algumas células tumorais escapam desta deterioração mitocondrial, já que mesmo antes do aumento do influxo de cálcio já produzem uma maior quantidade de antioxidantes (Gatenby & Gillies, 2004; Hay, 2016; Martinez-Outschoorn et al., 2017). Já o desequilíbrio na fissão e na fusão desregulam os processos metabólicos celulares, potencialmente contribuindo para desenvolvimento do tumor. Estudo recente demonstrou excesso de fissão e, conseqüente comprometimento mitocondrial, em linhagens celulares de câncer de pulmão humano (Zhao et al., 2013).

Considerando que os fatores envolvidos no metabolismo são indicativos de prognóstico clínico dos pacientes com CEC, o entendimento das alterações mitocondriais poderia contribuir como ferramenta para individualização de tratamento de pacientes com DPMs e CECs bucais. Assim, as modificações na morfologia mitocôndrias foram observadas nesse estudo piloto em linhagens celulares de queratinócitos e de carcinoma espinocelular oral.

Metodologia

Amostras

Células HACAT (queratinócitos – similar a epitélio normal – ATCC® PCS-200-011TN TM), CAL27 (CEC bucal similar a displasia – ATCC® CRL-2095 TM), SCC25 (CEC bucal invasivo– ATCC® CRL-1628 TM) e SCC9 foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Gibco) com altos níveis de glicose (HACAT e CAL27) ou DMEM/DMEM F12 (SCC25). Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco). Para SCC25, foi adicionado 400ng/ml de hidrocortisona.

MET

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 100mm e mantidas até atingirem a confluência de 70%. As células foram tripsinizadas, centrifugadas (1.000 rpm, 5min, temperatura ambiente – TA), o pellet foi fixado com glutaraldeído 2,5% e seguiram o protocolo de rotina para inclusão de amostras em resina para MET e cortes seriados ultrafinos. A cada corte uma imagem será gravada e, das imagens obtidas, uma imagem aleatória será selecionada para a realização das análises de medidas. As análises serão feitas por meio do uso do software ImageJ.

Análise dos Dados

A partir das imagens capturadas pretende-se identificar e diferenciar as mitocôndrias quanto: (1) o número de mitocôndrias por célula; (2) a morfologia

das mitocôndrias em relação ao tamanho, ruptura da membrana externa e membrana interna com presença ou ausência de cristas.

5.6 Análise Estatística

Os dados coletados serão avaliados no *software* SPSS 17. A comparação entre os grupos será realizada com o teste One Way Anova, considerado um $p < 0,05$.

Resultados Parciais

Até o momento 6 imagens de cada tipo celular foram capturadas. Foram observadas mitocôndrias com morfologia compatível com normalidade funcional, apresentando estruturas delimitadas por duas membranas (interna e externa) e com contorno lembrando uma elipse. A porção interna mitocondrial apresentou espaço interno preenchido por cristas (Figura 1). Dentre as alterações morfológicas, as alterações de cristas mitocondriais foram observadas, caracterizando as cristólises parciais e totais, quando a ausência de cristas foi parcial ou total, respectivamente (Figura 2). Quanto à funcionalidade mitocondrial, situações de fissão e fusão foram identificadas (Figura 2).

Conclusões Preliminares

Em avaliação preliminar, foram identificadas mitocôndrias com morfologia compatível com normalidade em todos os tipos celulares (Figura 3) e com as alterações mitocondriais (fissão e fusão demonstradas na Figura 3, em SCC9 e SCC25, respectivamente). Dentre as alterações morfológicas, estiveram presentes as cristólises parciais e totais e, em relação a funcionalidade mitocondrial, situações de fissão e fusão foram identificadas. Para o estudo

comparativo das características mitocondriais observadas durante a realização do estudo piloto entre Hacat, SCC9 e SCC25, há a necessidade da captura de maior número de imagens e da quantificação/análise das mitocôndrias.

Referências

- Chen, S. W., Chou, C. T., Chang, C. C., Li, Y. J., Chen, S. T., Lin, I. C., . . . Lin, B. R. (2017). HMGCS2 enhances invasion and metastasis via direct interaction with PPARalpha to activate Src signaling in colorectal cancer and oral cancer. *Oncotarget*, 8(14), 22460-22476.
- van der Mijn, J. C., Panka, D. J., Geissler, A. K., Verheul, H. M., & Mier, J. W. (2016). Novel drugs that target the metabolic reprogramming in renal cell cancer. *Cancer & Metabolism*, 4, 14.
- Eckert, A. W., Lautner, M. H., Schutze, A., Taubert, H., Schubert, J., & Bilkenroth, U. (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*, 58(7), 1136-1147.
- Grimm, M., Alexander, D., Munz, A., Hoffmann, J., & Reinert, S. (2013). Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 30(4), 529-540.
- Sun, W., Zhang, X., Ding, X., Li, H., Geng, M., Xie, Z., . . . Huang, M. (2015). Lactate dehydrogenase B is associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 10(5), e0125976.
- Albuquerque, R. P. P., & Richards, A. (2016). Squamous-Cell Carcinoma of the Tongue. *New England Journal of Medicine*, 374(25), e32.
- Picard, M., McManus, M. J., Csordas, G., Varnai, P., Dorn, G. W., 2nd, Williams, D., . . . Wallace, D. C. (2015). Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nat Commun*, 6, 6259.
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4(11), 891-899.
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16(10), 635-649.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pages, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1), 11-31.
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., . . . Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 32(40), 4814-4824.

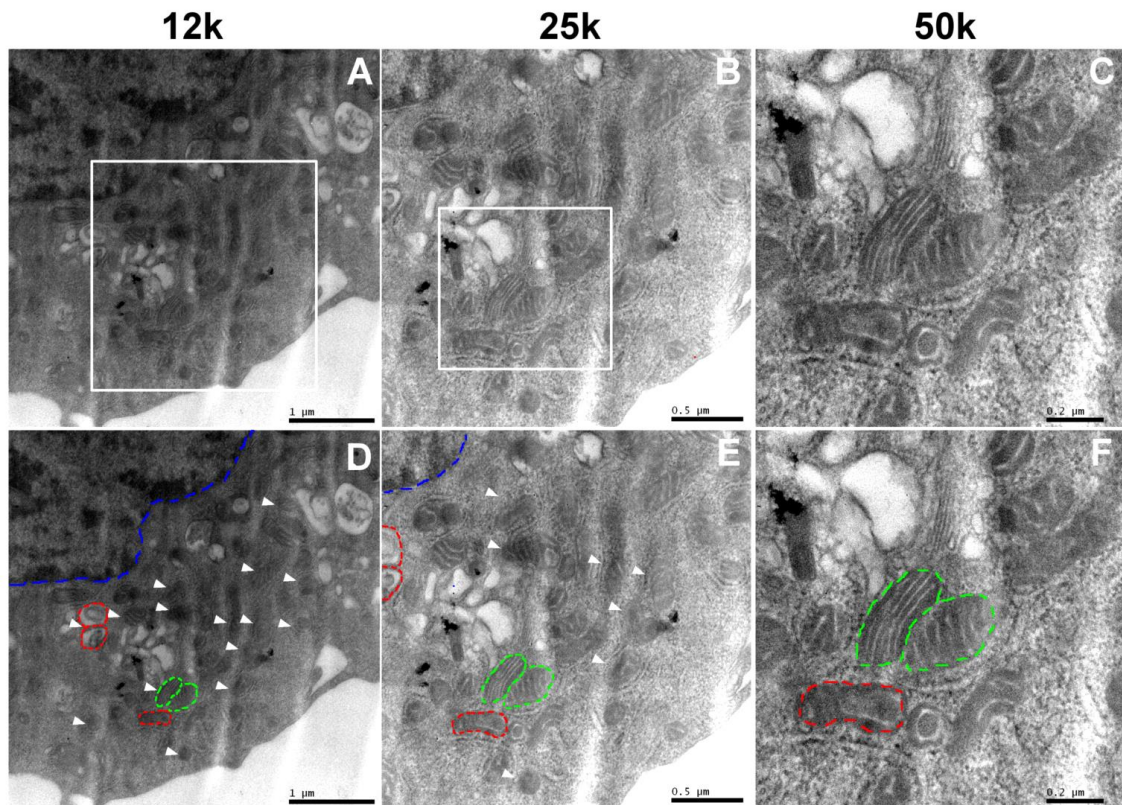


Figura 1. Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão de células de linhagem epitelial (HACAT). Nessas imagens, é possível identificar a morfologia mitocondrial compatível com normalidade (pontilhado verde) e não normalidade (pontilhado vermelho). A área nuclear está delimitada pelo pontilhado em azul. Magnificação de 12k, 25k e 50k; áreas limitadas pelos quadrados (A e B) indicam a região observada na imagem seguinte.

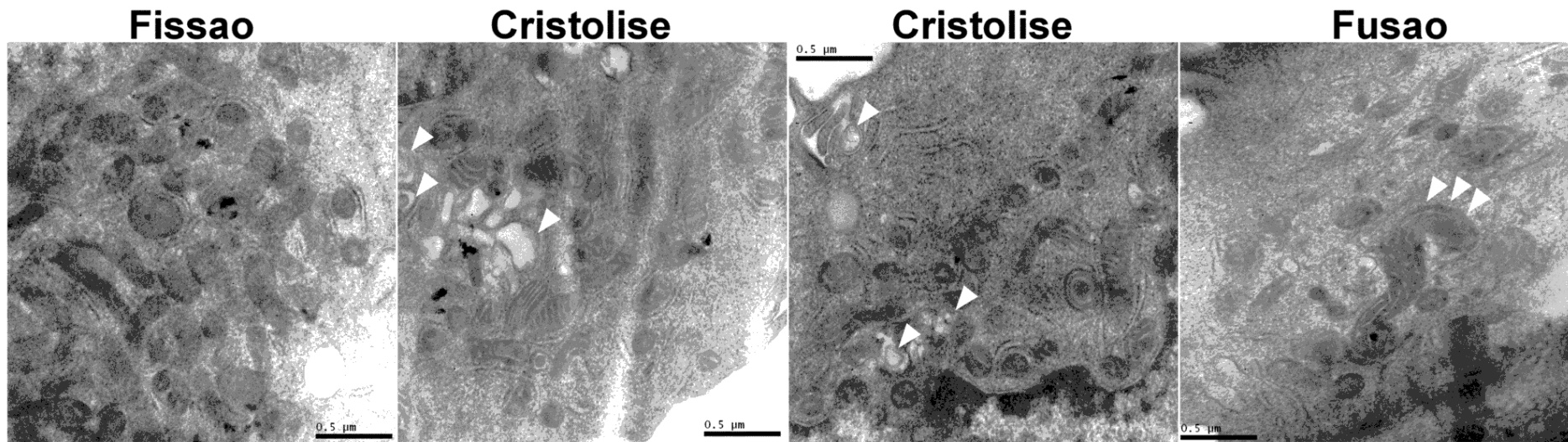


Figura 2. Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão de células de linhagem epitelial, apresentando a morfologia característica das alterações mitocondriais de cristólise parcial (ausência parcial das cristas mitocôndriais) e cristólise total (ausência total das cristas mitocôndriais) e a organização mitocondrial representativa de fissão e fusão mitocondriais. Magnificação de 50k.

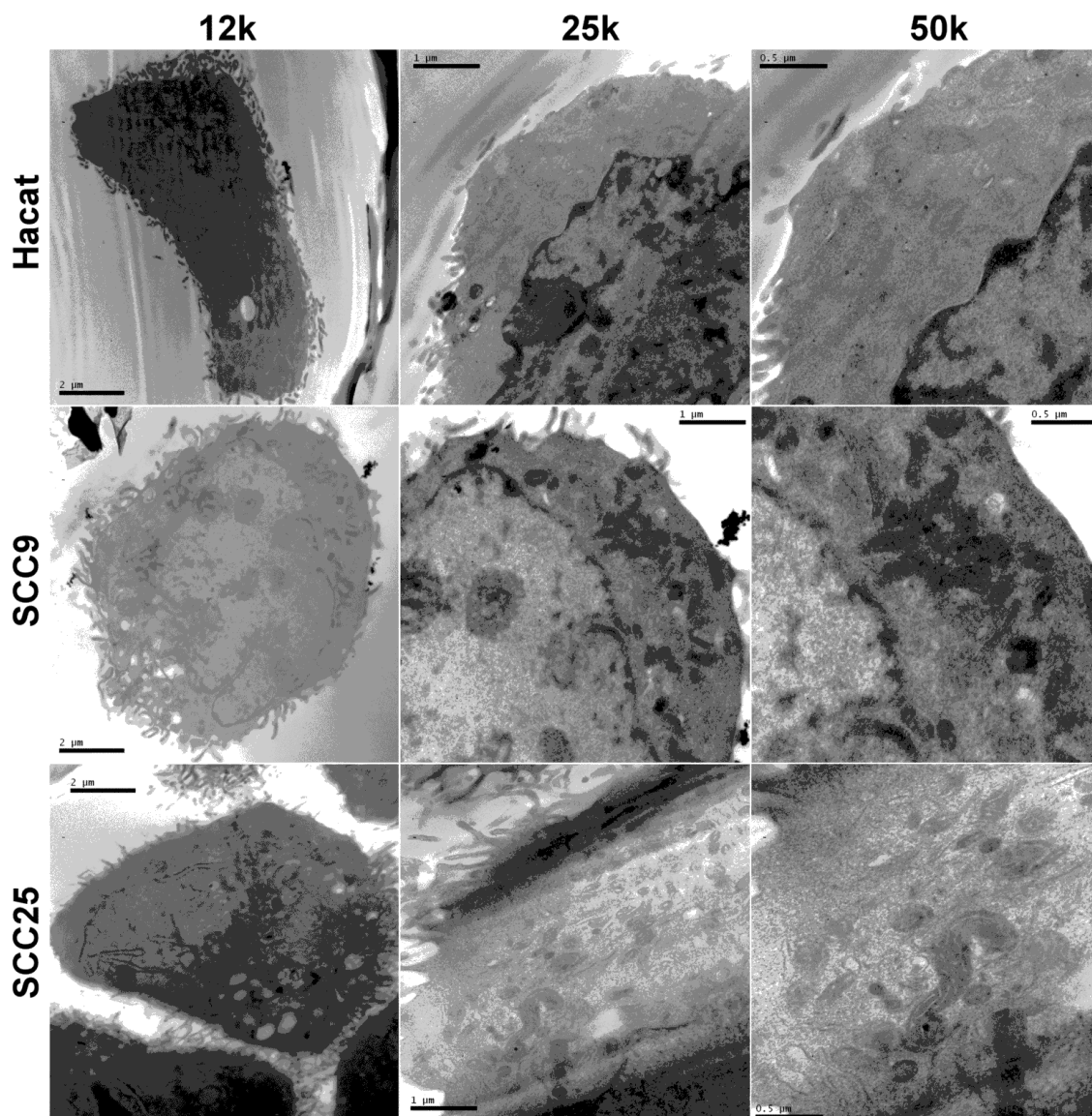


Figura 3. Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão de células de linhagem epitelial (HACAT, SCC9 e SCC25), demonstrando a morfologia e a organização mitocondrial. Magnificação de 12k, 25k e 50k.

Considerações Finais

Alterações mitocondriais e metabolismo energético tumoral tem sido associada a alterações na fisiologia da mitocôndria e ocasionando funções anormais nas células, implicando a vários tipos de doenças humanas. Por esse motivo é que o estudo dos fatores que influenciam a adaptação das células cancerígenas, como o metabolismo, é de fundamental importância. Altos níveis de fatores envolvidos no metabolismo energéticos como GLUT1, LDH e HIF, quando relatados estarem superexpressos em pacientes com carcinoma espinocelular bucal, foram um indicativo de pior prognóstico clínico, apresentando relação com as menores taxa de sobrevida para os pacientes. Isso demonstra que a funcionalidade mitocondrial pode contribuir como ferramenta para individualização dos tratamentos anti-tumorais.

REFERÊNCIAS

- Abd El-Hafez, Y. G., Moustafa, H. M., Khalil, H. F., Liao, C. T., & Yen, T. C. (2013). Total lesion glycolysis: a possible new prognostic parameter in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 49(3), 261-268.
- Alamgir, M. M., Jamal, Q., & Mirza, T. (2016). Conventional clinical and prognostic variables in 150 oral squamous cell carcinoma cases from the indigenous population of Karachi. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 32(3), 672-676.
- Alberts, B., Watson, J., Bray, D., Lewis, J. (2015). *C Biologia Molecular da Célula* 5ª Ed. *Artmed*, 1392p.
- Albuquerque, R. P. P., & Richards, A. (2016). Squamous-Cell Carcinoma of the Tongue. *New England Journal of Medicine*, 374(25), e32.
- Antunes, L. C. M., Prolla, J. C., de Barros Lopes, A., da Rocha, M. P., & Fagundes, R. B. (2013). No evidence of HPV DNA in esophageal squamous cell carcinoma in a population of Southern Brazil. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(39), 6598-6603.
- Arismendi-Morillo, G. (2009). Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(10), 2062-2068.
- Arismendi-Morillo, G. (2011). Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in gliomas and their vascular microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, 1807(6), 602-608.
- Baffy, G., Derdak, Z., & Robson, S. C. (2011). Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *Br J Cancer*, 105(4), 469-474.
- Bartolak-Suki, E., Imsirovic, J., Nishibori, Y., Krishnan, R., & Suki, B. (2017). Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *Int J Mol Sci*, 18(8).
- Bernardi, P., Di Lisa, F., Fogolari, F., & Lippe, G. (2015). From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase. *Circ Res*, 116(11), 1850-1862.
- Bhatti, J. S., Kumar, S., Vijayan, M., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Therapeutic Strategies for Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Age-Related Metabolic Disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 146, 13-46.
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). *Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight*. In *Nat Rev Cancer* (pp. 227-232). England
- Chan, J. S. K., Tan, M. J., Sng, M. K., Teo, Z., Phua, T., Choo, C. C., . . . Tan, N. S. (2017). Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. *Cell Death & Disease*, 8(1), e2562.
- Chen, L., Yang, Y., Liu, S., Piao, L., Zhang, Y., Lin, Z., & Li, Z. (2014). High expression of leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 predicts poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int*, 2014, 850316.
- Chen, S. W., Chou, C. T., Chang, C. C., Li, Y. J., Chen, S. T., Lin, I. C., . . . Lin, B. R. (2017). HMGCS2 enhances invasion and metastasis via direct interaction with PPARalpha to activate Src signaling in colorectal cancer and oral cancer. *Oncotarget*, 8(14), 22460-22476.
- Cheng, Y., Sun, Y., Wang, L. Z., Yu, Y. C., & Ding, X. (2015). Cytoplasmic c-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase expression may be associated with

- the development of human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 10(2), 934-940.
- Cho, J. K., Hyun, S. H., Choi, N., Kim, M. J., Padera, T. P., Choi, J. Y., & Jeong, H. S. (2015). Significance of lymph node metastasis in cancer dissemination of head and neck cancer. *Transl Oncol*, 8(2), 119-125.
- Clemençon, B., Fine, M., & Hediger, M. A. (2016). Conservation of the oligomeric state of native VDAC1 in detergent micelles. *Biochimie*, 127, 163-172.
- Corbet, C., & Feron, O. (2017). Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer*, 17(10), 577-593.
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., . . . Reed, J. C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res*, 62(22), 6674-6681.
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200.
- Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 705-713.
- Devic, S. (2016). Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J Cancer*, 7(7), 817-822.
- Dimmer, K. S., & Scorrano, L. (2006). (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda)*, 21, 233-241.
- Eckert, A. W., Lautner, M. H., Schütze, A., Taubert, H., Schubert, J., & Bilkenroth, U. (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 α and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*, 58(7), 1136-1147.
- Feng, X., Luo, Q., Zhang, H., Wang, H., Chen, W., Meng, G., & Chen, F. (2017). The role of NLRP3 inflammasome in 5-fluorouracil resistance of oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 36(1), 81.
- Fujioka, H., Tandler, B., Consolo, M. C., & Karnik, P. (2013). Division of mitochondria in cultured human fibroblasts. *Microsc Res Tech*, 76(12), 1213-1216.
- Gao, Y., Zhuang, Z., Gao, S., Li, X., Zhang, Z., Ye, Z., . . . Li, J. (2017). Tetrahydrocurcumin reduces oxidative stress-induced apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway by modulating autophagy in rats after traumatic brain injury. *Am J Transl Res*, 9(3), 887-899.
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4(11), 891-899.
- Genden, E. M., Ferlito, A., Silver, C. E., Takes, R. P., Suarez, C., Owen, R. P., . . . Rinaldo, A. (2010). Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267(7), 1001-1017.
- Giri, D., Agarwal, N., Sinha, A., Srivastava, S., & Mishra, A. (2016). Diode laser: In treatment of recurrent verrucous leukoplakia. *Contemporary Clinical Dentistry*, 7(2), 250-254.
- Griffiths, H. R., Gao, D., & Pararasa, C. (2017). Redox regulation in metabolic programming and inflammation. *Redox Biol*, 12, 50-57.
- Grimm, M., Alexander, D., Munz, A., Hoffmann, J., & Reinert, S. (2013). Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 30(4), 529-540.

- Grimm, M., Cetindis, M., Lehmann, M., Biegner, T., Munz, A., Teriete, P., . . . Reinert, S. (2014). Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis - indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? *J Transl Med*, 12, 208.
- Grimm, M., Munz, A., Teriete, P., Nadtotschi, T., & Reinert, S. (2014). GLUT-1(+)/TKTL1(+) coexpression predicts poor outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 117(6), 743-753.
- Grimm, M., Schmitt, S., Teriete, P., Biegner, T., Stenzl, A., Hennenlotter, J., . . . Coy, J. F. (2013). A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells. *BMC Cancer*, 13, 569.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16(10), 635-649.
- Hofele, C., Freier, K., Thiele, O. C., Haberkorn, U., & Buchmann, I. (2009). High 2-[18F]fluoro-2-deoxy-d-glucose (18FDG) uptake measured by positron emission tomography is associated with reduced overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 45(11), 963-967.
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703-707.
- Huang, C. F., Zhang, L., Ma, S. R., Zhao, Z. L., Wang, W. M., He, K. F., . . . Sun, Z. J. (2013). Clinical significance of Keap1 and Nrf2 in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 8(12), e83479.
- Hung, K. F., Lai, K. C., Liu, T. Y., Liu, C. J., Lee, T. C., & Lo, J. F. (2009). Asb6 upregulation by Areca nut extracts is associated with betel quid-induced oral carcinogenesis. *Oral Oncol*, 45(6), 543-548.
- Inui, T., Chano, T., Takikita-Suzuki, M., Nishikawa, M., Yamamoto, G., & Okabe, H. (2013). Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. *PLoS One*, 8(9), e74398.
- Iommarini, L., Ghelli, A., Gasparre, G., & Porcelli, A. M. (2017). Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1858(8), 582-590.
- Ishikawa, S., Sugimoto, M., Kitabatake, K., Sugano, A., Nakamura, M., Kaneko, M., . . . Iino, M. (2016). Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Scientific Reports*, 6, 31520.
- Jimson, S., Murali, S., Zunt, S. L., Goldblatt, L. I., & Srinivasan, M. (2016). Epithelial expression of keratinocytes growth factor in oral precancer lesions. *Dental Research Journal*, 13(3), 199-205.
- Joo, Y. H., Yoo, I. R., Cho, K. J., Park, J. O., Nam, I. C., & Kim, M. S. (2013). Extracapsular spread and FDG PET/CT correlations in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 42(2), 158-163.
- Khan, Z., Khan, S., Christianson, L., Rehman, S., Ekwunife, O., & Samkange-Zeeb, F. (2016). Smokeless tobacco and oral potentially malignant disorders in South Asia: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*, 5(1), 142.
- Kim, J., & Bae, J. S. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Exp Mol Med*, 48(11), e269.

- Kinugasa, H., Whelan, K. A., Tanaka, K., Natsuizaka, M., Long, A., Guo, A., . . . Nakagawa, H. (2015). Mitochondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*, 34(41), 5229-5239.
- Kondo, Y., Yoshikawa, K., Omura, Y., Shinohara, A., Kazaoka, Y., Sano, J., . . . Yamada, S. (2011). Clinicopathological significance of carbonic anhydrase 9, glucose transporter-1, Ki-67 and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 25(5), 1227-1233.
- Kunkel, M., Forster, G. J., Reichert, T. E., Jeong, J. H., Benz, P., Bartenstein, P., . . . Whiteside, T. L. (2003). Detection of recurrent oral squamous cell carcinoma by [18F]-2-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography: implications for prognosis and patient management. *Cancer*, 98(10), 2257-2265.
- Kunkel, M., Forster, G. J., Reichert, T. E., Kutzner, J., Benz, P., Bartenstein, P., & Wagner, W. (2003). Radiation response non-invasively imaged by [18F]FDG-PET predicts local tumor control and survival in advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 39(2), 170-177.
- Kunkel, M., Helisch, A., Reichert, T. E., Jeong, J. H., Buchholz, H. G., Benz, P., . . . Whiteside, T. L. (2006). Clinical and prognostic value of [(18)F]FDG-PET for surveillance of oral squamous cell carcinoma after surgical salvage therapy. *Oral Oncol*, 42(3), 297-305.
- Kunkel, M., Reichert, T. E., Benz, P., Lehr, H. A., Jeong, J. H., Wieand, S., . . . Whiteside, T. L. (2003). Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 97(4), 1015-1024.
- Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., Brindle, K., Chekmenev, E. Y., Comment, A., Cunningham, C. H., . . . Malloy, C. R. (2011). Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: prospects for translation to clinical research. *Neoplasia*, 13(2), 81-97.
- Lai, C. H., Huang, S. F., Chen, I. H., Liao, C. T., Wang, H. M., & Hsieh, L. L. (2012). The mitochondrial DNA Northeast Asia CZD haplogroup is associated with good disease-free survival among male oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One*, 7(11), e49684.
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.-G., & Ghanbari, H. A. (2013). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24438-24475.
- Li, Y. J., Huang, T. H., Hsiao, M., Lin, B. R., Cheng, S. J., Yang, C. N., . . . Chang, C. C. (2016). Suppression of fructose-bisphosphate aldolase C expression as a predictor of advanced oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 38 Suppl 1, E1075-1085.
- Lin, C. Y., Lin, T. Y., Wang, H. M., Huang, S. F., Fan, K. H., Liao, C. T., . . . Chang, J. T. (2011). GP96 is over-expressed in oral cavity cancer and is a poor prognostic indicator for patients receiving radiotherapy. *Radiat Oncol*, 6, 136.
- Liu, S. A., Jiang, R. S., Chen, F. J., Wang, W. Y., & Lin, J. C. (2012). Somatic mutations in the D-loop of mitochondrial DNA in oral squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269(6), 1665-1670.
- Luo, F., Shinzawa-Itoh, K., Hagimoto, K., Shimada, A., Shimada, S., Yamashita, E., . . . Tsukihara, T. (2018). Structure of bovine cytochrome c oxidase in

- the ligand-free reduced state at neutral pH. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 74(Pt 2), 92-98.
- Ma, D., Pignanelli, C., Tarade, D., Gilbert, T., Noel, M., Mansour, F., . . . Pandey, S. (2017). Cancer Cell Mitochondria Targeting by Pancreatistatin Analogs is Dependent on Functional Complex II and III. *Sci Rep*, 7, 42957.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pages, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1), 11-31.
- Maycotte, P., Marin-Hernandez, A., Goyri-Aguirre, M., Anaya-Ruiz, M., Reyes-Leyva, J., & Cortes-Hernandez, P. (2017). Mitochondrial dynamics and cancer. *Tumour Biol*, 39(5), 1010428317698391.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 16(14), R551-560.
- Minsky, N., & Roeder, R. G. (2015). Direct link between metabolic regulation and the heat-shock response through the transcriptional regulator PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(42), E5669-5678.
- Mookerjee, S. A., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G., & Brand, M. D. (2017). Quantifying Intracellular Rates of Glycolytic and Oxidative ATP Production and Consumption Using Extracellular Flux Measurements. *J Biol Chem*.
- Oeffinger, K. C., Baxi, S. S., Novetsky Friedman, D., & Moskowitz, C. S. (2013). Solid tumor second primary neoplasms: who is at risk, what can we do? *Semin Oncol*, 40(6), 676-689.
- Ohba, S., Fujii, H., Ito, S., Fujimaki, M., Matsumoto, F., Furukawa, M., . . . Hino, O. (2010). Overexpression of GLUT-1 in the invasion front is associated with depth of oral squamous cell carcinoma and prognosis. *J Oral Pathol Med*, 39(1), 74-78.
- Papagerakis, S., Pannone, G., Zheng, L., About, I., Taqi, N., Nguyen, N. P., . . . Papagerakis, P. (2014). Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res*, 325(2), 111-129.
- Patel, B. P., Rawal, U. M., Dave, T. K., Rawal, R. M., Shukla, S. N., Shah, P. M., & Patel, P. S. (2007). Lipid peroxidation, total antioxidant status, and total thiol levels predict overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Integr Cancer Ther*, 6(4), 365-372.
- Picard, M., McManus, M. J., Csordas, G., Varnai, P., Dorn, G. W., 2nd, Williams, D., . . . Wallace, D. C. (2015). Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nat Commun*, 6, 6259.
- Ram, H., Sarkar, J., Kumar, H., Konwar, R., Bhatt, M. L., & Mohammad, S. (2011). Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *J Maxillofac Oral Surg*, 10(2), 132-137.
- Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Chen, M. Y., & Bezrukov, S. M. (2012). Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem*, 287(35), 29589-29598.
- Scully, C., & Bagan, J. (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 45(4-5), 301-308.
- Shimizu, M., Mitsudo, K., Koike, I., Taguri, M., Iwai, T., Koizumi, T., . . . Tohnai, I. (2016). Prognostic value of 2-[(18) F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography for patients with oral squamous cell carcinoma treated with retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and

- daily concurrent radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 121(3), 239-247.
- Sun, W., Zhang, X., Ding, X., Li, H., Geng, M., Xie, Z., . . . Huang, M. (2015). Lactate dehydrogenase B is associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 10(5), e0125976.
- Suzuki, H., Fukuyama, R., Hasegawa, Y., Tamaki, T., Nishio, M., Nakashima, T., & Tatematsu, M. (2009). Tumor thickness, depth of invasion, and Bcl-2 expression are correlated with FDG-uptake in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 45(10), 891-897.
- Suzuki, H., Hasegawa, Y., Terada, A., Hyodo, I., Nakashima, T., Nishio, M., & Tamaki, T. (2009). FDG-PET predicts survival and distant metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 45(7), 569-573.
- Szabo, I., & Zoratti, M. (2014). Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*, 94(2), 519-608.
- Tanaka, T., & Ishigamori, R. (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*, 2011, 603740.
- Teicher, B. A. (2014). Antibody drug conjugates. *Curr Opin Oncol*, 26(5), 476-483.
- van der Mijn, J. C., Panka, D. J., Geissler, A. K., Verheul, H. M., & Mier, J. W. (2016). Novel drugs that target the metabolic reprogramming in renal cell cancer. *Cancer & Metabolism*, 4, 14.
- Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9), 671-684.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Varanita, T., Soriano, M. E., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., . . . Scorrano, L. (2015). The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. *Cell Metab*, 21(6), 834-844.
- Voccoli, V., & Colombaioni, L. (2009). Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts. *Brain Res*, 1252, 15-29.
- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555-566.
- Wang, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Zhu, Y., Yuan, C., Qi, B., . . . Cheng, J. (2015). Overexpression of pyruvate kinase M2 associates with aggressive clinicopathological features and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 16(6), 839-845.
- Xia, F., Xu, J. C., Zhang, P., Zhang, Y. Y., Zhang, Q. W., Chao, Z. H., & Wang, F. (2014). Glucose-regulated protein 78 and heparanase expression in oral squamous cell carcinoma: correlations and prognostic significance. *World J Surg Oncol*, 12, 121.
- Xie, Z., Guo, J., Kang, Y., & Ou, X. (2018). Mismatch between GLUTs and glucose levels causes neuronal damage during glucose fluctuations. *Med Hypotheses*, 112, 37-39.
- Zhang, H., Seikaly, H., Abele, J. T., Jeffery, D. T., Harris, J. R., & O'Connell, D. A. (2014). Metabolic tumour volume as a prognostic factor for oral cavity

- squamous cell carcinoma treated with primary surgery. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 43, 33.
- Zhang, J., Jing, X., Niu, W., Zhang, M. I. N., Ge, L., Miao, C., & Tang, X. (2016). Peroxiredoxin 1 has an anti-apoptotic role via apoptosis signal-regulating kinase 1 and p38 activation in mouse models with oral precancerous lesions. *Oncology Letters*, 12(1), 413-420.
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., . . . Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 32(40), 4814-4824.
- Zhu, G. Q., Tang, Y. L., Li, L., Zheng, M., Jiang, J., Li, X. Y., . . . Liang, X. H. (2010). Hypoxia inducible factor 1alpha and hypoxia inducible factor 2alpha play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 16(19), 4732-4741.

