

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

FRANCISCA AURINA GONÇALVES

## Alterações do metabolismo energético durante a carcinogênese do carcinoma espinocelular oral

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre

2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

Goncalves, Francisca

Alterações do Metabolismo Energético Durante a Carcinogênese do Carcinoma Espinocelular Oral / Francisca Goncalves. -- 2018.

67 f.

Orientador: Marcelo Lamers.

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

1. Estresse Oxidativo. 2. Peroxidação Lipídica. 3. 4-hidroxinonenal. 4. Mitocôndria. 5. Espécies Reativas. I. Lamers, Marcelo, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Odontologia, ao CNPq e à CAPES pelo investimento na minha educação formal.

Ao professor Marcelo por ter me acolhido, defendido e orientado. Admiro-te muito como professor e orientador, mas, principalmente, como pessoa sempre pronto a ajudar a todos sem juízo pré-concebido.

Às professoras Anna e Manoela pelos ensinamentos e pelo carinho que tanto me confortou.

À professora Cristiane Matté, Caroline e Bernardo por terem, tão generosamente, colaborado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da Patologia Bucal e demais professores do PPG-Odontologia, pela contribuição no meu aprimoramento profissional.

Aos colegas Chris, Alessandra e Pedro pelos ensinamentos durante as atividades laboratoriais e aos demais servidores técnico-administrativos da Faculdade de Odontologia e da UFRGS pelo auxílio.

Aos colegas Lisiane, Sílvia, Antônio, Leonardo, Luíza, Bibiana, Paloma, Maurício e Grasieli por terem ajudado em todas as fases do desenvolvimento desta tese.

Aos colegas Carlos e Sérgio, por terem tornado mais leve esta fase da minha vida.

A todos os integrantes do LAMOC, orientados pelo prof. Marcelo, pelos momentos de aprendizagem e descontração.

Às minhas colegas do CME pela ajuda e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus colegas do Acolhimento pelas conversas que tanto me fortaleceram.

Às minhas colegas Mariane e Daiana pela ajuda incondicional.

À minha amiga Rose pelo carinho e conforto nos momentos difíceis.

À minha família pela torcida e pelo carinho.

Ao John (*in memoriam*), minha eterna gratidão.

## RESUMO

GONÇALVES, F. A. **Alterações do metabolismo energético durante a carcinogênese do carcinoma espinocelular oral**. 2018. 67 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

O câncer oral é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, e o Carcinoma Espinocelular Oral (CEC) representa 95% dessas lesões. O CEC origina-se no epitélio de revestimento e possui comportamento agressivo com metástase cervical precoce e taxa de sobrevivência baixa de 5 anos. Evidências mostram que alterações metabólicas como na glicólise e função mitocondrial contribuem para a agressividade do tumor. A mitocôndria representa a maior fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, ao mesmo tempo, possui muitas vias antioxidantes para neutralizá-las. As EROs podem ativar a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e a consequente progressão do câncer através da metástase. Este estudo objetivou caracterizar o perfil metabólico das células tumorais de CEC e verificar a sua relação com a agressividade. Inicialmente, foi verificado o panorama metabólico do CEC por meio de análise proteômica de três tumores e seus epitélios adjacentes. Foi observado que os tumores de CEC possuem um aumento nas proteínas relacionadas com a glicólise e diminuição na atividade mitocondrial em comparação com seus epitélios adjacentes, provavelmente devido à subexpressão da piruvato desidrogenase, e na atividade antioxidante. Posteriormente, foi analisada a atividade metabólica de linhagens celulares epitelial (HaCaT), de CEC com alto (Cal27) e baixo (SCC25) nível de diferenciação e fibroblastos através de citometria de fluxo. As células mais indiferenciadas (SCC25) apresentaram menor massa e potencial de membrana mitocondriais, geraram menores níveis de EROs e nitrogênio, o que correlacionou com maior viabilidade celular. Depois, foi analisado por imunohistoquímica o perfil de peroxidação lipídica (4-HNE) em biópsias de CEC, desordens potencialmente malignas (displasia epitelial oral) e mucosa oral normal. Foi verificado que os níveis de espécies reativas estavam aumentados no tumor e nas desordens potencialmente malignas nas regiões epiteliais. Ocorreu diminuição nos níveis de concentração de 4-HNE/espécies reativas no tecido conjuntivo adjacente às lesões displásicas na região de invasão de OSCC. Os resultados indicam um dinamismo durante a carcinogênese oral relacionado ao metabolismo energético das células que varia de acordo com cada etapa desse processo, com o potencial de ser influenciado por elementos do microambiente tumoral.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo. 4-HNE. Peroxidação lipídica. Mitocôndria. Espécies Reativas de Oxigênio.

## ABSTRACT

GONÇALVES, F. A. **Alterations in the energy metabolism during the carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma.** 2018. 67 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

Oral cancer is the sixth most common cancer in the world, and the Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) represents 95% of these lesions. OSCC originates in the lining epithelium and has an aggressive behavior with early cervical metastasis and low 5-year survival rate. Evidence indicates that metabolic changes, such as glycolysis and mitochondrial function, contribute to tumor aggressiveness. Mitochondria represents the major source of reactive oxygen species (ROS) production and, at the same time, has many antioxidant pathways to neutralize them. ROS can activate the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the consequent progression of cancer through metastasis. This study aimed to characterize the metabolic profile of tumor cells of OSCC and to verify its relationship with aggressiveness. Initially, the metabolic panorama of OSCC was verified through the proteomic analysis of three tumors and their adjacent epithelium. It was observed that OSCC tumors have an increase on proteins related to glycolysis and a decrease on mitochondria activity in comparison to its adjacent epithelium, probably due to the downregulation on pyruvate dehydrogenase, and in the antioxidant activity. Afterwards, it was analyzed the metabolic activity of epithelial cell lines (HaCaT), OSCC with high (Cal27) and low (SCC25) level of differentiation and fibroblasts by flow cytometry. The more undifferentiated cells (SCC25) had lower mitochondrial mass and membrane potential, generated lower levels of ROS and nitrogen species, which correlated with a greater cell viability. Afterwards, it was analyzed by immunohistochemistry the lipid peroxidation profile (4-HNE) of OSCC biopsies, potentially malignant lesions (oral epithelial dysplasia) and normal oral mucosa. It was found that, the levels of reactive species are increased in the tumor and in the potentially malignant lesions in the epithelial regions. There was a decrease in the concentration levels of 4-HNE/reactive species in the connective tissue underlying dysplastic regions and the OSCC invasion zone. The results indicate a dynamism during oral carcinogenesis regarding the energy metabolism of cells and it varies according to each stage of this process with the potential to be influenced by elements of the tumor microenvironment.

Keywords: Oxidative stress. 4HNE. Lipid peroxidation. Mitochondria. Oxygen reactive species.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEC Carcinoma Espinocelular Oral

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

EMT (inglês) Transição epitélio-mesenquimal

MET (inglês) Transição Mesênquima-Epitelial

HIF Fator Induzido por Hipóxia

PDK Piruvato Desidrogenase Quinase

PDH Piruvato Desidrogenase

CAFs Fibroblastos Associados ao Câncer

TAMs Macrófagos Associados ao Tumor

NDUFA4L2 NADH Desidrogenase (ubiquinona) 1 $\alpha$  Sub-complexo, 4 like 2

LDH Lactato Desidrogenase

PKM2 Piruvato Quinase M2 Piruvato Quinase M2

4-HNE 4-hidroxinonenal

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	8
2 Referencial teórico.....	10
2.1. Carcinoma Espinocelular Oral.....	10
2.2. Transição epitélio-mesenquimal.....	13
2.3. Metabolismo do câncer.....	14
2.4. Peroxidação lipídica.....	22
2.5.1. 4-hidroxinonenal.....	23
3 Hipótese do estudo.....	25
4 Objetivos.....	25
4.1 Objetivo Geral.....	25
4.2. Objetivos Específicos.....	25
Referências.....	26
5 Artigo Científico.....	32
6 Conclusão.....	65
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	66
Anexo A – Carta de Aprovação do Projeto HCPA 14-0689.....	68

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença antiga, detectada em múmias egípcias há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Sua denominação karkínos - caranguejo em grego - foi usada pela primeira vez por Hipócrates. Nos dias atuais, câncer é o nome que se refere a um conjunto de mais de 100 doenças, que possuem em comum o crescimento desordenado de células, com tendência a invadir tecidos e órgãos vizinhos. Também conhecido como neoplasia maligna, diferencia-se antagonicamente da benigna ao ser formado por células com perda de diferenciação e estruturada de forma atípica do tecido de origem. Possui crescimento rápido com mitoses anormais e numerosas. Sua massa é pouco delimitada e invade o tecido adjacente, apresentando metástases frequentes (INCA, 2012).

A cada ano, mais de 14 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer no mundo, sendo que a maioria delas mora em países de baixa e média renda. Em 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram em decorrência de câncer, representando uma em cada dez mortes no mundo (WHO, 2017).

O câncer oral é definido como uma neoplasia maligna da cavidade oral e é o sexto câncer mais comum no mundo com uma incidência anual de 400.000 novos casos, representando 4% dos cânceres em homens e 2% nas mulheres (ISHIKAWA et al., 2016). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima, para cada ano do biênio 2018-2019, 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens e 3,28 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). Apesar dos avanços no tratamento, este tipo de tumor possui taxa de sobrevivência em cinco anos baixa – em torno de 50% (MESSADI, et al., 2014; LOU et al., 2016; WU et al., 2016).

O câncer possui muitos subtipos anatômicos e moleculares, cada um requerendo diagnósticos e estratégias de manejos específicos (WHO, 2017). Durante a patogenia do câncer, as células obtêm capacidades que permitem a sua sobrevivência, proliferação e disseminação - indução do aumento da proliferação, fuga dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, habilitação da imortalidade replicativa, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, alteração do metabolismo celular, fuga da destruição imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Quanto ao metabolismo celular, as células do câncer, quando expostas a condições adversas como hipóxia e limitação de nutrientes, necessitam adaptar-se por meio de mudanças moleculares que impactam na glicólise e funções mitocondriais



(BAFFY; DERDAK; ROBSON, 2011; MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016). Dentro deste contexto, o estresse oxidativo – o desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas - participa no controle da reprogramação metabólica das células do câncer e das demais células presentes no microambiente tumoral e que as vias metabólicas reprogramadas no câncer podem também alterar o equilíbrio redox (KIM; KIM; BAE, 2016).

As EROS, produzidas em grande quantidade pelas mitocôndrias (TEICHER, 2014), são persistentemente elevadas na maioria dos tumores (CHAN et al., 2017), promovendo sinalização mitogênica, sobrevivência celular, interrupção da sinalização da morte celular, EMT, metástase e quimiorresistência (TEICHER, 2014).

Compreender o metabolismo do câncer e sua ligação com a perpetuação dos tumores é fundamental na contribuição para o surgimento de tecnologias direcionadas à prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer - considerando a sua alta frequência no Brasil e no mundo. Esta tese apresenta resultados que caracterizam o perfil metabólico das células tumorais do carcinoma espinocelular oral e de desordens potencialmente malignas e, com isto, verifica a sua possível contribuição na sobrevivência, proliferação e disseminação das células tumorais.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### 2.1. Carcinoma Espinocelular Oral

O câncer bucal é definido como o tumor maligno da cavidade oral e é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, com uma incidência anual de 400 mil novos casos, representando 4% dos cânceres em homens e 2% em mulheres (ISHIKAWA et al., 2016; MUSHARRAF et al., 2016; WU et al., 2016).

No Brasil, o câncer bucal tem sido considerado um problema de saúde pública complexo enfrentado pelo sistema de saúde brasileiro, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. O INCA estima para 2018-2019 a ocorrência de 14.700 mil novos casos da doença no país para cada ano do biênio, sendo no Rio Grande do Sul 880 novos casos em homens e 220 novos casos em mulheres e, em Porto Alegre, 120 novos casos em homens e 50 novos casos em mulheres. O Instituto ainda ressalta que na região sul do país, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral é o sexto mais frequente em homens e o décimo quinto mais frequente em mulheres (INCA, 2018). Hoje a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima, para 2020, 363.623 novos casos no mundo e 13.235 novos casos no Brasil (WHO, 2017).

Este tipo de câncer é representado em sua maior parte pelo CEC o qual corresponde a mais de 90% dos casos de câncer na boca. Os locais mais comuns para o surgimento do câncer oral são a língua (borda ventro-lateral da língua, 40% dos casos), assoalho da boca (30% dos casos) e lábio inferior (RIVERA, 2015).

O CEC oral origina-se no epitélio de revestimento, possui comportamento agressivo, metástase cervical precoce e o pior desfecho entre os cânceres da região da cabeça e pescoço (GENDEN et al., 2010; TANAKA; ISHIGAMORI, 2011; HUANG et al., 2013; PAPAGERAKIS et al., 2015; MUSHARRAF et al., 2016; LOU et al., 2016). Possui etiologia multifatorial, podendo estar associado a fatores de risco extrínsecos como substâncias químicas (tabaco e álcool), agentes físicos (exposição solar) e agentes biológicos (papiloma vírus humano); como também a fatores intrínsecos relacionados aos estados sistêmicos do indivíduo (imunodeficiência) (HENSON; GOLLIN, 2010; GENDEN et al., 2010; RAM et al., 2011; KAUR et al., 2013; DOUGLAS, 2015; YAP et al., 2016).

A ação crônica dos fatores de risco sobre os queratinócitos pode dar início à carcinogênese do CEC - processo complexo que ocorre quando o epitélio escamoso é atingido por muitas alterações genéticas – e, concomitantemente, à história natural da doença (Figura 1), quando a homeostase dos queratinócitos é quebrada, levando às desordens potencialmente malignas, displasia em diferentes graus, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e a formação de metástases com consequentes manifestações clínicas (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011; PAPAGERAKIS et al., 2015; RIVERA, 2015).

A leucoplasia é a desordem potencialmente maligna mais frequente na mucosa bucal (SAINTIGNY et al., 2009; LIU et al. 2012; XIAO et al., 2012) e é definida, segundo a OMS, como uma mancha ou placa branca, não removível à raspagem e que não pode ser classificada clínica ou patologicamente como outra enfermidade (FELLER; LEMMER, 2012; LIN et al., 2016). Essa desordem, juntamente com a eritroplasia, fibrose submucosa oral e líquen plano possui a chance de transformação de 2-12% para a malignidade (MESSADI, 2013; MESSADI, et al., 2014; RIVERA, 2015; MUSHARRAF et al., 2016; LOU et al., 2016).

Microscopicamente, a leucoplasia exhibe muitas mudanças epiteliais reacionais como hiperplasia, hiperqueratose, acantose, além de células inflamatórias no tecido conjuntivo subjacente. Histologicamente, é essencial que seja feita uma distinção entre leucoplasia displásica e leucoplasia não displásica. Na displasia epitelial, cujas alterações histopatológicas das células são similares às observadas no CEC, observa-se graus de atipia como hipercromatismo nuclear, aumento do tamanho do núcleo, pleomorfismo celular e nuclear, disqueratose, figuras de mitose anormais e número de mitoses aumentado. Também, quando se observa as alterações histomorfológicas do epitélio displásico, pode-se evidenciar a presença de cristas epiteliais em formato bulbar ou em forma de gota de orvalho, perda da polarização celular em direção à superfície epitelial, pérolas de ceratina ou epiteliais e perda da coesão típica entre as células epiteliais. Quando as alterações ocorrem nos queratinócitos basais ou parabasais, classifica-se como displasia leve. A atipia encontrada da camada basal à porção média da camada espinhosa é chamada de displasia moderada. Quando as mudanças se estendem da camada basal até um nível acima da porção média do epitélio, chama-se displasia severa. Quando toda a espessura do epitélio está envolvida, sem a invasão do tecido conjuntivo, utiliza-se o termo carcinoma *in situ*. Considera-se CEC quando as

células neoplásicas de origem epitelial invadem o tecido conjuntivo de forma individual ou na forma de ilhas ou cordões (NEVILLE et al., 2009; RIVERA, 2015) (Figura 1). O CEC pode progredir, formando metástases que são promovidas pela EMT - processo no qual as células tumorais adquirem competências para superar barreiras fisiológicas, migrar e invadir tecidos distantes ao tumor primário (KINUGASA et al., 2015; GUGNONI et al., 2016; XU et al., 2016).

As opções de tratamento para o CEC consistem na excisão cirúrgica combinada com radioterapia, ou ainda com essas combinadas à quimioterapia (DOUGLAS, 2015). Entretanto, apesar dos avanços no tratamento, a taxa de sobrevivência em 5 anos para CEC tem se mantido baixa nas últimas três décadas – em torno de 50%. Por outro lado, se o CEC é diagnosticado nos estágios iniciais com a administração de um tratamento efetivo, essa taxa é de 80%, comparada com a taxa de 20% para os casos detectados em estágios avançados. Por isso, a detecção e o manejo da displasia nas desordens potencialmente malignas constituem-se em um importante passo preventivo contra a transformação maligna (MESSADI, et al., 2014; LOU et al., 2016; WU et al, 2016).

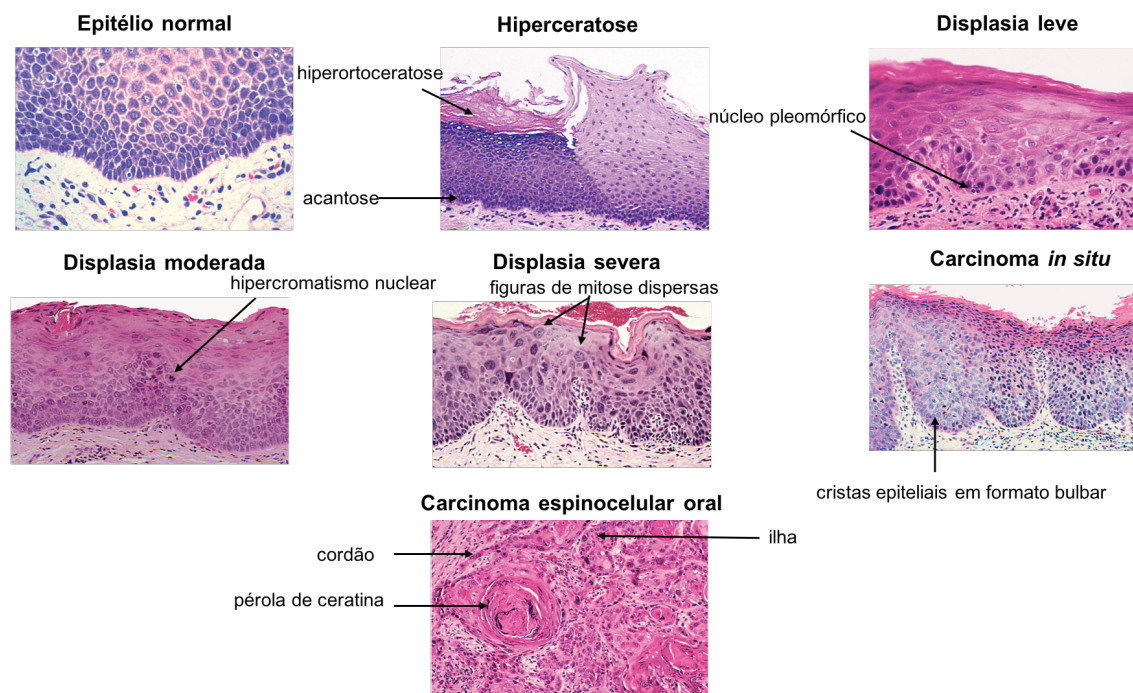


Figura 1 – História natural do carcinoma espinocelular oral – histopatologia. Fonte: Adaptado de NEVILLE et al. (2009).

## 2.2. Transição epitélio-mesenquimal

A metástase é responsável por mais de 90% da mortalidade induzida por câncer. Caracteriza-se pela migração das células tumorais para colonizar locais adjacentes ou distantes do tumor primário (GUGNONI et al., 2016). Para tal, as células precisam invadir o tecido adjacente ao tumor primário, entrar na circulação sanguínea ou linfática, sobreviver, extravasar e crescer em outro tecido (STEEG, 2006; STEEG, 2016) – processo promovido pela EMT.

Em estudos de embriogênese foi relatado que quando as células embrionárias, sofrendo EMT, podem migrar e viajar a longas distâncias para formar tecidos e órgãos (KINUGASA et al., 2015; XU et al., 2016). Uma conversão fenotípica similar também é observada nas doenças fibróticas e neoplasias, estando associada com a progressão dessas doenças (TURLEY et al., 2008). No câncer, ocorre a conversão de um subconjunto de células de um fenótipo epitelial CD44baixo-CD24alto (CD44L) para um fenótipo mesenquimal CD44alto-CD44baixo (CD44H), o último associado com o aumento das propriedades malignas das células dos tumores (KINUGASA et al., 2015; LI et al., 2017). Neste processo biológico, as células epiteliais assumem transitoriamente características mesenquimatosas, sofrendo alterações moleculares e bioquímicas. Como consequência deste processo, as células epiteliais perdem suas características diferenciadas, incluindo adesão célula-célula, polaridade e falta de motilidade; para adquirir outras características, como alta plasticidade celular, motilidade, invasividade e resistência à apoptose. Ocorrem mudanças no perfil das moléculas de adesão como E-caderina e fatores de adesão que determinam a ativação da polimerização da actina e a formação de fibras de tensão não polarizadas. Essas estruturas do citoesqueleto são necessárias para manter o movimento celular e o estresse mecânico imposto sobre as células pela perda da interação célula-célula e célula-matriz extracelular (LAMOUILLE; XU; DERYNK, 2014; GUGNONI et al., 2016). O contrário deste processo – transição mesênquima-epitelial (MET) - está associado com a perda dessa liberdade migratória, quando as células adotam uma polarização ápico-basal e expressam complexos juncionais que são características dos tecidos epiteliais. Acredita-se que a MET guia a cessação da migração, induzindo as mesmas células a proliferar e semear o novo tumor (NIETO, et al., 2016).

A EMT é um evento focal limitado ao tumor primário que ocorre pela interação das células do carcinoma com o microambiente tumoral no qual os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células imunes podem também ser encontradas, incluindo diferentes tipos de natural killer T e linfócitos B. O estroma também inclui macrófagos associados ao tumor (TAMs) e outras células derivadas da medula óssea. Algumas células são recrutadas antes do estabelecimento das malignidades primárias e metastáticas (NIETO, 2016) (Figura 2).

Durante a EMT, programas biológicos celulares compartilham recursos em comum, mas diferem em alguns detalhes; dependendo do tecido, do grau de malignidade e do contexto de sinais presentes nas células neoplásicas. Esses programas são coordenados por uma série de fatores de transcrição indutores de EMT, principalmente Snail, Slug, Twist e Zeb1 (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016; NIETO et al., 2016).

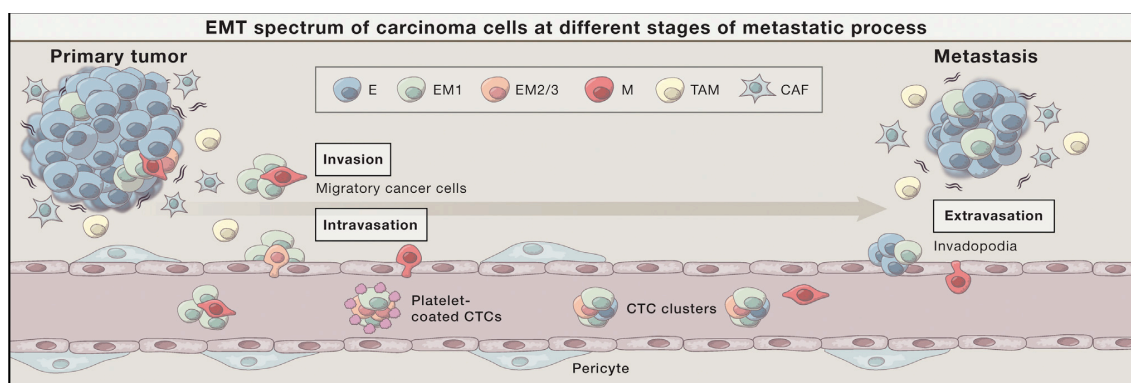


Figura 2 – Cascata metastática do ponto de vista da plasticidade celular e da heterogeneidade das células do carcinoma no tumor primário. E= célula epitelial, EM1 e EM2/3= células intermediárias com fenótipos distintos, M = células mesenquimais. Fonte: NIETO, et al. (2016)

### 2.3. Metabolismo do câncer

O câncer da cavidade oral desenvolve-se através de alterações moleculares que refletem em estágios histopatológicos (GENDEN et al., 2010; RAM et al., 2011; PAPAGERAKIS et al., 2015). Considerando que alguns aspectos do metabolismo do câncer podem prever a severidade ou o desfecho da doença, nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas com o objetivo de elucidar como as mudanças no metabolismo celular promovem o desenvolvimento de tumores (HEIDEN, 2011; TANAKA; ISHIGAMORI, 2011; KURHANEWICZ et al., 2011).

O metabolismo do 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 dos tumores (KURHANEWICZ et al., 2011). Historicamente, a diferença existente entre o metabolismo do tumor e do tecido adjacente foi o primeiro achado importante sobre este tema. Nos anos 1920, Otto Warburg demonstrou que os tumores possuíam altas taxas de consumo de glicose e produção de lactato, comparado com o tecido normal e que estas alterações ocorriam devido ao mau funcionamento das mitocôndrias. Este pesquisador descobriu que, mesmo na ampla presença de oxigênio, as células do câncer preferem metabolizar glicose - através de glicólise - à fosforilação oxidativa, achado denominado efeito Warburg (HSU; SABATINI, 2008; KURHANEWICZ et al., 2011; CARRACEDO; CANTLEY; PANDOLFI, 2013). Esta observação inicial criou o campo para o estudo do metabolismo dos tumores e proporcionou o surgimento de investigações a respeito de outras vias, incluindo a síntese de lipídios, transporte de aminoácidos, transporte de nucleotídeos - com o propósito de diagnóstico ou busca de terapias (KURHANEWICZ et al., 2011).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011) e Teicher; Linehan; Helman (2012) os tumores são tecidos complexos, compostos por múltiplos e distintos tipos de células que participam de interações heterotípicas e a proliferação destas requer a absorção de nutrientes ativos; síntese de DNA, RNA, proteínas, lipídios e ATP. Hanahan e Weinberg (2011) definiram as capacidades funcionais adquiridas durante a patogenia do câncer (Quadro1) que permitem a sobrevivência, a proliferação e a disseminação das células tumorais. Essas capacidades são obtidas pelos diversos tipos de tumores, por intermédio de diferentes mecanismos e durante as várias etapas do desenvolvimento da lesão. Tal aquisição é, provavelmente, realizada por duas características, destacando-se, primeiramente, o desenvolvimento de uma instabilidade genética nas células do câncer, a qual gera mutações aleatórias, incluindo a reorganização cromossômica. A segunda característica envolve o estado inflamatório de desordens potencialmente malignas e malignas que é conduzido pelas células do sistema imune, algumas das quais promovem a progressão do tumor. Deste modo, esses mesmos autores determinaram as características ativadoras que auxiliam as capacidades que são: **instabilidade genética e mutação** caracterizada pelo aumento expressivo dos agentes mutagênicos e/ou comprometimento do sistema que monitora a integridade genética e induz as células geneticamente alteradas a entrar em senescência ou apoptose e **promoção da inflamação**, que consiste no fornecimento de moléculas bioativas para o microambiente do tumor, incluindo fatores de crescimento que mantém o sinal proliferativo; fatores de

sobrevivência que limitam a morte celular; fatores pro-angiogênicos; enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase; sinais indutivos que levam à ativação do programa de transição epitélio-mesenquimal e outros fatores facilitadores das capacidades.

Capacidades	Vias alteradas
Indução do aumento da proliferação	Alteração dos sinais de promoção de crescimento celular.
Fuga dos supressores de crescimento	Alteração na função dos supressores de tumor – proteínas RB, TP53, LKB1; TGF- $\beta$ .
Resistência da morte celular	Atenuação da apoptose pela perda da função supressora de tumor TP53; aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-xL ou dos sinais de sobrevivência Igf1/2; alteração da regulação dos fatores pró-apoptóticos Bax, Bim e Puma e curto-circuito na via extrínseca de morte induzida por ligante.
Habilitação da imortalidade replicativa	Manutenção do DNA telomérico, levando ao aumento da expressão da telomerase ou manutenção do telômero, correlacionados com a resistência à indução da senescência e apoptose.
Indução da angiogênese	Ação do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e da trombospondina1 (TSP-1).
Ativação da invasão e metástase	Diminuição da expressão de E-caderina; aumento da regulação de N-caderina; atuação do programa de transição epitélio-mesenquimal; contribuição heterotípica de células do estroma tumoral, como os macrófagos, por meio da produção de enzimas que degradam a matriz, tais como metaloproteinases e proteases.
Alteração do metabolismo celular	Predomínio da glicólise aeróbica no metabolismo da glicose.
Fuga da destruição imunológica	Paralisação do infiltrado dos linfócitos T citotóxicos (CTLs) e natural killer (NK) pela secreção de TGF- $\beta$ , reguladores de células T (Tregs) e supressores de células derivadas da medula (MDSCs).

Quadro 1 - Capacidades funcionais adquiridas durante a patogenia do câncer. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Para garantir a manutenção das capacidades adquiridas e, deste modo, sobreviver, proliferar e disseminar; as células do câncer, quando expostas a condições adversas como hipóxia, limitação de nutrientes e atuação da defesa imune do hospedeiro, necessitam adaptar-se por meio de mudanças moleculares que impactam na glicólise e funções mitocondriais - integradas com as vias responsáveis e essenciais na



produção de componentes celulares (BAFFY; DERDAK; ROBSON, 2011; MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016).

Essas células utilizam glicose, glutamina, lactato, piruvato,  $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato, acetato e ácidos graxos livres como substratos para as vias bioenergéticas que mantêm o crescimento tumoral (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016). Entretanto, a glicose é o metabólito mais consumido por ser mais disponível para gerar ATP por estas células. A glicose pode ser metabolizada no citoplasma através da glicólise anaeróbica com a formação de lactato, ou por meio da glicólise aeróbica com geração de piruvato que é metabolizado via ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa na mitocôndria. A glicólise gera 2 moles de ATP por mol de glicose, 18 vezes menos do que os 36 moles do ATP por mol de glicose que é gerado via ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa. Contudo, a glicólise é 100 vezes mais rápida em termos de geração de ATP por unidade de glicose consumida (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016). O metabolismo da glicose também envolve outras vias que necessitam desta molécula, incluindo-se a via das pentoses fosfato, que gera fosfatos de pentose para a síntese de ribonucleotídeos e NADPH; a via hexosamina necessária para a glicosilação de proteínas; a glicogênese que gera glicogênio para o armazenamento de glicose; as vias de biossíntese de aminoácidos e o ciclo do metabolismo de um carbono que gera NADPH e que é necessário para a biossíntese de glutatona e purina e para a metilação (HAY, 2016).

Existe uma heterogeneidade na utilização de glicose pelos diferentes tumores e por diferentes populações de células tumorais. Dependendo da disponibilidade de nutrientes, algumas células em alguns tumores são predominantemente glicolíticas, enquanto outras possuem primariamente o fenótipo metabólico para a fosforilação oxidativa (HAY, 2016; MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016).

O metabolismo glicolítico com produção de ácido láctico em detrimento da fosforilação oxidativa é uma das respostas adaptativas das células tumorais frente ao ambiente hipóxico para garantir sua sobrevivência, proliferação e resistência à radiação e quimioterapia. A hipóxia intratumoral, além de afetar células que estão localizadas longe de vasos sanguíneos funcionais, pode afetar outras regiões do tumor a partir de um desequilíbrio entre o rápido aumento do consumo celular e o fornecimento inadequado de oxigênio pela vasculatura anormal do tumor durante o seu crescimento

(GATENBY; GILLIES, 2004; PELICANO; MARTIN; HUANG, 2006; BAGLEY, 2010; CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; HAY, 2016; LI et al., 2013; BOST et. al., 2016). Além do metabolismo glicolítico, a flutuação dos níveis de oxigênio no microambiente tumoral promove outras respostas nas células do tumor - destinadas a adaptação ou fuga do microambiente hipóxico -, tais como a inativação das vias apoptóticas e ativação de vias pró-sobrevivência, indução de fenótipos mais invasivos e metastáticos e indução da angiogênese (BAGLEY, 2010).

A hipóxia controla a expressão de centenas de genes, muitos dos quais são regulados pelo fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), o maior regulador da resposta transcricional à privação de oxigênio. O HIF-1 é uma proteína heterodimérica constituída por subunidade HIF-1 $\beta$  expressa constitutivamente e pela subunidade HIF-1 $\alpha$  que é regulada pela concentração de oxigênio. Sob condições de normóxia, HIF-1 $\alpha$  é rapidamente hidroxilado em dois resíduos de prolina por prolin hidroxilases dependentes de oxigênio (PHDs) e levada para a ubiquitinação e degradação proteossomal. HIF-1 $\alpha$  também pode ser hidroxilado em um resíduo aspargina pelo fator inibidor HIF-1, inibindo, conseqüentemente, a atividade transcricional. Em contraste, sob condições de hipóxia, a subunidade HIF-1 $\alpha$  é estabilizada e transloca para o núcleo onde dimeriza com HIF-1 $\beta$  e, pela ligação com elementos de resposta à hipóxia, ativa a transcrição de centenas de genes alvos envolvidos em passos importantes para a tumorigênese; incluindo angiogênese, metabolismo, proliferação, metástase e diferenciação (BAGLEY, 2010).

A estabilização dos HIFs está associada com a disfunção mitocondrial e aumento da produção de EROs mitocondriais durante a hipóxia - e esses fatores de transcrição aumentam a expressão das enzimas glicolíticas em ambas as condições. Esta é uma resposta adaptativa, pelos menos em parte, para manter a produção de ATP quando a produção de ATP mitocondrial está comprometida. HIFs também aumentam a expressão da piruvato desidrogenase quinase (PDK), que inibe a atividade de piruvato desidrogenase (PDH). A diminuição da atividade de PDH desvia o piruvato do metabolismo mitocondrial para a produção de lactato ao mesmo tempo que limita a produção de EROs quando o transporte de elétrons é limitado. Outro importante mecanismo pelo qual HIFs podem inibir a produção de EROs mitocondrial é a ativação da expressão da NADH desidrogenase (ubiquinona) 1 $\alpha$  sub-complexo, 4 like 2

(NDUFA4L2). A expressão de NDUFA4L2 é necessária para a proliferação sob condições de hipóxia, durante a qual é inibida a atividade do complexo I, prevenindo o excesso da entrada de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e suprimindo a produção de EROs. Portanto, HIFs são importantes para a regulação do metabolismo e dos níveis de EROs mitocondriais (GATENBY; GILLIES, 2004; PELICANO; MARTIN; HUANG, 2006; EALES; HOLLINSHEAD; TENNANT, 2016; SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016).

As células do câncer produzem menos ATP via glicólise em comparação com o ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa. Isso requer compensação através da importação de grandes quantidades de glicose para o interior de seu citoplasma. Para tal, estas células expressam elevados níveis de transportadores de glicose, particularmente GLUT 1 e GLUT 3 que, presentes na membrana citoplasmática, transportam grandes quantidades de glicose do meio extra para o meio intracelular (DENKO, 2008; WEINBERG, 2014). Este aumento da expressão de transportadores de glicose é feito pelo HIF-1 que também aumenta a expressão dos genes envolvidos na quebra enzimática da glicose em piruvato e das enzimas envolvidas no metabolismo do piruvato. Em células hipóxicas o piruvato é convertido em lactato pela lactato desidrogenase (LDH) a partir da piruvato quinase M2 (PKM2), que é então liberado para o espaço extracelular (BAGLEY, 2010, WEINBERG, 2014).

O aumento do metabolismo glicolítico nas células do câncer e a consequente liberação de lactato para o meio extracelular promove acidose no microambiente tumoral, resultante da difusão de íons  $H^+$  através do gradiente de concentração dentro do tecido peritumoral. Esta acidose intratumoral suscita a evolução das células tumorais para fenótipos resistentes à toxicidade celular induzida por ácido. Além disso, esta mudança de pH é utilizada a favor dessas células tumorais, promovendo a sua proliferação e invasão. Isso ocorre devido à ativação de catepsinas derivadas do câncer, metaloproteinases e inibição da resposta imune do hospedeiro. Adicionalmente, a produção excessiva de lactato pode ser convertida em piruvato em células tumorais vizinhas e células do estroma associadas ao câncer, servindo de combustível para a fosforilação oxidativa nestas células. As células normais, apesar de lançarem mecanismos para se adaptar à acidose extracelular, não conseguem sobreviver sob tais condições (GATENBY; GILLIES, 2004; CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011; VERSCHOOR et al., 2013; LI et al., 2013).

No que concerne à relação das funções mitocondriais com o câncer, enquanto em alguns casos a mitocôndria danificada conduz o efeito Warburg; em outros as células do câncer que exibem o metabolismo Warburg possuem respiração mitocondrial intacta, dependendo deste tipo de respiração e retendo a capacidade de fosforilação oxidativa, assim como o consumo de oxigênio similares aos observados em tecidos normais (DENKO, 2008; CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; HAY, 2016; VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016).

A mitocôndria é um mediador importante na tumorigênese e este processo requer desta organela flexibilidade para se adaptar às alterações celulares e ambientais tumorais. Esta mediação está presente em todos os estágios da tumorigênese - iniciação, crescimento, sobrevivência e metástase - e conta com mutações nas enzimas mitocondriais, estresse oxidativo gerado pela mitocôndria, reprogramação metabólica mitocondrial, sinalização mitocondrial, regulação da homeostase redox e da susceptibilidade à morte celular pela mitocôndria, regulação da biogênese e mitofagia mitocondriais (LI et al., 2013; VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016).

As espécies reativas são produzidas continuamente pela mitocôndria (RIGAS; SUN, 2008). As EROs sob a forma de superóxido, radical livre hidroxil e peróxido de hidrogênio são produzidas a partir de reações metabólicas fisiológicas. Para garantir a sobrevivência e proliferação, as células do câncer possuem frequentemente altos níveis de EROs como consequência do estado hipermetabólico o qual é induzido pelo estímulo de oncogenes (SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016).

Por conter múltiplos complexos ativos redox e enzimas metabólicas que geram ânion superóxido, a mitocôndria representa a maior fonte de produção de EROs endógeno (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016; PANIERI; SANTORO, 2016; SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016). A cadeia transportadora de elétrons é o local que melhor se caracteriza por esta produção de EROs. Nela os elétrons dos metabólitos intermediários reduzidos (NADH e FADH<sub>2</sub>) são transferidos para o oxigênio molecular. Durante a passagem de elétrons, dependendo da situação do potencial de membrana mitocondrial e da disponibilidade de oxigênio, radicais semiquinonas podem ser gerados nos complexos I, II e III, promovendo a redução univalente do oxigênio em superóxido. Outras fontes de produção de superóxido dependente da mitocôndria são a 2-oxoglutarato desidrogenase, a piruvato desidrogenase na matriz mitocondrial; a

glicerol-3 fosfato desidrogenase mitocondrial e o sistema transporte de elétrons flavoproteína-ubiquinona oxidoreductase mitocondrial na membrana interna da organela. O superóxido, por sua vez, pode ser convertido na mitocôndria em peróxido de hidrogênio pelas enzimas superóxido dismutase 1 e superóxido dismutase 2 em vias distintas (PANIERI; SANTORO, 2016). O peróxido de hidrogênio inativa o supressor de tumor PTEN pela oxidação dos resíduos laterais de cisteína ativos e inativação da via PI3K. A regulação de sinalização de oncogenes mediada por EROs também induz a metástase através da oxidação de cisteína em Src, aumentando suas habilidades oncogênicas e promovendo a migração das células (SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016; VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016). Além disso, o peróxido de hidrogênio, sendo solúvel em lipídeos, pode difundir através da membrana citoplasmática, atuando sobre os fibroblastos associados ao tumor - células mais abundantes do estroma no microambiente tumoral que facilitam o desenvolvimento, propagação e a invasão dos tumores (CHAN et al., 2017).

Em resposta aos elevados níveis de EROs, muitos tumores aumentam a expressão de vias antioxidantes preventivas - K-Ras, B-raf, e c-Myc - que, ativados, inibem EROs através da regulação do fator nuclear NFR2, um regulador transcricional de resposta antioxidante, para promover tumorigênese. A mitocôndria, particularmente, possui muitas vias antioxidantes para neutralizar EROs, incluindo superóxido dismutase, glutamina, tioredoxina e peroxirredoxinas (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016).

As EROS podem ativar a EMT (KINUGASA et al., 2015), regulando a sua iniciação e a conseqüente progressão do câncer. Isso ocorre por meio de alterações biológicas em proteínas sensíveis a elas, que possuem thiois livres (-SH) nos resíduos de cisteínas. Como exemplo estão as proteínas envolvidas na remodelação da matriz extracelular (integrinas, Hu antígeno R), remodelação do citoesqueleto (actina, cofilina), junções célula-célula (NFκB, HIF-1α, TGFβ) e mobilidade celular (Src, FAK, PETEN) (JIANG et al., 2017).

Altos níveis de EROs contribuem para a oxidação de macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA e podem contribuir para a instabilidade genômica, promovendo a transformação celular (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016).

#### 2.4. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica consiste na deterioração oxidativa de lipídios polinsaturados da membrana celular, levando a alterações na sua estrutura e permeabilidade. Pode ser causada pela adição de uma espécie reativa ou, mais comumente, pela abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno por uma espécie reativa, resultando, nos dois casos, na formação de um radical carbono (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008; ANDRADE, 2013; AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014).

Os ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contêm duas ou mais ligações duplas entre carbonos, sendo vulneráveis aos ataques das espécies livres derivadas do oxigênio, particularmente pelos radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e hidroperoxil ( $\cdot\text{OH}_2$ ). As interações entre lipídios e espécies reativas liberam peróxidos, que são em si espécies reativas, iniciando a subsequente redução de outro ácido graxo. Desse modo, segue-se uma cadeia de reações autocatalíticas – denominada propagação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008; ANDRADE, 2013).

Em resposta à peroxidação lipídica da membrana e de acordo com as circunstâncias metabólicas e capacidade de reparo específicas das células, estas podem promover a sobrevivência ou induzir a morte celular. Sob baixas taxas peroxidação lipídica, as células estimulam a sua manutenção e sobrevivência, ou utilizando sistemas de defesa antioxidantes constitutivos, ou ativando vias de sinalização que aumentam a expressão de proteínas antioxidantes. Já, quando sob médias ou altas taxas de peroxidação lipídica, a extensão do dano oxidativo sobrecarrega a capacidade de reparo das células, levando-as a indução de apoptose ou necrose. Estes processos podem, eventualmente, causar o dano molecular e celular, facilitando o desenvolvimento de vários estados patológicos. (ANDRADE, 2013; AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014).

Embora existam muitas espécies lipídicas potenciais, a mais estudada, bioativa e tóxica é o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014; ZHONG; YIN, 2015; SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016).

### 2.5.1. 4-hidroxinonenal

O 4-HNE é formado durante a peroxidação de ácidos graxos polinsaturados n6, tais como o ácido linoleico e aracdônico (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2008). Este produto é uma molécula altamente eletrofílica que reage facilmente com compostos de baixo peso molecular, como glutathiona, proteínas e DNA. A reatividade do 4-HNE depende de três funções principais: o grupo aldeído, a dupla ligação entre carbonos (C=C) e o grupo hidroxila, os quais podem participar isolados ou em sequência durante reações químicas com outras moléculas. Tem sido demonstrado que o 4-HNE modifica proteínas, ou formando adutos de Michael com resíduos lisil, histidil e cisteinil; ou através da formação das bases de Schiff com o resíduo lisil, levando à formação de pirrole. Além disso, a modificação de 4-HNE pode resultar em ligação cruzada de dois resíduos lisil por meio dos adutos de Michael e bases de Schiff (BARRERA, 2012; DALLEAU et al., 2013).

A mais comum fonte de HNE é a endógena, proveniente das espécies reativas de oxigênio produzidas pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a qual desencadeia a oxidação lipídica (DALLEAU et al., 2013), incluindo a oxidação da cardiolipina - fosfolípídeo presente na membrana interna mitocondrial (ZHONG; YIN, 2015). O 4-HNE exógeno pode ser produzido pela peroxidação das lipoproteínas de baixa densidade do plasma (LDL) ou gerado durante o processamento de alimentos - o ferro heme presente na carne vermelha pode oxidar lipídios poliinsaturados da dieta (DALLEAU et al., 2013).

Observado *in vitro* e, dependendo de sua concentração, o 4-HNE pode ser incluído em três categorias: a) **100µM ou acima** é tóxico para a maioria das células, produz dano mitocondrial e morte celular – níveis que estão geralmente acima daqueles que podem ocorrer *in vivo*; **de 2 a 20 µM** inibe a síntese de proteínas e DNA; mas estimula a fosfolipase A<sub>2</sub> - envolvida no processo inflamatório -, a proliferação celular e é tóxico para muitas células; pode também inibir o reparo do material genético por excisão de nucleotídeo; **1 µM ou menos** representa o nível basal de HNE em tecidos saudáveis (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2008).

Uma vez formado, o HNE é rapidamente degradado por três principais reações: redução em 1,4-dihydroxy-2-noneno pela enzima álcool desidrogenase, oxidação em

ácido 4-hydroxy-2-nonenóico pela aldeído desidrogenase, ou formação de glutathiona conjugada (GS-HNE) catalisada por glutathiona S-transferase. A maioria do HNE é metabolizada pela formação de GS-HNE (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2008; BARRERA, 2012; SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016).



### **3 HIPÓTESE DO ESTUDO**

O metabolismo energético celular encontra-se alterado nas diferentes etapas da carcinogênese do carcinoma espinocelular oral.

### **4 OBJETIVOS**

#### 4.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil metabólico das células de epitélio, desordens potencialmente malignas e do CEC oral.

#### 4.2. Objetivos Específicos

Verificar o panorama metabólico do CEC oral através da análise proteômica de tumores.

Analisar o perfil metabólico de linhagens celulares – HaCaT, Cal27, SCC25 e fibroblastos – através de citometria de fluxo com os reagentes Mitosox, DAF, PI, Mitotracker red e Mitotracker green.

Analisar o perfil oxidativo de mucosa normal, desordens potencialmente malignas com displasia e CEC oral por meio de reação de imunistoquímica para 4-HNE.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. S. *Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental de olho seco e a resposta ao uso de antioxidantes ômega 3 e ácido lipóico*. 2013. 134p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-31. 2014.

BAFFY, G.; DERDAK, Z.; ROBSON, S. C. Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *British Journal of Cancer*, v. 105, p. 469-474. 2011.

BAGLEY, R. G. *The Tumor Microenvironment*. New York: Humana Press, 2010. 767p.

BARRERA, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*, p. 1-21. 2012.

BOST, F. et al. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Nature*, p. 1-8. 2016.

CAIRNS, R.; HARRIS, I.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews*, v. 1, p. 85-95. 2011

CARRACEDO, A.; CANTLEY, L. C.; PANDOLFI, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*, v. 13, n. 4, p. 227–232. 2013.

CHAN, J. S. K. et al. Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. *Nature*, p. 1-11. 2017.

DALLEAU, S. et al. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation*, v. 20, p. 1615–1630. 2013.

DENKO, N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews*, p. 705-713. 2008.

DOUGLAS, L. Making oral cancer screening a routine part of your patient care. *Nature*. 2015.

EALES, K. L.; HOLLINSHEAD, K. E. R.; TENNANT, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Nature*, p. 1-8. 2016.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral Leukoplakia as It Relates to HPV Infection: A Review. *International Journal of Dentistry*, p. 1-7. 2012.

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

GENDEN, E. M. et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, v; 267, p. 1001-1017. 2010.

GUGNONI, M. et al. Autophagy and epithelial–mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Nature*. 2016.

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2008. 851 p.

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

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews*, p. 635-649. 2016.

HEIDEN, M. G. V. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.10, p. 671-684. 2011.

HENSON, B. J.; GOLLIN, S. M. Overexpression of *KLF13* and *FGFR3* in Oral Cancer Cells. *Cytogenet. Genome Res.*, v. 128, p. 192–198. 2010.

HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*, p. 703-707. 2008.

HUANG, C-F. et al. Clinical Significance of Keap1 and Nrf2 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, v. 8, n. 12. 2013.

INCA. *ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer*. Rio de Janeiro, 2012.

INCA. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2016.

ISHIKAWA, S. et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Nature*, p. 1-7. 2016.

JIANG, J. et al. Redox regulation in tumor cell epithelial–mesenchymal transition: molecular basis and therapeutic strategy. *Nature*, p. 1-12. 2017.

KAUR, J. et al. Clinical Significance of Altered Expression of b-Catenin and E-Cadherin in Oral Dysplasia and Cancer: Potential Link with ALCAM Expression. *Plos One*, v.8, n. 6. 2013.

KIM, J.; KIM, J; BAE, J. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Nature*, p. 1-13. 2016.

KINUGASA, H. et al. Mitochondrial SOD2 regulates epithelial–mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*, p. 5229-5239. 2015.

KURHANEVICZ, J. et al. Analysis of Cancer Metabolism by Imaging Hiperpolarized Nuclei: Prospects for Translation to Clinical Research. *Neoplasia*, v. 13, p. 81-97. 2011.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, p. 670-691. 2016.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature*, p. 178-196. 2014.

LI, J. et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 14, p. 24438-24475. 2013.

LI, W. et al. Unraveling the roles of CD44/ CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Nature*, p. 1-15. 2017.

LIN, L. et al. Interleukin-37 expression and its potential role in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Nature*, p. 1-10. 2016.

LIU, W. et al. Oral Cancer Development in Patients with Leukoplakia – Clinicopathological Factors Affecting Outcome. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4. 2012.

LOU, X. et al. Accuracy of autofluorescence in diagnosing oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: a comparative study with aerodigestive lesions. *Nature*, p. 1-13. 2016.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E. et al. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature*, p. 1-21. 2016.

MESSADI, D. V. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *Nature Reviews*, p. 59-65. 2013.

MESSADI, D. V. et al. The clinical effectiveness of reflectance optical spectroscopy for the in vivo diagnosis of oral lesions. *Nature*, p. 162-167. 2014.

MUSHARRAF, G. S. et al. Metabolite Profiling of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of Oral Cavity Tissue Samples Revealed a Biomarker Pattern. *Nature*, p. 1-8. 2016.

NEVILLE, B. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 972 p.

NIETO, M. A. et al. EMT: 2106. *Cell*, p. 21-45. 2016.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Nature*, p. 1-12. 2016.

PAPAGERAKIS, S. et al. Oral epithelial stem cells – implications in normal development and câncer metastasis. *Exp Cell Res*, v. 325, n. 2, p. 111-129. 2015.

PELICANO, H.; MARTIN, D. S.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Nature*, p. 4633-4646. 2006.

RAM, H. et al. Oral Cancer: Risk Factors and Molecular Pathogenesis. *J. Maxillofac. Oral Surg.*, v. 10, n. 2, p. 132–137. 2011.

- RIGAS, B.; SUN, Y. Induction of oxidative stress as a mecanismo of action of chemopreventive agentes against câncer. *British Journal of Cancer*, p. 1157-1160. 2008.
- RIVERA, C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 8, n. 9, p. 11884-11894. 2015.
- SAINTGNY, P. et al. DeltaNp63 overexpression, alone and in combination with other biomarkers, predicts the development of oral cancer in patients with leukoplakia. *Clin. Cancer Res.*, v. 15, n. 19, p. 6284-6291. 2009.
- STEEG, P. S. Targeting metastasis. *Nature*, p. 201-218. 2016.
- STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature*, p.895-904. 2006.
- SULLIVAN, L. B.; GUI, D. Y.; HEIDEN, M. G. V. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumor biology and cancer therapy. *Nature*, p.680-693. 2016.
- TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer. *Journal of Oncology*, p. 1-10. 2011.
- TEICHER, B. A. *Tumor Metabolome Targeting and Drug Development*. Nova York: Springer, 2014. 198 p.
- TEICHER, B. A.; LINEHAN, W. M.; HELMAN, L. J. Targeting Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res.*, v. 18, n. 20, p. 5537–5545. 2012.
- TURLEY, E. A. et al. Mechanisms of Disease: epithelial–mesenchymal transition does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nature*, p. 280-290. 2008.
- VERSCHOOR, M. L. et al. Mitochondria and Cancer: Past, Present, and Future. *BioMed Research International*, p. 1-10. 2013.
- VYAS, S.; ZAGANJOR, E., HAIGIS, M. C. Mitochondria and Cancer. *Cell*, p. 556-566. 2016.

WEINBERG, R. *The biology of cancer*. Londres: Garland Science, 2014.  
WHO. *Guide to cancer early diagnosis*. Geneva, 2017.

WU, T. et al. Modulation of IL-1 $\beta$  reprogrammes the tumor microenvironment to interrupt oral carcinogenesis. *Nature*, p. 1-10. 2016.

XIAO, W. et al. Upregulation of miR-31 Is Negatively Associated with Recurrent/Newly Formed Oral Leukoplakia. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6. 2012.

XU, Q. et al. Long non-coding RNA regulation of epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis. *Nature*, p. 1- 10. 2016.

YAP, L. F. et al. HOPX functions as a tumour suppressor in head and neck cancer. *Nature*, p. 1-11. 2016.

ZHONG, H.; YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology*, p. 193-199. 2015.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser formatado nas normas da revista Tumor Biology.

### 5.1. Title

Energy metabolism profile in potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma

### 5.2. Abstract

Cancer cells vary their metabolism and it might be influenced by elements of the tumor microenvironment and the distance from them to blood vessel. These changes can contribute to the initiation of carcinogenesis, activation of the epithelial-mesenchymal transition and metastasis. We tested the hypothesis that altered tumor cell metabolism correlates with the aggressive behavior of oral squamous cell carcinoma (OSCC). We investigated in human OSCC biopsies the proteins involved in the energy metabolism of the tumor and we found that OSCC tumors have an increase in proteins related to glycolysis and a decrease in mitochondria activity in comparison to its adjacent epithelium, probably due to the downregulation on pyruvate dehydrogenase, and in the antioxidant activity. Additionally, the more undifferentiated cells (SCC25) have lower mitochondrial mass and membrane potential, generate lower levels of reactive oxygen and nitrogen species, which correlated with a greater cell viability. When we analyzed the marker of oxidative stress 4-HNE in biopsies, the levels of reactive species are increased in the tumor and in the potentially malignant lesions in the epithelial regions. There was a decrease in the levels of 4-HNE/reactive species in the connective tissue underlying dysplastic regions and the OSCC invasion zone. Our results indicate a dynamism during oral carcinogenesis regarding the energy metabolism of cells and it varies according to each stage of this process with the potential to be influenced by elements of the tumor microenvironment.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma. Potentially malignant lesions. Energy metabolism of cancer. Reactive species.

### 5.3. Introduction

Squamous cell carcinoma is one of the most common type of human cancer (DOTTO; RUSTGI, 2016). One of the subtypes is the oral squamous cell carcinoma (OSCC), which has an annual incidence of 400.000 new cases (ISHIKAWA et al.,



2016) and comprises 90% of all oral cancers (BANERJEE et al., 2017a). During oral carcinogenesis, keratinocytes are chronically exposed to physical, biological and/or chemical risk factors that promote biochemical, molecular and morphological modifications, resulting in disruption of tissue homeostasis. (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011).

Metastasis is responsible for more than 90% of deaths related to cancer (XU et al., 2016) and are characterized by tumor cells invasion and proliferation into tissues distant from its origin (GUGNONI, M. et al., 2016). Additionally, during oral carcinogenesis, there are changes in stroma forming a tumor microenvironment capable of modulating the migratory behavior of tumor cells (RAMOS et al., 2016) and contributing to metastasis. According to Hanahan and Weinberg (2011), tumor microenvironment is constructed during the various stages of carcinogenesis and is constituted by specialized cells - cancer cell, cancer stem cell, cancer-associated fibroblast, endothelial cell, pericyte, immune inflammatory cells – growth factors, cytokines and reactive oxygen species (ROS) that function as intermediates in cellular signaling (CHAN et al., 2017) and contributing to tumor survival and invasion.

Tumors require metabolites to produce ATP, maintain the reduction-oxidation equilibrium, and proliferate. The metabolism of tumor cells varies, depending on the influences of the tumor microenvironment and its proximity to blood supply. Cells that are located near blood vessel have access to nutrients and oxygen, and, therefore, they will produce ATP aerobically through oxidative phosphorylation. On the opposite situation, when tumor cells are distant from the vasculature and have limited access to nutrition, they will produce ATP through alternative catabolic pathways, like glycolysis and autophagy (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016). It has been demonstrated that cancer cells with glucose privation will increase glycolysis to reduce ROS production (PANIERI; SANTORO, 2016).

ROS are produced mainly in the mitochondria (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016) and their levels are increased in almost all cancer types (CHAN et al., 2017) affecting proteins involved in extracellular matrix and cytoskeleton remodeling, cell-cell junction and cell motility (JIANG et al., 2017). High levels of ROS also result in changes on macromolecules, like lipids, and DNA oxidation that can trigger genomic instability and EMT (KINUGASA et al., 2015; VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016). The 4-hydroxynoneal (4-HNE), is a product of non-enzymatic lipid peroxidation produced mainly by ROS (DALLEAU et al., 2013 KWEIDER et al., 2012; WALI et al.,

2016), and is associated with the regulation of a variety of cellular pathways like apoptosis, differentiation and proliferation (JI et al., 2016).

In this study, we verified the metabolic profile of OSCC tumor cells and their relationship with aggressiveness. We demonstrated that, during the oral carcinogenesis process, cellular metabolism is dynamic and varies according to each stage of this process with the potential to be influenced by elements of the tumor microenvironment.

#### 5.4. Material and Methods

##### 5.4.1. Human Biopsies and Cell lines

The experimental design and the informed consent procedures were approved by the Ethical Committee of Federal University of Rio Grande do Sul-Brazil and of Hospital de Clínicas de Porto Alegre-Brazil (CAE# 41091314.4.0000.5327). All patients in this study provided written informed consent. Patients (n=3) with oral lesions were interviewed and submitted to surgery and the OSCC diagnosis was confirmed histopathologically by a pathologist. The fragments from regions corresponding to the center of the tumor and the tumor adjacent epithelium (TAE) were collected and analyzed through proteomics. Paraffin-embedded samples from human biopsies of normal oral mucosa (n=4), oral epithelial dysplasia (n=9) and oral squamous cell carcinoma (n=10) were obtained from Basic Research Center in the Dentistry School of Federal University of Rio Grande do Sul and were stained for 4-HNE through immunohistochemistry reaction. All patients informations are described on Table 1.

Oral squamous cell carcinoma cell lines (Cal27 and SCC25) were obtained from the Tissue Culture Facility at School of Medicine of University of Virginia. The keratinocyte cell line (HaCaT) was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank and primary fibroblasts were obtained from oral mucosa tissue donated from tooth extraction. Cal27 cells (American type cell culture – ATCC - CRL-2095TM) and HaCat cells (BCRJ-0341) were cultivated in DMEM high glucose (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) while SCC25 cells (ATCC CRL-1628TM) in DMEM/F12 with 15mM HEPES and 0.5mM sodium pyruvate (Gibco) supplemented with FBS 10% and hydrocortisone (400ng/ml, Sigma). Primary fibroblasts were cultivated in DMEM low glucose (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco). All cells were maintained in incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Table 1 - Participants baseline characteristics of the 4-HNE immunostaining in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and OSCC.

Variable	Category	Normal oral mucosa (n=4)	Oral dysplasia (n=9)	OSCC (n=10)
		n	n	n
Age	19-46	3	4	1
	47-75	1	5	8
	Unknown	0	0	1
Ethnicity	Afro-descendant	1	2	1
	Caucasian	3	6	8
	Unknown	0	1	1
Gender	Male	3	4	9
	Female	1	5	1
	Unknown	0	0	0
Cigarette	Yes	0	1	4
	Not	0	0	0
	Unknown	4	8	6
Alcohol	Yes	0	0	2
	No	0	0	0
	Unknown	4	9	8
Biopsy region	Tongue	1	2	5
	Alveolar ridge	0	1	1
	Gingiva	3	2	2
	Palate	0	1	1
	Jugal mucosa	0	1	0
	Lip	0	1	0
	Unknown	0	1	1

#### 5.4.2. Mass spectrometry

The Pierce BCA Protein Assay was used to determine and adjust the protein amounts of lysates from tumor adjacent epithelium and center of the tumor samples. Chloroform/methanol precipitation was performed with 100 µg of each sample, according to Wessel and Flügge (1984). Pellets were suspended in 100 mM TEAB, pH 8.5, and 8 M urea and proteins digested with a protocol adapted from Klammer and MacCoss (2006). Briefly, disulphide bonds were reduced in 5 mM TCEP for 30 min at 37°C and then cysteines were alkylated in 25 mM iodoacetamide (IAM) for 20 min at room temperature in the dark. Urea was diluted to 2 M with 100 mM TEAB, and the complex protein extract was digested with trypsin in a ratio of 1:100 enzyme/protein along with 2 mM CaCl<sub>2</sub> by overnight incubation at 37 °C.

Dimethyl labeling of 25 ug of each digested sample was performed as described by Boersema et al. (2009). Peptides were labeled at free-amines (N-terminus and lysine side chain), by combining isotopic forms of formaldehyde and sodium cyanoborohydride, resulting in mass shifts of +28.0313 Da (Light: CH<sub>2</sub>O + NaBH<sub>3</sub>CN) and +32.0564 Da (Intermediate: CD<sub>2</sub>O + NaBH<sub>3</sub>CN) per incorporated label. Tumor adjacent epithelium was labeled as "Light" and center of tumor sample as "Intermediate". The two different labeled samples were mixed and pressure-loaded into a biphasic column for Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) analysis.

MuDPIT columns were prepared by first creating a Kasil frit at one end of a deactivated 250 µm ID/360 µm OD capillary (Agilent Technologies). Kasil frits were prepared by dipping 20 cm capillary in 300 µL Kasil 1624 (PQ Corporation) and 100 µL formamide solution, curing at 100°C for 3 hours and cutting the frit to a length of ~2 mm. A biphasic MuDPIT column was produced in the fritted column by packing in-house 2.5 cm of strong cation exchange (SCX) particles (5 µm Partisphere, Phenomenex) followed by 2.5 cm of reversed phase particles (5 µm ODS-AQ C18, YMC) from particle slurries in methanol. Analytical reversed phase columns were fabricated by pulling a 100 µm ID/360 µm OD (Polymicro Technologies) to a 5 µm ID tip. Reversed phase particles (5 µm ODS-AQ C18, YMC) were packed directly into the pulled column until 18 cm in length. MuDPIT columns and analytical columns were connected using a zero-dead volume union (Upchurch Scientific).

Peptide mixtures were analyzed by LC-MS using quaternary HP 1100 series HPLC pump (Agilent technology) connected to an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). Electrospray was performed directly from the tip of the analytical column. Solution A was 5 % acetonitrile and 0.1 % formic acid, solution B was 80 % acetonitrile and 0.1 % formic acid, solution C was 500 mM ammonium acetate, 5 % acetonitrile and 0.1 % formic acid. Flow rate was approximately 300 nL/min. MuDPIT experiments were performed using a 30-minute transfer step followed by solution C injection and five 60-minute, one 120-minute and one 180-minute separation steps. The LTQ Orbitrap Velos was also operated in a data dependent mode, ESI voltage of 3.5 kV and inlet capillary temperature of 275 °C. Full MS1 scans were collected in the Orbitrap, with mass range of 300 to 1200 m/z at 60,000 resolution and an AGC target of  $1 \times 10^6$ . The 20 most abundant ions per MS1 scan were selected for CID MS2 in the ion trap with an AGC target of  $1 \times 10^4$  and threshold intensity of 500. Maximum fill times were 250 and 100 ms for MS1 and MS2 scans, respectively, and dynamic exclusion was enabled.

#### 5.4.3. Flow cytometry

Cultured HaCaT, Cal27, SCC25 and fibroblast cells were trypsinized and then centrifuged for 10 min at 2000 rpm. After, the cells were washed with PBS pH 7.4, centrifuged and resuspended in 100  $\mu$ L at a concentration of 1000 cells/ $\mu$ L. Samples were incubated at 37 °C with fluorescent probes prior the flow cytometric analysis according to manufacturer instructions. Oxidant species levels were measured incubating cells with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA; 10  $\mu$ M; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (Crnkovic – PMID 22391221); nitric oxide levels were measured incubating cells with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM; 10  $\mu$ M; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA); mitochondrial superoxide were measured incubating cells with MitoSOX® Red (1  $\mu$ M; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA); mitochondrial mass and membrane potential were measured using MitoTracker® Green and MitoTracker® Red (100 nM; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR - USA) respectively; and, the percentage of necrotic cells in samples was measured using propidium iodide (PI) staining. Cells were gated based on the FSC and SSC pattern of the sample cells and 30,000 events were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Bioscience, Becton & Dickinson, USA); a non-labeled sample was used as negative fluorescent control. Data were

analyzed using FlowJo® software (USA) and are expressed as mean fluorescence intensity, except Mito Tracker Green, Mito Tracker Red which data are expressed as percentage of stained cells and PI staining which data are also expressed as percentage of necrotic cells.

#### 5.4.4. Immunohistochemistry

The paraffin-embedded samples were submitted to histological slice in microtome (3µm) and collected on silanized slides. The paraffin slices were incubated (1h, 60°C) and immersed in xylene, alcohol and rehydrated with PBS at room temperature. Endogenous peroxidase blockade was performed with methanol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and washed with PBS. Antigen retrieval (TRIS-EDTA retrieval buffer, pH 9, steamer, 20 min) was performed. After, the slices were washed with PBS and incubated with the primary antibody (anti-4 hydroxynonenal antibody ab46545, 1: 200, Abcam, UK), overnight in the refrigerator. After, the slices were washed with PBS, incubated with DAKO Envision + Dual Link System HRP secondary antibody (2h in oven 37 °C) and washed again with PBS. Peroxidase activity was revealed using Diaminobenzidine 0.05% (DAB, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) diluted in Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), for 5 min. The slices were washed in PBS and counterstained with Harris's hematoxylin. The slices were dehydrated (ethanol and xylene) and mounted using Permount, (Fisher, Massachusetts, USA). Negative control consisted of the omission of the primary antibody. Tissue obtained from salivary gland adenocarcinoma was used as a positive control. The whole stained slice was scanned using a microscope Imager M 2.0 (Zeiss, Germany) with a 20x magnification objective. The cell location of 4-HNE immunostaining was the cytoplasm and it was obtained through the image J program (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (stained cells and stained area).

For sample analysis, images from the normal oral mucosa were obtained from the normal epithelial and connective tissue. Images from samples with oral epithelial dysplasia diagnosis were obtained from normal epithelial and connective tissue and the dysplasia region containing the epithelial and connective tissue. Finally, images from OSCC samples were obtained from regions containing normal epithelial and connective tissue; dysplasia epithelial and connective tissue; cancer region and surrounding connective tissue.

#### 5.4.5. Statistical analysis

Mass spectrometry: Student T-test was used to analyze significantly difference from proteins expressed on central of the tumor compared to tumor adjacent epithelium and level of significance used was 1%. It was calculated the average ratio (AR) of protein expression, comparing the same protein from central of the tumor and the tumor adjacent epithelium. It was considered  $AR > 1$  as protein overexpression and  $AR < 1$  as protein down regulation.

Flow cytometry: Data are presented as mean and standard deviation. Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc was performed to compare markers distribution in cell lines. Significance level was 5%.

Immunohistochemistry: It was calculated the average ratio between stained cell number and total área by 4-HNE in square pixels in epithelial tissue and connective tissue from normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and OSCC. All data are presented as mean and standard deviation.

### 5.5. Results

*Glycolytic pathways are up regulated in OSCC.*

In order to identify proteins involved in OSCC metabolic profile, it was performed the protein quantification from three tumours samples (A, B and C) and its respective tumour adjacent epithelium (Figure 1A). From 4179 proteins identified by mass spectrometry, it was sorted out the proteins with statistically difference ( $p < 0.01$ ) in the comparison of each tumor to its respective tumour adjacent epithelium (A= 846 proteins; B=543 proteins; C=531 proteins). Then, it was analysed which proteins were altered in at least two tumors (A+B+C= 134 proteins; A+B= 148 proteins; A+C = 176 proteins; B+C= 62 proteins) (Figure 1C). Then, the identified proteins were correlated with their functions according to energy metabolism ([www.uniprot.org/uniprot](http://www.uniprot.org/uniprot)), considering  $AR > 1$  as protein overexpression and  $AR < 1$  as protein down-regulated. Categories were established as glycolysis (Table 2), mitochondrial energy metabolism (Table 3) and redox status (Table 4).

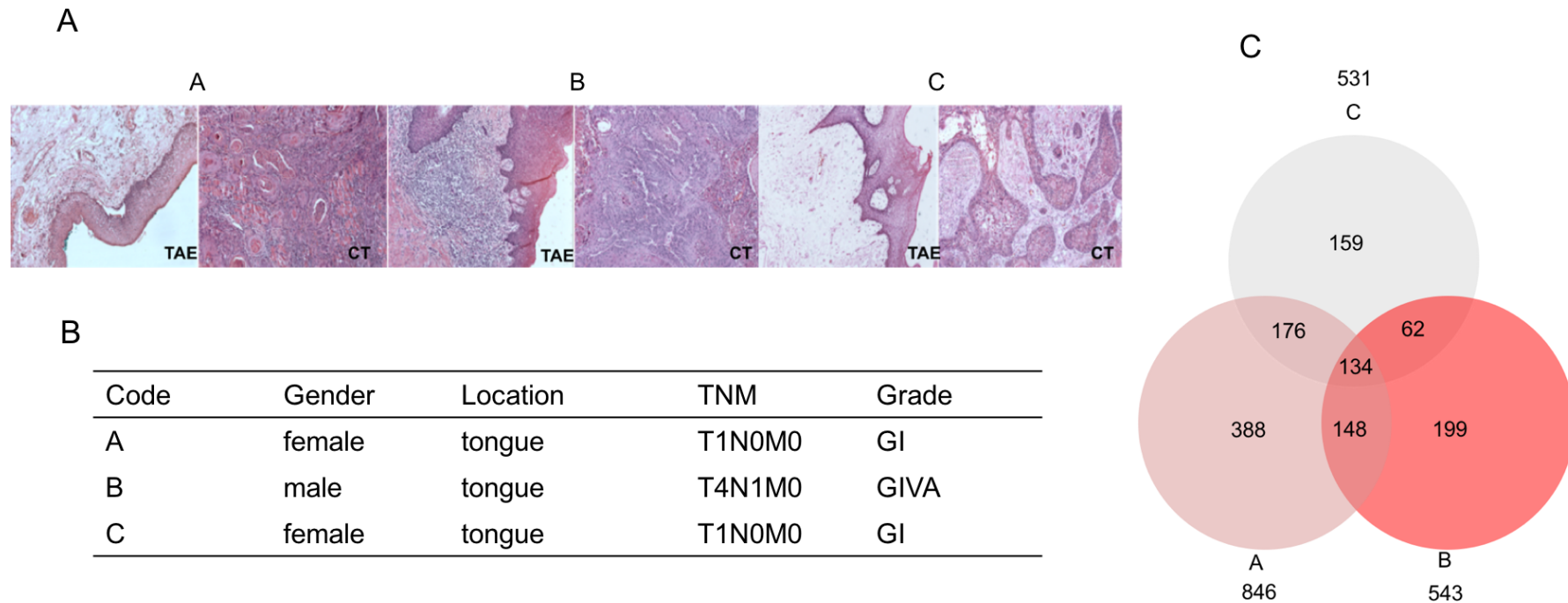


Figure 1 - (A) Histopathology (hematoxylin and eosin - HE) of tumors A, B and C (CT = center of the tumor, TAE tumor adjacent epithelium) (100x). (B) Description of the sample regarding to patient's gender, location and stage of tumors based on the TNM system (T = tumor size from 1 (lowest) to 4 (highest)), (N = presence (1) or not (0) of the lymph nodes), (M = presence (1) or not (0) of distant metastasis). From the association of these parameters, tumors are classified into stages (I, II, III and IV), the first (I) having the best prognosis (smaller tumors and no metastasis) and the fourth (IV), which has the worst prognosis greater and/or with the presence of metastasis) (PATEL SG, SHAH JP, 2005). (C) Quantitative proteomics illustrated by the Venn Diagram, representing the relationship among the sets of protein numbers identified in tumors A, B, and C with statistically significant difference compared to their adjacent epithelium (t-test,  $p < 0,01$ ).



Table 2- Proteins related to glycolysis, subexpressed (AR <1) or overexpressed (AR > 1, in bold) in oral squamous cell carcinoma.

Protein	Function	Average Ratio (CT/TAE)		
		A	B	C
Fructose-bisphosphate aldolase A	catalysis	0,33	<b>1,59</b>	0,17
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	catalysis	0,83	<b>1,78</b>	<b>5,63</b>
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS	ATP production	<b>2,23</b>	<b>1,58</b>	_
6-phosphofructokinase, muscle type OS	catalysis	0,05	_	0,53
Alpha-enolase OS	catalysis, probable tumor suppressor	<b>3,1</b>	_	<b>2,21</b>
Fructose-bisphosphate aldolase C OS	catalysis	0,26	_	0,19
Glucose-6-phosphate isomerase OS	catalysis	0,4	_	0,69
Glycogen debranching enzyme OS	catalysis	0,08	_	0,19
Glycogen phosphorylase, brain form OS	catalysis	0,25	_	0,61
Phosphoglucomutase-1 OS	catalysis	0,27	_	0,26
Phosphoglycerate kinase 1 OS	catalysis	<b>1,34</b>	_	0,69
Phosphoglycerate kinase 2 OS	catalysis	<b>1,44</b>	_	0,48
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS	catalysis, link between glycolysis and Krebs cycle	0,13	_	0,25
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS	catalysis	0,3	_	0,29
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS	catalysis	_	<b>2,69</b>	<b>1,64</b>
Signal transducer and activator of transcription 3 OS	negative regulation of the glycolytic process	_	<b>1,62</b>	<b>3,68</b>

Table 3 - Proteins related to energy mitochondrial metabolism, subexpressed (AR <1) or overexpressed (AR > 1, in bold) in oral squamous cell carcinoma.

Protein	Function	Average Ratio (CT/TAE)		
		A	B	C
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	catalysis	0,48	<b>1,4</b>	0,21
Aconitate hydratase, mitochondrial	catalysis	0,22	0,85	0,28
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	catalysis	0,11	0,74	0,57
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	catalysis	0,43	0,38	0,32
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	catalysis	0,14	0,81	0,3
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	catalysis	0,18	0,56	0,17
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	catalysis	0,3	0,64	0,2
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP production	0,68	0,79	0,44
ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP production	0,65	0,52	0,18
ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP production	0,43	0,62	0,21
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	electron transport	0,52	0,64	0,15
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	electron transport	0,36	0,66	0,46
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	beta-oxidation of short chains of fatty acids	0,27	0,64	0,16
ADP/ATP translocase 2 OS	catalysis	0,58	<b>1,82</b>	_
ADP/ATP translocase 3 OS	catalysis	0,37	<b>1,65</b>	_
ADP/ATP translocase 4 OS	catalysis	0,22	<b>1,52</b>	_

(Continues)

(Continuation)

Chloride intracellular channel protein 1 OS	regulation of mitochondrial membrane potential	<b>1,14</b>	<b>1,23</b>	–
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS	mitochondrial quality control	0,38	0,62	–
Electron transfer flavoprotein subunit beta OS	Electron transfer	0,32	0,56	–
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS	ATP binding	0,35	<b>1,35</b>	–
Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial OS	ADP binding	0,3	<b>1,34</b>	–
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS	regulation of mitochondrial transcription	0,5	<b>1,83</b>	–
NADPH--cytochrome P450 reductase OS	transfer of electrons from NADP to cytochrome p450	0,46	<b>1,45</b>	–
Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS	antioxidant activity	<b>2,28</b>	0,85	–
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS	Mitochondrial DNA replication	<b>2,51</b>	0,35	–
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial OS	Hydrogen sulfite metabolic process	0,54	<b>1,46</b>	–
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS	catalysis	0,15	–	0,15
ADP/ATP translocase 1 OS	catalysis - exchange of cytoplasmic ADP with mitochondrial ATP through the internal mitochondrial membrane	0,12	–	0,7
Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS	metabolic exchange between mitochondria and cytosol	0,1	–	0,21
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS	ATP production	0,35	–	0,49
ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS	ATP production	0,7	–	0,11
ATP synthase subunit g, mitochondrial OS	ATP production	0,11	–	0,18
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS	ATP production	0,3	–	0,37
Citrate synthase, mitochondrial OS	Krebs cycle - synthesis of isocitrate from oxaloacetate	0,46	–	0,46

(Continues)

(Continuation)

Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS	electron transport	0,16	–	0,28
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS	electron transport	0,17	–	0,24
Cytochrome c oxidase subunit 2 OS	electron transport	0,12	–	0,26
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial OS	electron transport	0,48	–	0,15
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial OS	electron transport	0,3	–	0,29
Dihydropyruvate dehydrogenase, mitochondrial OS	electron transport, metabolic process of pyruvate	0,38	–	0,45
Elongation factor Tu, mitochondrial OS	mitochondrial translation	0,57	–	0,57
Fumarate hydratase, mitochondrial OS	Krebs cycle, tumor suppressor	0,56	–	0,37
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial OS	Krebs cycle	0,31	–	0,48
Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS	Krebs cycle	0,33	–	0,52
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS	Krebs cycle	0,28	–	0,4
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS	electron acceptor to transfer electrons to the main mitochondrial respiratory chain via ETF-ubiquinone oxidoreductase	0,09	–	0,16
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS	mitochondrial transport	0,14	–	0,32
Mitochondrial inner membrane protein OS	mitochondrial respiratory chain	0,35	–	0,67
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial OS	Krebs cycle	0,14	–	0,47
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS	electron transport	0,17	–	0,09
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 OS	electron transport	0,57	–	0,15

(Continues)

(Continues)

NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial OS	electron transport	0,37	–	0,18
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS	electron transport	0,24	–	0,19
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS	electron transport	0,29	–	0,3
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS	electron transport	0,27	–	0,59
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial OS	electron transport chain, Krebs cycle	0,39	–	0,22
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS	response to oxidative stress	0,31	–	0,48
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS	beta-oxidation of fatty acids	0,28	–	0,41
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS	beta-oxidation of fatty acids	0,41	–	0,2
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS	transport of ions in the mitochondrial membrane	0,28	–	0,38
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS	ATP production	–	0,38	0,32
Cytochrome b-c1 complex subunit 7 OS	electron transport, oxidative phosphorylation, oxidation-reduction process	–	0,42	0,04
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7 OS	electron transport	–	0,35	0,08

(Concluded)

Table 4 - Proteins related to redox status, subexpressed (AR <1) or overexpressed (AR >1, in bold) in oral squamous cell carcinoma.

Protein	Function	Average Ratio (CT/TAE)		
		A	B	C
Haptoglobin	antioxidant	0,14	0,73	0,59
Protein DJ-1	antioxidant	0,67	0,68	0,39
Ceruloplasmin OS	antioxidant defense	0,1	0,68	_
40S ribosomal protein S3 OS	response to oxidative stress	0,81	<b>1,23</b>	_
Elongation factor 1-beta OS	response to oxidative stress	<b>1,83</b>	0,61	_
Peroxiredoxin-1 OS	response to oxidative stress	0,57	<b>1,16</b>	_
Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS	response to oxidative stress	0,75	0,75	_
Protein disulfide-isomerase A4 OS	redox homeostasis	<b>2,23</b>	0,71	_
Protein disulfide-isomerase A6 OS	redox homeostasis	<b>2</b>	0,81	_
Tropomyosin alpha-1 chain OS	response to oxidative stress	0,29	0,62	_
Ubiquilin-1 OS	regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	<b>2,13</b>	0,68	_
Apolipoprotein E OS	antioxidant activity	0,38	_	0,67
Catalase OS	antioxidant activity	0,33	_	0,72
ERO1-like protein alpha OS	response to oxidative stress	0,47	_	<b>1,22</b>
Glutathione S-transferase Mu 2 OS	antioxidant	0,04	_	0,12
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial OS	antioxidant, ROS metabolic process	0,14	_	0,47
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS	ROS metabolic process	0,17	_	0,09
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS	ROS metabolic process	0,24	_	0,19

(Continues)

(Continuation)

NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS	ROS metabolic process	0,29	_	0,3
Peroxiredoxin-2 OS	antioxidant activity	0,16	_	0,6
Peroxiredoxin-6 OS	antioxidant activity	0,26	_	0,44
Protein S100-A8 OS	oxidant-scavenging	0,44	_	0,27
Protein S100-A9 OS	antioxidant activity	0,83	_	0,31
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS	response to oxidative stress	0,17	_	0,31
Serum albumin OS	antioxidant activity	0,06	_	0,97
Thioredoxin OS	response to oxidative stress	<b>1,71</b>	_	0,31
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS	response to oxidative stress	0,31	_	0,48
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS	negative regulation of ROS metabolic process.	0,28	_	0,38
Elongation factor 1-gamma OS	glutathione metabolic process	_	<b>2,09</b>	<b>2,78</b>
Elongation factor 2 OS	response to hydrogen peroxide	_	<b>2,23</b>	<b>2,68</b>
Glutathione S-transferase omega-1 OS	oxidoreductase activity, glutathione metabolic process	_	<b>1,62</b>	<b>1,56</b>
Glutathione S-transferase P OS	response to ROS	_	<b>1,32</b>	<b>2,21</b>
Signal transducer and activator of transcription 3 OS	negative regulation of hydrogen peroxide biosynthetic process	_	<b>1,62</b>	<b>3,68</b>
Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS	response to ROS	_	0,08	0,04

(Concluded)

It was identified 16 proteins related to glycolysis that showed changes in the expression in the center of the tumor when compared to the epithelium at the free zone of the tumor (control). Among them, we identified the overexpression of glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase and a downregulation on pyruvate dehydrogenase. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in generation of NADH, pyruvate kinase in the generation of pyruvate and the pyruvate dehydrogenase is involved in the transformation of pyruvate to acetyl-CoA, necessary to start the cycle of Krebs in mitochondria.

In the analysis of mitochondria-related proteins, from the 63 proteins identified, 12 were overexpressed and 51 were downregulated in the tumor. This characterizes a decreased mitochondrial activity, including low expression of proteins involved in the tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle) and oxidative phosphorylation. Also, cytochrome C, which is also related to induction of apoptosis (ZHANG et al., 2017), was downregulated in all samples.

Tumors showed variable expression for 34 proteins related to redox status. The expression profile was not uniform among samples, but it was noticed a decrease on proteins related to antioxidant activity, such as Apolipoprotein E, Catalase, Peroxiredoxin and protein S100 and an increase on glutathione S-transferase, involved in glutathione metabolic process. Taken together, the quantitative proteomic data shows that OSCC tumors have an increase on proteins related to glycolysis, with the potential to generate pyruvate and NADH, which was accompanied by a decrease on mitochondria and antioxidant activity.

#### *EMT correlates with lower metabolism.*

Since there seems to be an association between level of differentiation and metabolic profile, we investigated the metabolic activity in epithelial cell lines (HaCaT), oral squamous cell carcinoma with high (Cal27) or low (SCC25) levels of differentiation (RAMOS et al. 2016) and fibroblasts. For this, cells were exposed to markers to verify mitochondrial superoxide (Mitosox), mitochondrial mass (MitoTracker Green) and mitochondrial membrane potential (Mito Tracker Red). In addition, we analyzed the levels of reactive oxygen and nitrogen species (DCF), levels of nitric oxide (DAF) and cell death (PI).



Cells that underwent EMT (SCC25) had lower mitochondrial mass and membrane potential compared to highly differentiated OSCC cells (Cal27) and epithelial cells (HaCaT). There was no statistically significant difference among fibroblasts and other cells. This suggests that undifferentiated cells have glycolytic metabolism and potentially produce fewer reactive species than cells that have not yet completed the epithelial-mesenchymal transition (Cal27).

It was observed that the production of oxygen and nitrogen reactive species was significantly lower in aggressive OSCC cells (SCC25) compared to the less aggressive OSCC cells (Cal27). The same happened with the production of nitric oxide, where epithelial cells (HaCaT) presented significantly higher values in comparison to high-differentiated tumor cells (Cal27). No statistically significant difference was found for mitochondrial superoxide production among all cell lines (Figure 2). Additionally, a decrease in cell death rates was observed in cells with a mesenchymal profile (SCC25 and fibroblasts) when compared to cells with a more epithelial profile (HaCaT and Cal 27) (Figure 3). These data show that, in general, the more undifferentiated cells (SCC25) have lower mitochondrial mass and membrane potential, generate lower levels of reactive oxygen and nitrogen species, which correlated with a greater cell viability.

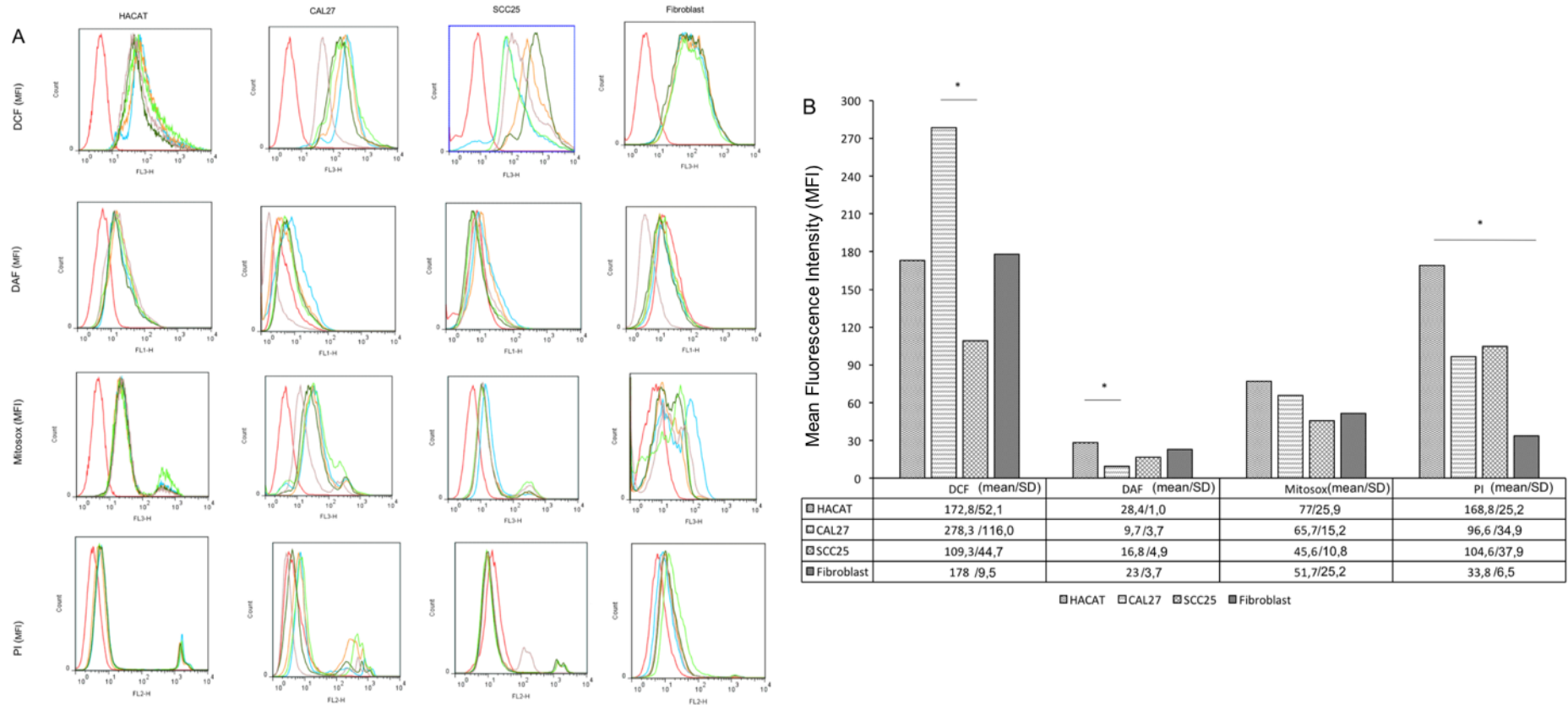


Figure 2 - (A) HaCaT, Cal27, SCC25 and fibroblast cells were labeled with DCF, DAF, MitoSOX, PI and submitted to flow cytometry. (B) The levels of oxidants, nitric oxide levels, mitochondrial superoxide production and cellular necrosis levels are represented according to the results of (A) ( $n = 5$ ). Data are represented by mean and standard deviation. The Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc were performed to compare cell line distributions between the markers ( $p < 0.05$ ). MFI (Mean Fluorescence Intensity)

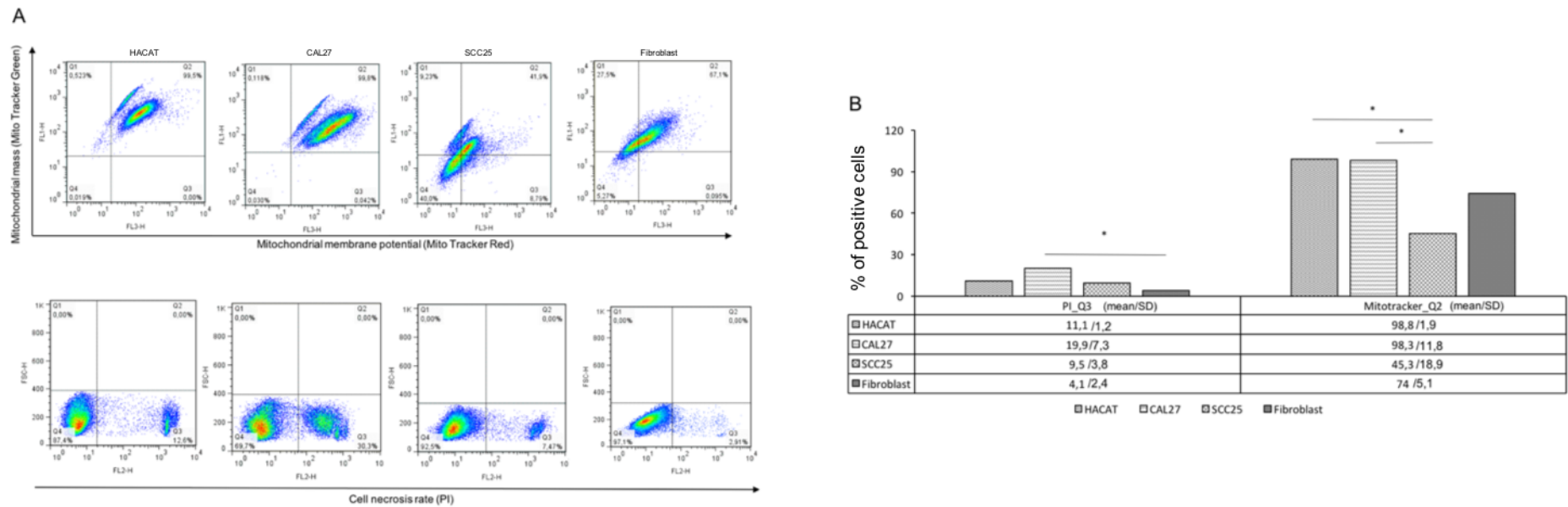


Figure 3 - (A) HaCaT, Cal27, SCC25 and fibroblast cells were labeled with Mito Tracker Green, Mito Tracker Red, PI and submitted to flow cytometry. (B) Results of cell necrosis rates and mitochondrial parameters mass and membrane potential are represented according to the results of (A) ( $n = 5$ ). Data are represented by mean and standard deviation. The Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc were performed to compare cell line distributions between the markers ( $p < 0.05$ ).

*Oxidative damage increases in potentially malignant lesions and OSCC tumors.*

Since the results from cell lines and mass spectrometry suggest a variable change on metabolism according to the differentiation level of the tumor cell, we analyzed the lipid peroxidation profile (4-HNE) as a marker of oxidation levels in OSCC biopsies, potentially malignant lesions (oral epithelial dysplasia) and normal oral mucosa (Figure 4). For this, we analyzed the number of stained cells and the stained area in regions containing epithelial and/or dysplastic and/or tumor tissues and its respective connective tissue (Figure 5A).

When it was compared the epithelial regions of normal oral mucosa with the epithelium surrounding dysplasia or OSCC (Figure 5B, a, b, d, respectively), we observed an increase in 4-HNE staining mainly in epithelium surrounding dysplastic regions. Similarly, when we compared normal oral mucosa (Figure 5B, a) with regions of dysplasia (Figure 5B, c, e) or the center of OSCC lesions (Figure 5B, f), we observed an increase in 4-HNE staining in OSCC lesions.

When we compare regions of connective tissue underlying the normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia, and OSCC (Figure 5C, a, b, d, respectively), there is a decrease in 4-HNE staining in the biopsies of dysplastic and OSCC lesions when compared to normal mucosa. This decrease is more expressive in the connective tissue underlying dysplastic regions (Figure 5C, c, e) and in the connective tissue of the OSCC invasion zone (Figure 5C, f), indicating less oxidative damage.

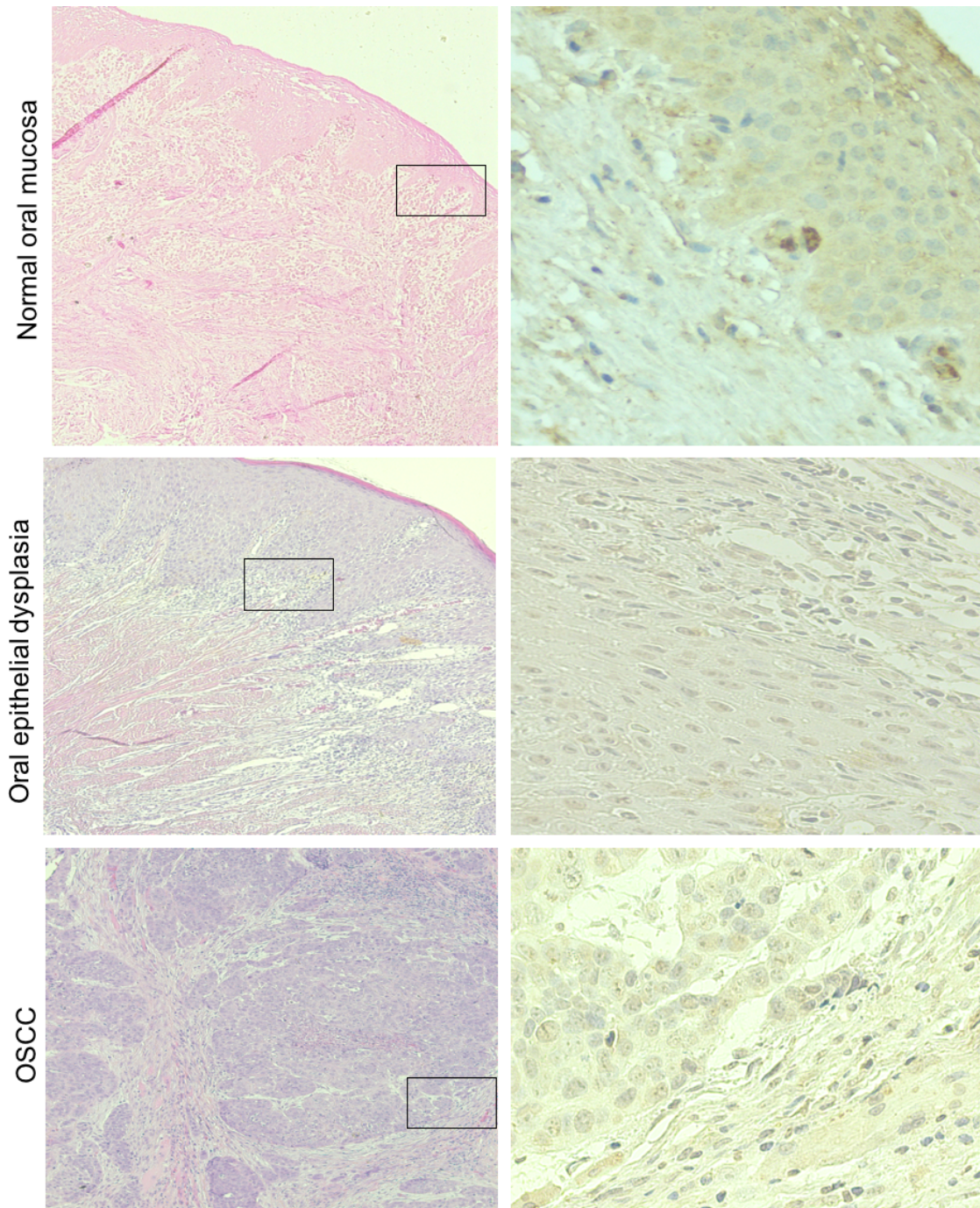


Figure 4 - 4-HNE expression in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and OSCC. Samples of normal oral mucosa (upper line), oral epithelial dysplasia (center line) and OSCC (lowerline) were stained for HE (left column) and 4-HNE (right column). HE images were obtained at low magnification (10x) and black box represent the area images were taken at higher magnification (63x) from sequential series slices submitted to 4-HNE immunostaining. Normal oral mucosa (n=4), oral epithelial dysplasia (n=9) and OSCC (n=10). Analysis pathologists.

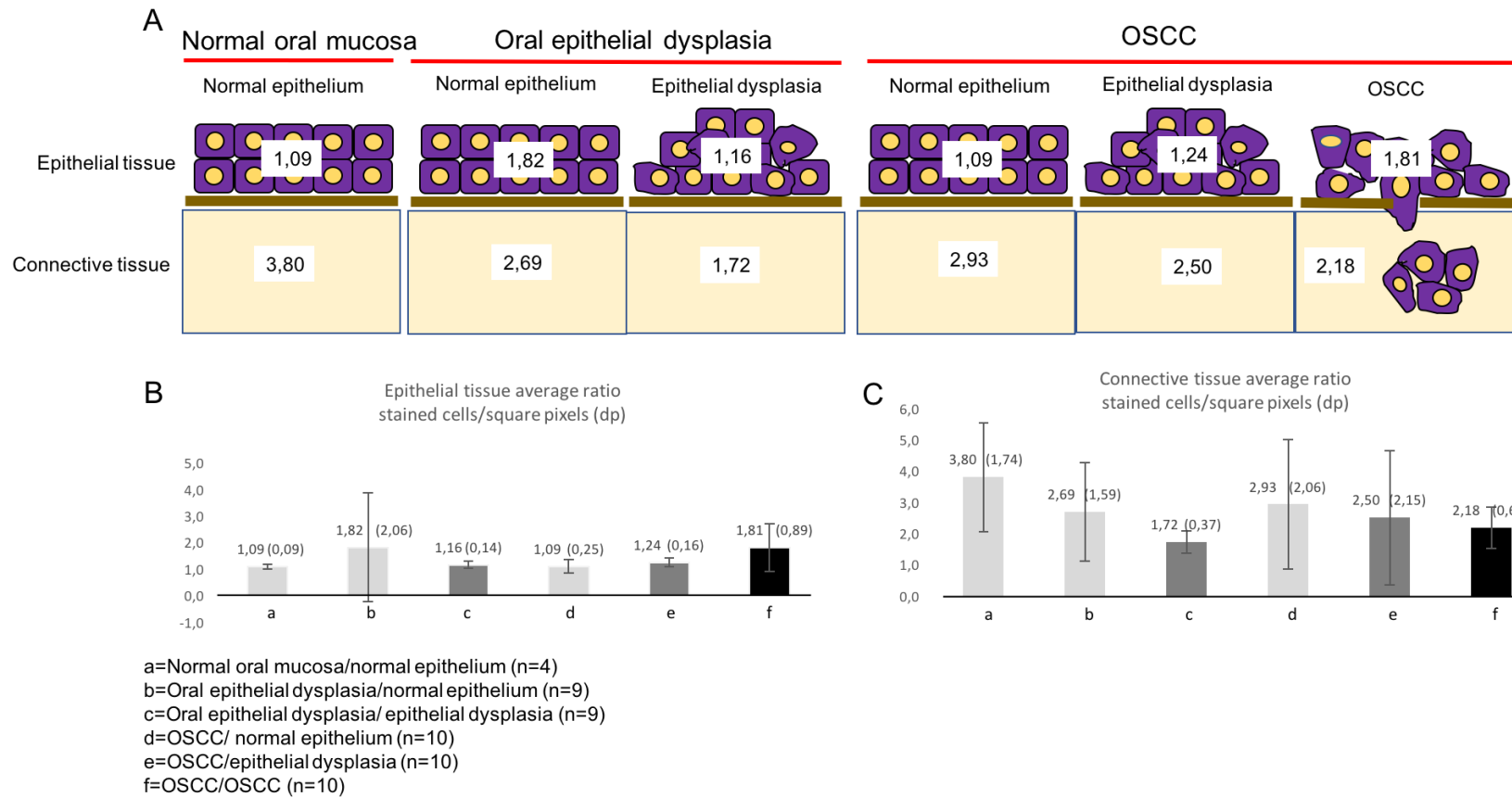


Figure 5 - Mean (A) and mean/standard deviation (B and C) of the ratio between the number of stained cells and the stained area in square pixels in the epithelial and connective tissues of histological slices of normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and OSCC, considering the regions of normal epithelium, epithelial dysplasia and OSCC of each slice.

## 5.6. Discussion

Alterations on tumor energy metabolism has been associated with metastasis, treatment resistance, and patient survival (DONG et al., 2017; SUN et al., 2017). In this process, cancer cells undergo modifications to maintain their biosynthetic needs (GAUDE, FREZZA, 2016; EALES; HOLLINSHEAD; TENNANT, 2016) - increase in the ATP and macromolecules production, as well as redox maintenance (NATH; CHAN, 2016). The altered cellular energy metabolism in cancer was originally described by Otto Warburg, who observed that these cells chose to perform aerobic glycolysis even in the presence of oxygen, whereas normal cells oxidize the total available glucose in the mitochondria (GAUDE, FREZZA, 2016). We demonstrated through quantitative proteomics comparing samples from the same patient, that cells from OSCC lesions have a higher glycolytic metabolism than the adjacent epithelium. Additionally, tumor B, which had the worst prognostic based on TNM system (Figure 1B) (PATEL SG, SHAH JP, 2005), has all quantified proteins related to glycolysis overexpressed.

The increase on glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) associated to low levels of mitochondrial NADH dehydrogenase in tumor cells indicates an increase on generation of NADH, the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>). NAD<sup>+</sup> that is involved in redox signaling and the imbalance on the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio is associated to tumor growth and metastasis in breast cancer (SANTIDRIAN et al., 2013). Also, high levels of NADH might affect histone deacetylation (LIN; GUARENTE, 2003) due to inhibition of Sirtuin enzymes (LIN; GUARENTE, 2003), which are involved on several diseases (SAUNDERS; VERDIN, 2007). Interesting, Sirtuin1 activity is associated to the EMT process in OSCC (CHEN et al., 2014), indicating a potential therapeutic role for the control of metabolic status in cancer cells.

High levels of pyruvate kinase (PK) associated to low levels of pyruvate dehydrogenase (PDH) and the imbalance on NAD<sup>+</sup>/NADH ratio indicates an increase on cytosolic pyruvate with the potential to be converted on lactic acid. In fact, high PK levels is associated to maintenance of cancer stem cell population (CHIEH et al., 2018) and is associated to a worse prognosis for OSCC patients (WANG et al., 2015). The inhibition of PK improved cell proliferation in melanoma cells (BABU et al., 2018),

while the restoration of PDH induced cell death in OSCC (GUIMARÃES et al., 2018). Increase on lactic acid leads to an acidification of the extracellular microenvironment, which affects the activity of metalloproteases (FENG et al., 2017) and contributes to cell invasion and metastasis. Also, the acidification modulates the behavior of tumor and normal cells (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016; OHASHI et al., 2017), such as the modulating of M2-macrophages (OHASHI et al., 2017) that is associated to worst prognosis in OSCC (ALVES; DIEL; LAMERS, 2017). Also, the detection of cancer metabolites (SULLIVAN; GUI; HEIDEN, 2016) could be used as a potential diagnostic parameter (SALUJA et al., 2016) for OSCC.

Mitochondria plays an important role on tumorigenesis of several cancers (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016; CHATTARAGADA et al., 2017). Our association of proteomics analysis with the *in vitro* data indicates that more undifferentiated OSCC cells show low levels of mitochondrial mass and activity. The decrease on mitochondria activity also contributes to the imbalance redox homeostasis. Changes in mitochondria is associated to tumor plasticity, such as metastasis (LEBLEU et al., 2014), and modulation of mitochondria activity has improved antidrug resistance (WANG et al., 2018). Besides the metabolic changes, the decrease on cytochrome C levels is associated with lower apoptosis (BURKE, 2017) as we observed in the most aggressive OSCC cell line (SCC25), and the recovery of mitochondria activity was able to revert this phenotype in OSCC (RUGGIERI et al., 2015). Interesting, the mechanism of action of cisplatin, an anticancer agent, involves an increase on cytochrome c (AZUMA et al., 2003), indicating that undifferentiated OSCC cells would be more resistant to chemotherapy due to lower mitochondrial activity.

Patients with oral cancer show an increase on DNA/protein oxidation and a reduction of antioxidants in saliva (BAHAR et al., 2007), indicating an unbalance in the redox homeostasis. We observed an increase on glutathione S-transferase (GST) levels in the center of the tumor, indicating an increase on the recovery of Glutathione. However, there is an increase on GST polymorphisms in cancer (MACLLWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006) which is associated to anticancer drug resistance (TOWNSEND; TEW, 2003). Conversely, other markers of antioxidant activity were decrease on OSCC (SUBAPRIYA et al., 2002; BANERJEE et al., 2017b). We detected a decrease on catalase, peroxiredoxin and protein S100. Catalase and peroxiredoxin are downregulated in several cancer types (GLORIEUX; CALDERON, 2017; NICOLUSSI



et al., 2017) resulting in increase on oxidative stress that might affect the migration of cancer cells (NIU et al., 2016). Also, it was demonstrated that high levels of S100 correlates with low aggressive profile of oral cancer cells (YANG et al., 2010; SAPKOTA et al., 2015), probably by promoting the differentiation.

Changes in the redox system make cells more susceptible to damages on DNA, proteins and lipids, contributing to impaired cell function. Several studies indicate an increase on oxidative stress in OSCC and potential malignant samples (KORDE et al., 2011; METGUD; BAI, 2014; BANERJEE, et al., 2017a). It is known that the 4-HNE molecules produced from the phospholipid oxidation (DALLEAU et al., 2013) are involved in the initiation and progression of cancer through the modulation of mitochondrial function and metabolic reprogramming (ZHONG; YIN, 2015). According to its concentration, 4-HNE might be toxic for cells (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2008) and this modulation probably occurs at each stage of carcinogenesis according to cellular needs to ensure its survival, proliferation and invasion. We demonstrated that highly differentiated cell line (Cal27) show an increase on oxidative stress parameters, which correlated with an increase on 4-HNE staining in biopsies of potential malignant lesions and the OSCC when compared to normal mucosa. In fact, it was demonstrated an increase of 4-HNE in colorectal cancer (SKRZYDLEWSKA et al., 2005) and esophageal squamous cell carcinoma (Zhang et al., 2017), which corroborates with our results. However, we observed a decrease on 4-HNE staining in cells of the connective tissue adjacent to dysplastic epithelium and at invasion regions of OSCC, indicating that the heterogeneity of cells at tumor microenvironment shows differential oxidative status. This data, associated to the finding that low differentiated/highly invasive OSCC (SCC25) shows a decrease on oxidative stress, suggest that there is a switch in the metabolic parameters during EMT, where cells with more epithelial-like profile show an increase on oxidative damage, while cells with mesenchymal-like phenotype has low oxidative damage. This is particular important for carcinogenesis, since moderate levels of oxidative might cause changes on proliferation, apoptosis and DNA mutation (CLERKIN et al., 2008; NISHIKAWA, 2008; SHIMI; GOLDMAN, 2014; QIAO et al., 2017; PAN et al., 2018;), which is observed in potential malignant lesions and at the center of the tumor, while decrease on oxidative parameters improves cell migration (NISHIKAWA, 2008;

LAMERS et al., 2011) with the potential to contribute with the metastatic behavior of cells at the invasion zone of OSCC.

During all stages of carcinogenesis, the cellular metabolism seems to be adequate to each moment of the process, using pathways that favor tumor initiation and progression until metastasis. These mechanisms seem to vary depending on the tissue that gives origin to the tumor and the microenvironment in which the tumor cells are inserted. We observed that OSCC cells show higher glycolytic metabolism, decrease in mitochondrial activity and in antioxidant activity, and an increase of byproducts generated by oxidative metabolism, which varies according to the differentiation level of tumor cells and might contribute to the carcinogenesis process. Advances in improving this information could help in the comprehension of some tumors resistance to treatments and thus contribute to the development of effective therapies against cancer.

## References

ALVES, A. M.; DIEL, L. F.; LAMERS, M. L., Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2017.

AZUMA, M. et al. Cisplatin induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells by the mitochondria-mediated but not the NF-kappaB-suppressed pathway. *Oral Oncol*, p. 282-289. 2003.

BABU, M. S. et al. Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2. *Plos One*, p. 1-15. 2018.

BAHAR, G. et al. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer*, p. 54-59. 2007.

BANERJEE, S. et al. Altered expression of mitochondrial antioxidants in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*, p. 439-446. 2017.

BANERJEE, S. et al. Microbial Signatures Associated with Oropharyngeal and Oral Squamous Cell Carcinomas. *Nature*, p. 1-20. 2017.

BOERSEMA, P. J. et al. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for proteomics. *Nature*, p. 484-93. 2009.

BURKE, P. J. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends Cancer*, p. 857-870. 2017.

CHAN, J. S. K. et al. Cancer-associated fibroblasts enact field cancerization by promoting extratumoral oxidative stress. *Nature*, p. 1-11. 2017.

CHATTARAGADA, M. S. et al. FAM49B, a novel regulator of mitochondrial function and integrity that suppresses tumor metastasis. *Oncogene*, p. 1-13. 2017.

CHEN, I-C. Role of SIRT1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis. *Molecular Cancer*, p. 2-19. 2014.

CLERKIN, J. S. et al. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett*, p. 30-36. 2008.

DALLEAU, S. et al. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation*, v. 20, p. 1615–1630. 2013.

DONG, T. et al. Tumor LDH-A expression and serum LDH status are two metabolic predictors for triple negative breast cancer brain metastasis. *Nature*, p. 1-8. 2017.

DOTTO, G. P; RUSTIGI, A. K. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. *Cell*, p. 622-637. 2016.

EALLES, K. L.; HOLLINSHEAD, K. E. R.; TENNANT, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Nature*, p. 1-8. 2016.

FENG, J. et al. Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene*, p. 5829-5839. 2017.

GAUDE, E.; FREZZA, C. Tissue-specific and convergent metabolic transformation of cancer correlates with metastatic potential and patient survival. *Nature*, p. 1-9. 2016.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*, p. 1095-1108. 2017.

GUGNONI, M. et al. Autophagy and epithelial–mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Nature*, p. 1-11. 2016.

GUIMARÃES, T. A. et al. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1 $\alpha$  under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, p. 1-15. 2018.

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2008. 851 p.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, v. 144, p. 646-674. 2011.

ISHIKAWA, S. et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Nature*, p. 1-7. 2016.

JI, Y. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal induces apoptosis by activating ERK1/2 signaling and depleting intracellular glutathione in intestinal epithelial cells. *Nature*, p. 1-13. 2016.

JIANG, J. et al. Redox regulation in tumor cell epithelial–mesenchymal transition: molecular basis and therapeutic strategy. *Nature*, p. 1-12. 2017.

KINUGASA, H. et al. Mitochondrial SOD2 regulates epithelial–mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*, p. 5229-5239. 2015.

KLAMER, A. A.; MACCOSS, M. J. Effects of Modified Digestion Schemes on the Identification of Proteins from Complex Mixtures. *J Proteome Res*, p. 695-700. 2006.

KORDE, S. D. et al. Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Oncology*, p. 382-389. 2011.

KWEIDER, N. et al. A Role for Nrf2 in Redox Signaling of the Invasive Extra villous Trophoblast in Severe Early Onset IUGR Associated with Preeclampsia. *Plos One*. 2012.

LAMERS, M. L. et al. High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. *Plos One*. 2011.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature*, p. 178-196. 2014.

LEBLEU, V. S. et al. *PGC-1alpha* mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*, p. 992-1003. 2014.

LIN, S. J.; GARENTE, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol*, p. 241-246. 2003.

MARCUCCI, F.; STASSI, G.; DE MARIA, R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug Discovery. *Nature*, p. 311-325. 2016.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E. et al. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature*, p. 1-21. 2016.

MCLLWAIN, C. C.; TOWNSET, D. M.; TEW, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*, p. 1639-1648. 2006.

METGUD, R.; BAI, S. Evaluation of salivary and serum lipid peroxidation, and glutathione in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*, p. 135-142. 2014.

NATH, A.; CHAN, C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Nature*, p. 1-13. 2016.

NICOLUSSI, A. et al. The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol*, p. 139-153. 2017.

NISHIKAWA, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett*, p. 53-59. 2008.

NIU, W. et al. Peroxiredoxin 1 promotes invasion and migration by regulating epithelial-to-mesenchymal transition during oral carcinogenesis. *Oncotarget*, p. 47042-47051. 2016.

OHASHI, T. et al. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. *Cancer Sci.* p. 1128-1134. 2017.

PAN, L. et al. Pathway-focused PCR array profiling of CAL-27 cell with over-expressed ZNF750. *Oncotarget*, p. 566-575. 2017.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Nature*, p. 1-12. 2016.

PATEL, S. G.; SHAH, J. P. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *Cancer J Clin*, p. 242-258. 2005.

QIAO, B. et al. Induction of oxidative stress and cell apoptosis by selenium: the cure against oral carcinoma. *Oncotarget*, p. 113614-113621. 2017.

RAMOS, G. O. et al. Fibronectin Modulates Cell Adhesion and Signaling to Promote Single Cell Migration of Highly Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, p. 1-18. 2016.

RUGGIERI, V. et al. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment. *Oncotarget*, p. 1217-1230. 2015.

SALUJA, T. S. et al. Equating salivary lactate dehydrogenase (LDH) with LDH-5 expression in patients with oral squamous cell carcinoma: An insight into metabolic reprogramming of cancer cell as a predictor of aggressive phenotype. *Tumor Biol*, p. 5609-5620. 2016.

SANTIDRIAN, A. F. et al. Mitochondrial complex I activity and  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest*, p. 1068-1081. 2013.

SAPKOTA, D. et al. S100A16 promotes differentiation and contributes to a less aggressive tumor phenotype in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, p. 1-14. 2015.

SAUNDERS, L. R.; VERDIN, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, p. 5489-5504. 2007.

- SHIMI, T.; GOLDMAN, R. D. Nuclear Lamins and Oxidative Stress in Cell Proliferation and Longevity. *Adv Exp Med Biol*, p. 415-430. 2014.
- SKRZYDLEWSKA, E. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Gastroenterol*, p. 403-406. 2005.
- SUBAPRIYA, R. et al. Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. *Clin Biochem*, p. 489-493. 2002.
- SULLIVAN, L. B.; GUI, D. Y.; HEIDEN, M. G. V. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumor biology and cancer therapy. *Nature*, p.680-693. 2016.
- SUN, S. et al. Loss of the novel mitochondrial protein FAM210B promotes metastasis via PDK4-dependent metabolic reprogramming. *Cell Death and Disease*, p. 1-11. 2017.
- TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer. *Journal of Oncology*, p. 1-10. 2011.
- TOWNSET, D. M.; TEW, K. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, p. 7369-7375. 2003.
- VYAS, S.; ZAGANJOR, E., HAIGIS, M. C. Mitochondria and Cancer. *Cell*, p. 556-566. 2016.
- WALI, G. et al. Mechanism of impaired microtubule-dependent peroxisome trafficking and oxidative stress in SPAST-mutated cells from patients with Hereditary Spastic Paraplegia. *Nature*, p. 1-14. 2016.
- WANG, H. et al. Targeted production of reactive oxygen species in mitochondria to overcome cancer drug resistance. *Nat Commun*. 2018.
- WANG, Y. et al. Overexpression of pyruvate kinase M2 associates with aggressive clinicopathological features and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*, p. 839-845. 2015.
- WESSEL, D.; FLUGGE U. I. D. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, p. 138-143. 1984.

XU, Q. et al. Long non-coding RNA regulation of epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis. *Nature*, p. 1- 10. 2016.

YANG, X. et al. Decreased expression of S100A6 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, p. 479-488. 2010.

YANG, Y-C et al. Nuclear translocation of PKM2/AMPK complex sustains cancer stem cell populations under glucose restriction stress. *Cancer Letters*. 2018.

ZHANG, M. et al. Release of Cytochrome C from Bax Pores at the Mitochondrial Membrane. *Nature*, p. 1-13. 2017.

ZHANG, Y. et al. Expression of 4-hydroxynonenal in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, p. 35-40. 2017.



## **6 CONCLUSÃO**

O CEC apresenta maior metabolismo glicolítico e diminuição das atividades mitocondriais e antioxidantes.

As células mais indiferenciadas (SCC25) possuem menores massa e potencial de membrana mitocondrial, geram menores níveis de espécies reativas, os quais estão correlacionados com maior viabilidade celular.

Regiões de epitélio nas lesões displásicas e de CEC apresentam maiores níveis de dano oxidativo quando comparados ao epitélio de mucosa oral normal, enquanto regiões de tecido conjuntivo de lesões displásicas e CEC apresentam diminuição nos níveis de dano oxidativo quando comparados ao tecido conjuntivo de mucosa oral normal.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa **“Estudo do perfil oxidativo de leucoplasia e carcinoma espinocelular oral”** realizado pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia-UFRGS. Este trabalho tem como objetivo verificar qual o papel de algumas substâncias na evolução do câncer de boca. Para tal, lesões como a que você possui, serão submetidas a exames laboratoriais – análises bioquímicas.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque já foi indicado pelo seu médico a realização de cirurgia para remoção (retirada) da lesão. O material retirado na cirurgia será utilizado assistencialmente com a finalidade de fazer exames que confirmam o diagnóstico e avaliar a necessidade de tratamento. Caso sobre do material retirado que será analisado pelo médico, o restante é usualmente descartado. Nós gostaríamos de usar o restante do material que seria descartado para as análises deste estudo. Ressaltamos que não será coletado material a mais na cirurgia, e também não serão necessários novos contatos com os pesquisadores.

A sua participação no estudo não trará benefícios diretamente para você, ou seja, os exames que serão realizados pelo estudo não interferem no seu tratamento, mas contribuirá para que possamos entender melhor como funciona a doença que você possui, aumentando o conhecimento sobre essa doença – como preveni-la e tratá-la. Além disso, também poderá ajudar na realização de estudos no futuro. Não são conhecidos riscos sobre sua participação no estudo.

Caso você concorde em participar deste estudo, você responderá um questionário que será aplicado antes da cirurgia. O questionário contém perguntas sobre seus dados pessoais, história médica, história odontológica e nível socioeconômico. Também será realizado um exame bucal geral. O tempo total da aplicação do questionário e do exame durará em torno de 30 minutos que deve ocorrer antes da preparação prevista para a sua cirurgia.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo, e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações que você fornecer serão mantidas em sigilo. Os dados deste estudo serão armazenados em bases de dados codificadas e apenas os pesquisadores

terão acesso aos seus dados de identificação. Os resultados serão divulgados de maneira coletiva, não vinculando seu nome aos mesmos.

Se você concordar, o pedaço que for retirado da sua lesão será utilizado neste estudo e, o pedaço restante, se houver, será guardado. O material que não for utilizado nesta pesquisa, só poderá ser usado em outra se esse novo estudo for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e você autorizar a utilização através de novo termo de consentimento livre e esclarecido. Você deve assinalar se autoriza ou não o armazenamento para outros possíveis estudos, conforme explicado acima:

- concorda com o armazenamento do material
- não concorda com o armazenamento do material

A participação neste projeto de pesquisa é voluntária. Independentemente de sua escolha, seu tratamento não será afetado e você tem o direito de se retirar deste estudo a qualquer momento, bastando avisar ao pesquisador.

Qualquer dúvida sobre a pesquisa pode ser esclarecida diretamente com o pesquisador responsável Dr. Manoel Sant'Ana Filho, no Serviço de Patologia Bucal, sala 503 da Faculdade de Odontologia da UFRGS, telefone 51-3308 5023 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no 2º andar na sala 2227, telefone 51-3359-7640 de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

### **Consentimento**

Eu confirmo que li o termo acima e que recebi as informações necessárias sobre o estudo. Aceito participar deste estudo de maneira voluntária e sei que posso retirar meu nome a qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo. Declaro que recebi cópia to termo.

Nome do participante \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Nome do responsável \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

## ANEXO A – Carta de Aprovação do Projeto HCPA 14-0689



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 140689

**Data da Versão do Projeto:** 15/12/2014

**Pesquisadores:**

MANOEL SANT ANA FILHO

ALESSANDRO MENNA ALVES

GRASIELI DE OLIVEIRA RAMOS

MARCELO LAZZARON LAMERS

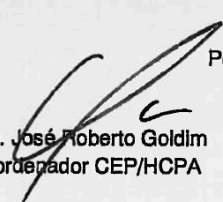
FRANCISCA AURINA GONCALVES

**Título:** Estudo do perfil oxidativo de leucoplasia e carcinoma espinocelular oral

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 20 de abril de 2015.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA