

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Sergio Edgar Campos de Mattos

Avaliação do ciclo das pentoses e da via glicolítica no comportamento de células de carcinoma espinocelular oral

Porto Alegre

2024

Sergio Edgar Campos de Mattos

Avaliação do ciclo das pentoses e da via glicolítica no comportamento de células de carcinoma espinocelular oral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia.

Orientador: Prof.Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre
2024

AGRADECIMENTOS

Antes começar os agradecimentos, tenho que voltar ao passado na década de 1990, onde um menino preto, jovem sem uma perspectiva de vida e de futuro, somente fé em DEUS e amor de seus pais e familiares. Trabalhava vendendo roupas, frutas pela cidade de Cruz Alta, fazendo alguns bicos como auxiliar de sevente de pedreiro, mas não vim falar de mais um jovem sofrido como é maioria dos jovens pobres e periféricos desse país, mas sim de uma conquista que é muito importante para nós. Acredite em sonhos e tenha fé em DEUS, que existem pessoas muito boas e maravilhosas nesse mundo.

Essa mensagem inicial é um incentivo para todos jovens pretos e moradores de periferias de todo Brasil. Dedico esse agradecimento a todas as pessoas que de certa forma contribuíram para essa conquista contando um pouco da minha trajetória. Não foi fácil chegar até aqui, pois vim de família humilde e tinha muitos sonhos desde pequeno, como ser jogador de futebol, vôlei ou basquete, porém o tempo e a vida financeira acabaram com essas expectativas. Tive que enfrentar as dificuldades vendendo figo, laranja azeda, doces em compota que a família produzia, e fazendo pequenos trabalhos para ajudar a renda familiar. Um dia minha amada mãe me chamou para conversar e eu a vi chorando, pediu para que realizasse o sonho dela, conquistar uma graduação ou ser doutor, nunca desistir dos meus sonhos porque não poderia ajudar nos estudos naquele momento difícil. Então orei pela primeira vez a Deus. Daquele dia em diante tudo começou a mudar na minha vida. Consegui um trabalho na Universidade de Cruz Alta – RS como ajudante de pedreiro e ingressei no curso de Biologia, mudei de setores na UNICRUZ até parar como técnico em laboratório e conseguir terminar o curso.

Nessa etapa já tinha perdido minha mãe e meu pai aos quais queria muito ter dado essa alegria. Mas Deus queria algo maior para mim, tinha um objetivo de fazer Mestrado e Doutorado continuar nos estudos em uma das melhores universidades do país, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tive decepções e vitórias nessa caminhada que tenho que agradecer a Deus Todo Poderoso por essas experiencias porque forjaram o meu caráter, minha mãe Maria de Lourdes Campos de Mattos *in memoriam*, meu Pai Davi de Mattos *in memoriam*, que não estão mais aqui para ver minhas realizações. Minhas duas amadas mãezinhas de coração que me adotaram como filho, Sonia Mattos e Professora Carmem Iraci Eisman. A minha Esposa Giane Lucia Rodrigues dos Santos, te amo muito, sem você não sou nada, filhos Agnes Maria Mattos e João Davi Rodrigues de Mattos, grande presente em minha vida. Aos meus queridos irmãos, familiares e amigos. E em especial ao meu grupo de pesquisa Lamoc constituído por essas pessoas maravilhosas como: Franciele, Francisca, Luiza Brand, Gabrieli, Marcos, Luize, Luiza, Grasieli, Silvia, Natalia Shneider, Natália Koerch, Alessandro, Bibiane, Paloma, Angela, Marjoe, Maurício e aos novos integrantes Pamela, Bernardo, Leticia, Lisiane, Fabiana, Igor, Mariana e Petra, e meus colegas da Pós Isabel Gabriel e Joedson Alves de Souza (*in memorian*) meu muito obrigado pela parceria, ao Programa de Pós Graduação em Odontologia, pela oportunidade ímpar e também ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia) e a todos professores e

funcionários que me ajudaram de alguma forma a chegar nesse momento especial.

Agradeço especialmente aos professores que vou levar na memória como verdadeiros mestres em transmitir o conhecimento e também como amigos que ajudaram em prosseguir em frente: Alexandre Luz de Castro, Alex Sander da Rosa Araujo, Adriane Bello-Klein, Eloisa da Silveira Loss, Maria Flavia Marques Ribeiro, Roselis Silveira Martins da Silva, NadjaSchroder, Guilherme Baldo, Wania Aparecida Partata, a Ilma Simoni Brum da Silva, o técnico administrativo Diego Coelho da Motta e a minha Escola Estadual de Educação Profissional em Saúde no Hospital de Clinicas de Porto Alegre, onde leciono como professor, que sempre incentivou minhas conquistas.

Dedico uma homenagem mais que especial a essas cinco pessoas maravilhosas que nos momentos mais difíceis do caminho foram minha luz, Carlos, amigo, não vou esquecer pela amizade e pelos conselhos de seguir em frente, grande "Carlitos Tevez". Leonardo da Silva Bittencourt, foi uma luz de conhecimento sobre metabolismo, um ótimo amigo e conselheiro, meu muito obrigado. Leonardo Diel (amigo Le-leo) você foi um irmão que pedi a Deus, que nossa amizade e compreensão possa durar a vida toda, obrigado por tudo "Mano Veio". Lisiane de Bernardi você foi o Norte, a direção do meu caminho na busca do conhecimento, aprendi muito com você, não esquecerei tudo o que fez por mim, que Deus ilumine sempre você e sua família linda. Marcelo LazzaronLamers, obrigado pela oportunidade única, através do seu grupo realizou um sonho de um auxiliar de pedreiro a concluir Mestrado e Doutorado, quando eu mesmo não acreditava em mim, senhor sempre acreditou. Peço que senhor CONTINUE DANDO OPORTUNIDADES a vários Sergios, Joãos, Pedros, Marias e Anas. Meu muito obrigado de coração por essa mudança em minha vida, de auxiliar de servente de pedreiro a Doutor em uma das melhores Universidade Publicas desse País.

RESUMO

Introdução: O câncer de boca pode ter origem a partir de alterações em nível molecular nas células da mucosa que levam ao surgimento de lesões potencialmente malignas. As células tumorais utilizam vários mecanismos para invadir os tecidos adjacentes e essas invasões dependem muito do consumo de energia. Sob condições de privação de energia, as células cancerígenas adaptam tanto a sua atividade citoesquelética, como o seu metabolismo para poupar energia e garantir a migração. A compreensão dessa adaptação pode auxiliar na identificação de pontos de intervenção que possam diminuir a disseminação e metástase de células tumorais, e que podem contribuir para o tratamento no processo de carcinogênese oral.

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento celular através da modulação da via glicolítica e da via das pentoses através da inibição da piruvato desidrogenase quinase e da inibição da glicose-6-fosfato desidrogenase (via das pentoses). As linhagens celulares utilizadas nos experimentos foram CAL27 e SCC9 (carcinoma espinocelular oral) e HACAT (queratinócitos).

Métodos: Foram utilizados dois inibidores, dicloroacetato de sódio (DCA) e 6-aminonicotinamida (6-AN) em concentrações já estabelecidas, por períodos de 24 e 48 horas. A avaliação do efeito dos inibidores na saúde celular foi realizada através do método colorimétrico da sulforodamina B (SRB), onde foram avaliados os efeitos citotóxicos desses compostos nos respectivos períodos de incubação. Após, foi realizado o ensaio de migração celular através da técnica de time-lapse, para avaliar o efeito dos inibidores em parâmetros como velocidade de migração e a direcionalidade das células. Para avaliar o efeito dos inibidores em modelos que mimetizem um organismo, foi utilizada a cultura organotípica. Os parâmetros de velocidade, direcionalidade, área e perímetro foram obtidos utilizando o software image J.

Resultados: O 6-AN afeta a proliferação celular das linhagens tumorais e queratinócitos normais partir de 24h. Na migração, o inibidor teve impacto significativo na velocidade e direcionalidade de migração da linhagem HACAT. Nos resultados envolvendo células displásicas Cal27 apresentou resultados significativos na velocidade e direcionalidade nos tempos avaliados. A linhagem SCC9 apresenta diminuição na velocidade e direcionalidade. Nos resultados de adesão célula-célula. O inibidor 6-AN provocou diminuição significativa somente

na área nas células displásicas (CAL27) e SCC9, envolvendo os resultados do DCA na proliferação, sua ação afeta as linhagens celulares HACAT, CAL27 e SSC9 a partir de 24 horas. Na análise da migração, o DCA diminuiu significativamente a direcionalidade nas células HACAT no tempo 24 horas e 48 horas. Na CAL27 no tempo 48 e 72 horas tanto na velocidade como direcionalidade. Na linhagem SSC9 foi no tempo de 48 e 72 horas na velocidade e na direcionalidade no tempo 24, 48 e 72 horas. Em relação a velocidade DCA obteve efeito na linhagem SSC9 no tempo de 48 horas. O DCA não provocou impacto significativo na adesão célula-célula nas linhagens Hacat, mas na CAL27 e SSC9, possui impacto significativo tanto na área como no perímetro.

Conclusão

Pela primeira vez, este estudo apresentou evidências dos efeitos da modulação de vias metabólicas centrais, utilizando estes inibidores, no comportamento das células do carcinoma espinocelular oral (CEC ORAL). Obtivemos resultados significativos ao analisar os efeitos dos medicamentos 6AN e DCA em experimentos específicos.

Abstract

Introduction: Mouth cancer may originate from changes at the molecular level in mucosal cells that lead to the emergence of potentially malignant lesions. Tumor cells use several mechanisms to invade adjacent tissues and these invasions depend largely on energy consumption. Under conditions of energy deprivation, cancer cells adapt both their cytoskeletal activity and their metabolism to save energy and ensure migration. Understanding this adaptation can help identify intervention points that can reduce the spread and metastasis of tumor cells, and that can contribute to treatment in the process of oral carcinogenesis.

Objective: The objective of this work was to evaluate cellular behavior through modulation of the glycolytic pathway and the pentose pathway through the inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase and the inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase (pentose pathway). The cell lines used in the experiments were CAL27 and SCC9, from keratinocytes (HACAT).

Methods: Two inhibitors were used, sodium dichloroacetate (DCA) and 6-aminonicotinamide (6-AN) at already established concentrations, for periods of 24 and 48 hours. The evaluation of the effect of inhibitors on cellular health was carried out using the sulforhodamine B (SRB) colorimetric method, where the cytotoxic effects of the compounds were evaluated in the respective incubation periods. Afterwards, the cell migration assay was carried out using the time-lapse technique, to evaluate the effect of the inhibitors on parameters such as migration speed and cell directionality. To evaluate the effect of inhibitors in models that mimic an organism, organotypic culture was used. The speed, directionality, area and perimeter parameters were obtained using the image J software.

Results: 6-AN affects cell proliferation of tumor lines and normal keratinocytes after 24 hours. In migration, the inhibitor had a significant impact on the migration speed of the HACAT strain. In the results involving dysplastic Cal27 cells, there were no significant differences in speed and directionality at any of the concentrations and times evaluated. The SCC9 lineage shows decreased speed. In cell-cell adhesion results. The 6-AN inhibitor caused a significant decrease in

dysplastic cells (CAL27). At SCC9, 6-AN impacted the area within 72 hours. Involving DCA results in proliferation, its action affects the HACAT, CAL27 and SSC9 cell lines within 48 hours. In the migration analysis, DCA significantly decreased directionality in HACAT cells at 24 hours and 48 hours. At CAL27 in time 72 hours. In the SSC9 lineage it took 48 hours. Regarding speed, DCA had an effect on the SSC9 line within 48 hours. DCA did not cause a significant impact on cell-cell adhesion in the Hacat and SSC9 lines, but it has a significant impact on the CAL27 line in the area at 0 hour.

Conclusion

For the first time, this study presented evidence of the effects of modulating central metabolic pathways, using these inhibitors, on the behavior of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. We obtained significant results when analyzing the effects of 6AN and DCA drugs in specific experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: histologia de lesões orais

Figura 2: progressão neoplásica

Figura 3: transição epitélio mesênquima

Figura 4: transição epitelial para mesenquimal e plasticidade

Figura 5: metabolismo do câncer

Figura 6: equilíbrio redox

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-AN: 6 aminonicotinamida

Akt/PKB: Serina/treonina quinase

AKT: Proteína quinase B

AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

ATP: Trifosfato de adenosina

Bax: Proteína associada a BCL-2

Bcl-2: Proteína anti-apoptótica da família da B

BH3: Proteína derivada BCL-2

B-Raf: Proto-oncogene B-Raf, serina/treonina quinase

CD8: Linfócito citotóxico

CEC: Oral Carcinoma espinocelular oral

DCA: Dicloacetato de Sódio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPMs: Doenças potencialmente malignas

ECM: Matriz extracelular

EROs: Espécies reativas de Oxigênio

F6P: Frutose 6 fosfato

FGF1: Fator de crescimento de fibroblastos 1

G6P: Glicose-6-fosfato

G6PD: Glicose-6-fosfato-desidrogenase

GLUTs: Transportador de glicose

GSH: Glutationa reduzida

GSSG: Glutationa oxidada

GTPase: Proteína 1 ativadora de RacGTPase

HIF1 α : Fator de transcrição induzido alfa 1

HIF2 α : Fator de transcrição induzido alfa 2

HPV: Papiloma Vírus Humano

IAR: Agencia Internacional de Pesquisa Contra Câncer

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MCT: Transportadores de monocarboxilatos

mTor: alvo mecanístico da rapamicina quinase Proteína alvo da Rapamicina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NK: Células natural killer

P53: Proteína pró-apoptótica p53

PDH: Piruvato desidrogenase

PDk: Piruvato desidrogenase Kinase

PFK-1: Fosfofrutoquinase-1

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PKM2: Piruvato quinase M2

Slug: Proteína transcricional ligado a zinco

Snail: Proteína Transcricional 1 da família caracol

SOD: Enzima superóxido dismutase

SRB: Sulforodamina B

TAL: Enzima transaldose

TEM: Transição Epitélio-Mesênquima

TGF- β : O fator de crescimento transformador beta

TKTL: Enzima transcetolase

TP53: Gene que codifica a P53

TSP-1: Trombospondina-1

TWIST: fator de transcrição bHLH da família twist 1 Fator de transcrição hélice

VEGF-A: Fator de crescimento do endotélio vascular A

VEGFR: Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

Sumário

Introdução	14
1.1 Câncer	15
1.2 Desordens potencialmente malignas	15
1.3 Etiopatogenia	16
1.4 Incidência e prevalência do câncer oral	16
1.5 Histopatologia	17
1.6 Câncer Hallmarks	18
1.6.1 Célula tumoral e sua imortalidade	19
1.6.2 Resistência a apoptose	20
1.6.3 Surgimento de metástase	21
1.6.4 Induzido angiogênese	21
1.6.5 Ativando invasão	22
1.6.6 Metabolismo energético tumoral	23
1.6.7 A Transição Epitelial Mesenquimal (TEM) Regula a Invasão e Metástase	24
1.6.8 Características candidatas desenvolvimento do Câncer	25
1.6.9 Transição epitélio mesênquima e plasticidade	26
2. Células tumorais e via glicolítica	29
3. Relação metabolismo e plasticidade	33
3.1 Equilíbrio redox através da via das pentoses fosfato (PPP)	33
3.2 Como a célula tumoral utiliza NADPH ao seu favor contra espécies reativas de oxigênio (EROS)	34
4. Hipótese	37
5. Objetivos	38
5.1 Objetivos Gerais	38
5.2 Objetivos Específicos	38
6. Materiais e Métodos	39
6.1 Aspectos éticos	39
6.2 Delimitação do Estudo	39
6.3 Reagentes e cultura celular	39
6.3.1 Linhagens celulares	39
6.3.2 Reagentes que foram utilizados	39
6.3.2 Cálculo da Amostra	39
6.4 Ensaio de proliferação	40
6.5 Ensaio por Esferoides	41
6.6 Ensaio por migração	41
6.7 Análise por estatística	41
7. Resultados	42
7.1 Resultados apresentados no artigo1	42

Resultados não foram publicados	43
7.2 Resultados apresentados no artigo 2.....	61
Resultados não foram publicados	61
8. Discussão integrada	64
Anexo I	85
Anexo II.....	86
9.Conclusão	87
10. Referências	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular desordenado sendo que tais células podem invadir os tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos através da circulação (metástase) (1). O câncer de boca engloba um conjunto de neoplasias que acometem a cavidade bucal em suas mais variadas etiologias e aspectos histopatológicos. É considerado um problema de saúde pública em diversos países, devido ao grande número de casos e altas taxas de morte (2). Em todo o mundo, o câncer de boca é a 15ª causa de morte e a 16ª neoplasia maligna mais comum. A incidência de câncer bucal é de 4 casos em 100.000 casos e varia dependendo do país, raça, idade, sexo e situações socioeconômicas.

Os fatores de risco para câncer bucal incluem fatores genéticos e ambientais e condições físicas. As discrepâncias por país podem dever-se à educação preventiva e à cultura (3). Aproximadamente 657.000 novos casos e 330.000 mortes subsequentes devido ao câncer bucal foram relatados em todo o mundo a cada ano. Beber excessivamente e fumar são comportamentos relacionados à saúde que podem levar ao aumento do risco de ocorrência de câncer bucal. Embora o estatuto socioeconômico tenha sido enfatizado e associado ao aumento da incidência do câncer oral, também foi demonstrado que as áreas altamente urbanizadas também apresentam maior risco a esta doença (4). Em torno de 95% dos casos de câncer de boca são do tipo Carcinoma Espinocelular Oral (CEC Oral), sendo sítios mais comuns os lábios, a borda da língua e o assoalho da língua. O tabaco e o álcool, associados à predisposição genética, têm sido relatados na literatura como os principais fatores de riscos para o CEC oral (5).

O desenvolvimento da carcinogênese oral é um processo multifocal altamente complexo que ocorre quando o epitélio escamoso é afetado por várias alterações genéticas. A carcinogênese oral começa com a transformação de um número limitado de queratinócitos normais. Essa transformação pode ser expressa por meio de alterações citogenéticas e processos epigenéticos que

modificam a progressão do ciclo celular, mecanismos de reparo de DNA, diferenciação celular e apoptose, e podem ser causados por mutação aleatória, pela exposição a uma variedade de fatores biológicos, carcinógenos ou erros em o processo de reparo do DNA (6). O uso de várias técnicas de biologia molecular para diagnosticar lesões pré-cancerosas orais pode melhorar significativamente a detecção precoce de alterações que são invisíveis ao microscópio. Isso identificaria pacientes com alto risco de desenvolver câncer oral (7).

1.2 Desordens potencialmente malignas

CEC oral pode ser procedido por lesões denominadas desordens potencialmente malignas (DPMs). As DPMs, se não tratadas, podem levar ao câncer. O termo foi descoberto em 1875 pelo médico romeno Victor Babeş. DPMs são relativamente comuns, ocorrendo em cerca de 2,5% da população geral e são um alvo importante para a prevenção do câncer oral (8).

Clinicamente, as DPMs se classificam em leucoplasia que são consideradas como uma macha branca, não removível por raspagem e que não pode ser classificada como qualquer outra doença ou em eritroplasia, uma placa vermelha que não pode ser diagnosticada clínica ou patologicamente como qualquer outra condição (9).

Histologicamente, as DPMs são caracterizadas inicialmente por aumento no espessamento da camada de queratina (hiperceratose) e da atividade proliferativa da camada basal do epitélio (hiperplasia), por acúmulo de mutações, e podem ser observadas como modificações no tamanho e forma, além de um grande número de alterações mitóticas (displasia) (10). A presença de displasia epitelial é considerada o fator mais importante na determinação do risco de transformação em lesões cancerígenas (11).

1.3 Etiopatogenia

A etiopatogenia do CEC oral tem dois fatores importantes para desenvolvimento, que são fatores extrínsecos e intrínsecos. Os extrínsecos estão envolvidos com estilo de vida, incluindo o consumo de tabaco que continua a prevalecer como o risco de câncer mais importante, pois sozinho é responsável

por milhões de mortes por câncer anualmente. A relação entre tabagismo e câncer oral foi estabelecida firmemente por estudos epidemiológicos. Os carcinógenos mais importantes na fumaça do tabaco são os hidrocarbonetos aromáticos (12). O álcool também é considerado como fator extrínseco, apesar da associação definitiva entre consumo crônico dessa substância e CEC oral, o papel exato do álcool na patogênese da doença não é totalmente compreendido (13).

Em 2007, a Agência Internacional de Pesquisa contra o Câncer (IARC) reconheceu o papiloma vírus humano (HPV), especialmente o HPV16, além do tabagismo e do álcool, como fator de risco para o carcinoma espinocelular oral. A principal explicação foi atribuída a mudanças nos hábitos sexuais e uma vida sexual precoce (14). Os fatores intrínsecos são processos multifatoriais altamente complexos que ocorrem quando as células epiteliais são afetadas por várias alterações genéticas, incluindo distúrbios em proteínas (15). A maioria dos CEC oral se desenvolvem no epitélio pré-canceroso que contém queratinócitos em diferentes estágios de transformação. A persistência deste cenário é a razão para a alta taxa de ocorrência de novos tumores (16).

1.4 Incidência e prevalência do câncer oral

Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) relata que o CEC oral é responsável por mais de 90% de todos cânceres bucais e está associado a uma baixa taxa de sobrevivência, em torno de 5 anos, e com mais de 300.000 novos casos relatados anualmente.

No mundo a mortalidade anual é de cerca de 145.000 mortes (17). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), avaliando o surgimento de novos casos envolvendo câncer oral no Brasil do triênio de 2020 a 2023, o câncer de boca é o quinto mais frequente em indivíduos do sexo masculino e o 11º entre as mulheres, totalizando 15.200 novos casos no ano de 2022. No Rio Grande do Sul, a incidência de câncer de boca é maior do que a média do Brasil, tendo a estimativa de 580 novos casos no RS para 2023.

Em torno de 95% do câncer de boca são do tipo Carcinoma Espinocelular Oral (CEC oral), sendo sítios mais comuns os lábios, a borda da língua e o assoalho da língua.

1.5 Histopatologia

Histologicamente o CEC oral pode iniciar através de uma lesão displásica, podendo evoluir ou não. A não evolução está se referindo a um tipo de displasia chamada de carcinoma *in situ*, que é um aumento da espessura no epitélio (18). O padrão mais frequente na evolução da CEC oral inicia-se como uma lesão *in situ*, algumas vezes com áreas circundantes de atipia epitelial (lesão pré-cancerosa ou cancerosa). Com a progressão deste tipo de carcinoma, a membrana basal se rompe e com isso o tumor invade o tecido conjuntivo subjacente (19). A presença de displasia epitelial é geralmente aceita como um dos mais importantes preditores de malignidade e desenvolvimento em lesões pré-malignas (20). A leucoplasia é caracterizada por uma camada espessa de queratina do epitélio de superfície (hiperceratose), com aumento ou não da camada espinhosa (acantose). Certas leucoplasias demonstram hiperkeratose de superfície e uma atrofia ou engrossamento do epitélio subjacente. Números variáveis de células de inflamação crônica são observados no tecido conjuntivo subjacente. Em relação à histopatologia da eritroplasia, 90% dessas lesões constituem displasias epiteliais severas, carcinoma *in situ* ou carcinoma de células escamosas superficialmente invasivo. O epitélio mostra ausência de produção de ceratina e as vezes é atrófico, porém hiperplásico. O tecido conjuntivo subjacente apresenta processo inflamatório crônico (21). Na figura abaixo colocamos algumas micrografias para melhorar o entendimento sobre assunto.

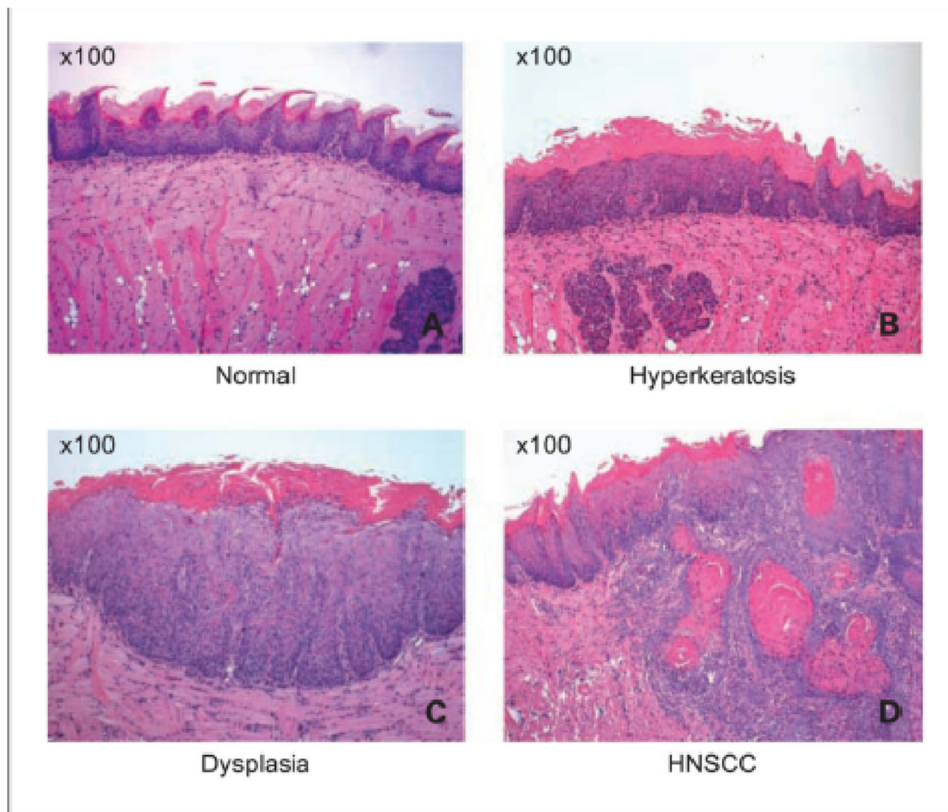


Figura 1: Histopatologia de lesões orais. As fotomicrografias demonstram a progressão histopatológica. A) histologicamente normal (controle), B) hiperkeratose, C) displasia epitelial e D) carcinoma de células escamosas (22).

1.6 Câncer Hallmarks

Após um quarto de século de rápidos avanços, a pesquisa sobre o câncer gerou um corpo rico e complexo de conhecimentos, revelando que o câncer é uma doença que envolve mudanças dinâmicas no genoma. Nos últimos anos, o sequenciamento de nova geração trouxe um vigor adicional ao campo e tornou a evolução do tumor um tópico central na pesquisa do câncer (23). Em sua análise, os pesquisadores Hanahan e Weinberg descreveram conceitos sobre o desenvolvimento do câncer e identificaram várias características intrínsecas das células neoplásicas: imortalidade, instabilidade genômica, resistência à morte celular, metabolismo alterado e invasão/metástase. Eles incluíram diversos aspectos críticos de como as células cancerosas interagem com o estroma: angiogênese sustentada, promoção da inflamação, evasão imunológica, resistência à inibição do crescimento e autonomia relativa. Juntas, essas marcas

e características habilitadoras definem os elementos críticos para a transformação celular em uma célula neoplásica (24).

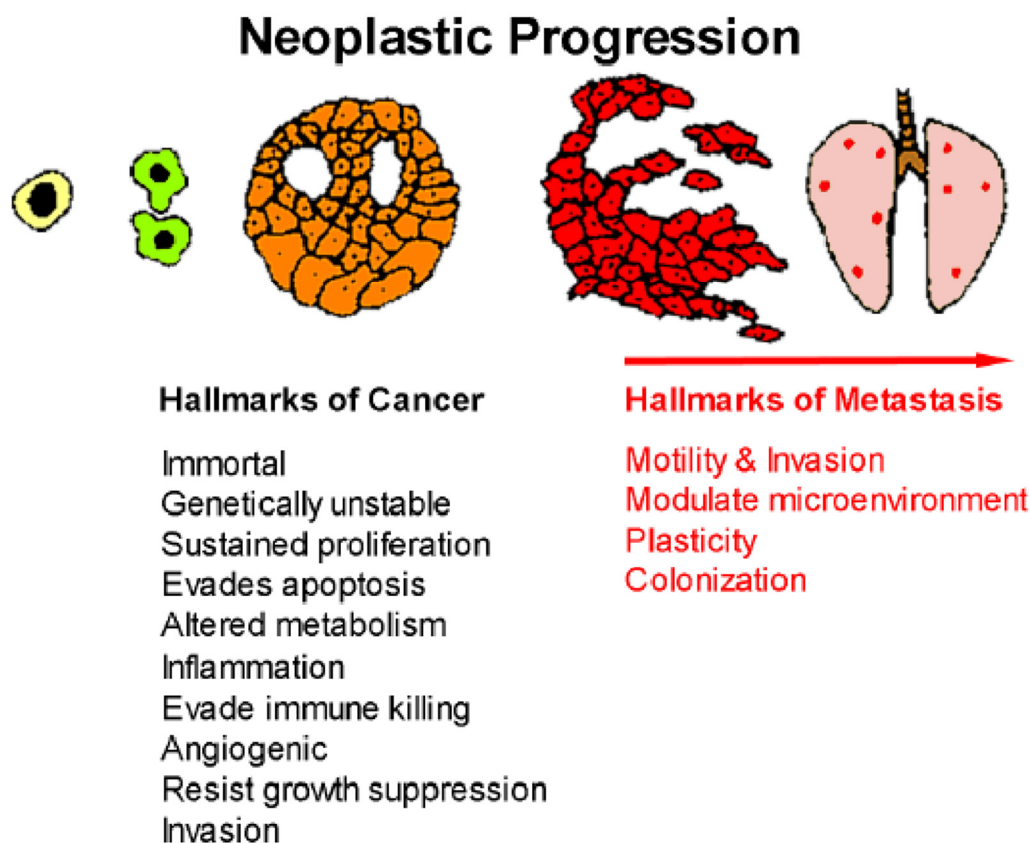


Figura 2. Etapas da progressão tumoral

A progressão neoplásica é descrita à medida que células normais se transformam. As células transformadas podem adquirir características adicionais para se tornarem neoplásicas. Entretanto, nem todas células normais adquirem características neoplásicas sequencialmente. A geração de um câncer é caracterizada por 10 características necessárias para que as células neoplásicas invasivas estabeleçam seu desenvolvimento (24). Nos parágrafos abaixo serão descritas algumas características importantes para desenvolvimento da célula tumoral segundo Hanahan e Weinberg.

1.6.1 Célula tumoral e sua imortalidade

O desenvolvimento do câncer se origina como consequência do acúmulo de alterações genéticas em uma única célula aleatória. Diferentes clones de células surgem dentro de um tumor e aumentam a proliferação celular. A natureza de tais mutações pode ser de ganho de função em oncogênese ou

mutações de perda de função em genes supressores de tumor. Tumores sólidos podem ser mais propensos a este processo em várias etapas. Células tumorais são expostas a agentes que danificam o DNA por mais tempo, permitindo o acúmulo de múltiplas alterações nos níveis genético e epigenético (25). Em análises utilizando sequenciamento de DNA de alto rendimento de genomas de células cancerosas, encontraram-se mutações somáticas em certos tumores humanos que predizem a ativação constitutiva de circuitos de sinalização, geralmente desencadeados por receptores de fator de crescimento ativado (26). Hoje sabemos que 40% dos tumores contêm ativadores que afetam a estrutura da proteína B-Raf (proteína que desempenha papel na regulação da via de sinalização da MAP quinase/ERK, vias responsáveis pela divisão, diferenciação e secreção). Essa proteína é causadora mais frequente de tumores conhecido como melanoma (27). Vários estudos detectaram alterações em genes que afetam vias de sinalização como a via da PI3-quinase (enzimas que estão envolvidas nas funções celulares como: crescimento celular, proliferação, diferenciação e mobilidade), e na proteína Akt/PKB (a qual desempenha um papel importante em vários processos celulares, entre eles: metabolismo da glicose, apoptose, proliferação celular, transição migração celular) (28).

1.6.2 Resistência a apoptose

O conceito de que a morte celular programada por apoptose serve como uma barreira natural para o desenvolvimento do câncer foi estabelecido por estudos funcionais conduzidos nas últimas décadas, onde foi revelado que a apoptose é desencadeada em resposta a um ambiente hostil que as células cancerosas experimentam durante seu desenvolvimento ou através de terapias anticâncer (29).

As proteínas Bcl-2, junto com outras proteínas a ela relacionada (Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1, A1), são inibidores da apoptose, agindo em grande parte pela ligação e, assim, suprimindo duas proteínas ativadoras pró-apoptóticas Bax e Bak. Estas proteínas ficam localizadas na membrana externa da mitocôndria. Quando não estão inibidas pelas proteínas anti-apoptóticas, a Bax e a Bak perturbam a integridade de proteínas da membrana mitocondrial externa

causando a liberação de proteínas sinalizadoras pró-apoptóticas, das quais mais importante é o citocromo c. Quando este componente é ativado, estimula uma cascata de caspases que atuam por meio de suas atividades proteolíticas para induzir as múltiplas alterações associadas ao programa de morte celular programada (30). Bax e Bak e as proteínas anti-apoptóticas do tipo Bcl-2 compartilham domínios de interação proteína-proteína com uma subfamília chamada BH3 (31).

As células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para limitar ou contornar essas ações. Uma dessas estratégias envolve a perda da função do supressor tumoral TP53 levando ao bloqueio do principal circuito crítico de indução a apoptose (32).

1.6.3 Surgimento de metástase

Entende-se por metástase o desprendimento de células neoplásicas do tumor primário, sua migração através do interstício, penetração em vasos sanguíneos e linfáticos sendo levadas a outro local onde ocorre sua nova formação de colônia neoplásica. Este processo metastático começa muito antes desses tumores serem detectados (33). Durante o crescimento do tumor primário, a alta instabilidade genômica leva à evolução das células para que adquiram características, ou manifestem propriedades, que normalmente não possuiriam. Ao longo do processo, as células se adaptam a novos ambientes e respondem a estímulos recebidos de outras células tumorais e estroma (34).

1.6.4 Induzindo angiogênese

Como os tecidos normais, os tumores para se manterem vivos desenvolvem um mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos, através da angiogênese. Por este mecanismo, as células tumorais conseguem captar nutrientes e liberar resíduos metabólicos e dióxido de carbono; processo este que permanece ativo todo o tempo (35).

Estudos revelam que a angiogênese é estimulada através de diversos reguladores, entre eles as proteínas de sinalização que se ligam a receptores de superfície celular, agindo como estimuladores ou inibidores de receptores que

geralmente são exibidos pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos (36). As moléculas sinalizadoras que estão ligadas ao processo de angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A) e a trombospondina -1 (TSP-1). A sinalização de VEGF-A ocorre através de receptores tirosina quinases (VEGFR-1-3). A expressão do gene VEGF pode ser regulada positivamente tanto por hipóxia quanto por sinalização de oncogenes (37).

Além disso, outros sinais pró-angiogênicos, como fatores membros da família do fator de crescimento de fibroblastos-FGF1 desempenham um papel importante na regulação da sobrevivência celular, divisão celular, angiogênese diferenciação e migração celular e, foram implicados na sustentação da angiogênese tumoral quando sua expressão está cronicamente regulada positivamente. TSP-1 é considerada uma proteína importante nesse equilíbrio do processo angiogênico e tem como função estimular ou inibir a formação de novos vasos sanguíneos. Além disso, também se liga a receptores de membrana das células endoteliais (38). A angiogênese é induzida no início do desenvolvimento de vários estágios dos cânceres invasivos, tanto em modelos animais quanto em humanos (39).

1.6.5 Ativando Invasão

Em 2000, os mecanismos subjacentes à invasão e metástase eram em grande parte um enigma. À medida que os carcinomas com origem em tecidos epiteliais progrediam para graus patológicos mais elevados de malignidade, as células cancerosas desenvolveram alterações em sua forma, bem como em sua ligação a outras células e a própria matriz extracelular (ECM) (40).

A alteração mais bem caracterizada na invasão dos carcinomas envolve a proteína E-caderina. As caderinas são proteínas de adesão celular dependentes de cálcio. Elas preferencialmente interagem entre si porque possuem sempre o mesmo tipo de proteína e por isso são consideradas moléculas de adesão celular (41). Ao formar junções aderentes com células epiteliais adjacentes, a proteína E-caderina ajuda a montar camadas de células epiteliais e manter a quiescência (estado fisiológico de baixa atividade metabólica) das células dentro dessas camadas. A regulação negativa frequentemente observada e a alteração ocasional das E-caderinas em

carcinomas humanos fornecem um forte suporte para o seu papel como um supressor dessa capacidade marcante de invasão (42).

1.6.6 Metabolismo energético tumoral

A proliferação celular anormal representa a essência das doenças neoplásicas, que envolve não apenas a alta proliferação celular sustentada, mas também os ajustes correspondentes do metabolismo energético a fim de alimentar o crescimento e a divisão das células (43). As células normais absorvem a glicose por seus transportadores, os GLUTs, colocando esse substrato para interior da célula. A glicose sofre a ação da enzima hexoquinase que faz o processo de fosforilação gerando glicose-6-fosfato (G6P), que é isomerizada formando frutose-6-fosfato (F6P). Em seguida esse substrato passa por uma fosforilação através da enzima Fosfofrutoquinase 1 (PFK-1) gerando frutose-1,6-difosfato (F1,6DP) que passará por processos enzimáticos até chegar na última etapa, a formação do piruvato (44). Essas etapas ocorrem sem a presença do oxigênio, chamada de glicólise anaeróbica; a glicólise é favorecida e relativamente pouco piruvato é despachado para as mitocôndrias consumidoras de oxigênio. O saldo de ATP formado numa célula normal é em torno de 30 ATP (45).

Otto Warburg observou pela primeira vez uma característica anômala do metabolismo energético das células cancerosas. Mesmo na presença de oxigênio, as células tumorais podem reprogramar seu metabolismo de glicose e, portanto, sua produção de energia, limitando-o em grande parte à glicólise (46).

A existência dessa mudança metabólica foi comprovada nas décadas seguintes. Essa reprogramação do metabolismo energético que células cancerosas fazem é para compensar a menor produção de ATP pela glicólise em relação à fosforilação oxidativa mitocondrial. Isso se deve em parte pela regulação positiva dos transportadores de glicose, notavelmente pelo GLUT1, que aumenta substancialmente a importação de glicose para o citoplasma (47). A captação e a utilização de glicose aumentada foram documentadas em muitos tipos de tumores e demonstrado pela tomografia por emissão de prótons (PET) onde foi utilizado um radiomarcador análogo a glicose (^{18}F -fluorodeoxiglicose, FDG) (48).

Foi demonstrado que o aumento significativo do fluxo metabólico ao longo da via glicolítica está associado a oncogenes ativados pela proteína Ras (envolvida na multiplicação celular, diferenciação celular e fusão de membranas) e supressores tumorais como por exemplo a proteína TP53. Essa dependência da glicose pode ser ainda mais acentuada devido às condições de hipoxia que ocorre em muitos tumores. Assim, tanto a proteína Ras quanto a hipoxia podem aumentar independentemente os níveis dos fatores de transcrição HIF1 α e HIF2 α , que por sua vez aumentam a glicólise (49, 50).

1.6.7 A Transição Epitelial Mesenquimal (TEM) regula a Invasão e Metástase

A Transição Epitelial Mesenquimal ou Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) é um processo pelo qual as células neoplásicas epiteliais perdem a expressão de E-caderina, mediada pelos fatores de transcrição SNAIL, ZEB1, ZEB2 e TWIST, subseqüentemente adquirindo um fenótipo mesenquimal com aumento do comportamento migratório (51).

Este mecanismo tornou-se proeminentemente implicado como um meio pela qual as células epiteliais transformadas podem adquirir as habilidades de invadir, resistir à apoptose e disseminar-se. Este programa TEM pode ser ativado de forma transitória ou estável e em diferentes graus, por células tumorais durante seus respectivos processos.

Um conjunto de fatores de transcrição que têm ação em muitos tecidos e órgãos são os seguintes: Snail (envolvido na indução da transição epitelial para mesenquimal, formação e manutenção do mesoderma embrionário, sobrevivência e migração celular), Slug (envolvido na adesão e proliferação celular em queratinócitos epidérmicos) (52), TWIST (fator de transcrição que desempenha papéis essenciais e centrais em vários estágios do desenvolvimento embrionário e contribui significativamente para metástase do tumor, até mesmo a iniciação do tumor e o crescimento do tumor primário) e Zeb1/2 (induz transição epitélio mesênquima). Esses fatores transcricionais são expressos em várias combinações e em vários tipos de tumores malignos e foram mostrados em modelos experimentais de formação de carcinoma como causalmente importantes para invasão e metástase (53).

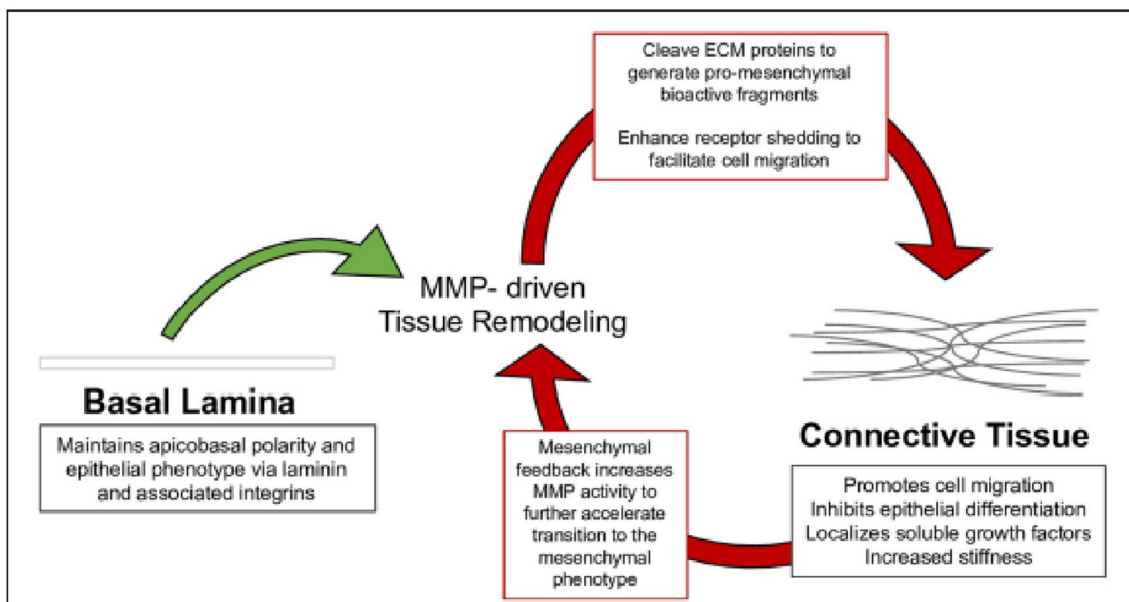


Figura 3: Efeitos da lâmina basal sobre o processo de invasão tecidual (53).

1.6.8 Características candidatas ao desenvolvimento do câncer

Definimos as características do câncer como capacidades funcionais adquiridas que permitem que as células cancerosas sobrevivam, proliferem e se disseminem; essas funções são adquiridas em diferentes tipos de estágios tumorais por meio de mecanismos distintos. Sua aquisição é possibilitada por duas características habilitadoras (54).

O primeiro mecanismo envolve um estado inflamatório das lesões pré-malignas que é conduzido por células do sistema imunológico e o segundo envolve ativamente o processo de fuga das células cancerosas do ataque e eliminação pelo sistema imune. Essa capacidade do sistema imunológico de atuar sobre o desenvolvimento e progressão do tumor, pode facilitar a progressão de muitas formas de cancer humano, portanto, podem ser consideradas marcas emergentes do cancer (55).

Por exemplo, as células cancerosas podem modificar linfócitos T citotóxicos CD8 e células NK infiltrantes, secretando TGF- β (fator de crescimento beta) ou outros fatores imunossupressores (56). Outra característica emergente está relacionada à inflamação como promotora tumoral. Alguns tumores são

densamente infiltrados por células do sistema imunológico e, assim refletem as condições inflamatórias que surgem em tecidos neoplásicos (57).

A inflamação pode contribuir fornecendo moléculas bioativas para crescimento do tumor, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase, e sinais que levam à ativação de EMT. Além disso, as células inflamatórias liberam espécies reativas de oxigênio, que são ativamente mutagênicas para as células cancerosas próximas, acelerando sua evolução em direção a estados de malignidade elevada (58).

1.6.9 Transição epitélio-mesênquima e a plasticidade.

Durante a progressão do câncer, as células tumorais sofrem alterações moleculares e fenotípicas denominadas coletivamente como plasticidade celular, tais mudanças resultam em alterações genéticas e epigenéticas, contribuindo assim para a heterogeneidade do tumor e para a resistência à terapia (59).

A plasticidade no processo epitélio mesênquima (TEM) é o caso mais conhecido de plasticidade de células tumorais, esta descoberta está relacionada a trabalhos recentes (60). Em vários tecidos adultos, as células mudam sua identidade como parte de uma resposta fisiológica a lesão ou inflamação. Tais alterações podem ocorrer ao nível de células individuais, onde o fenômeno é comumente referido como “transdiferenciação” (61).

O conceito de transdiferenciação tem sido reconhecido há muito tempo pelos patologistas na forma de metaplasia tecidual, em que células de um determinado fenótipo diferenciado alteram acentuadamente sua morfologia para se tornarem claramente reconhecíveis como elementos de outro tecido, um exemplo que podemos relatar é a inflamação crônica do epitélio escamoso estratificado do esôfago que induz a transdiferenciação em um epitélio colunar simples que é característico do intestino, facilitando assim o desenvolvimento subsequente de adenocarcinomas, e não dos carcinomas de células escamosas que seriam esperados para surgir deste epitélio escamoso (62).

Dados recentes mostram que existe proteínas regulatórias de fatores de transcrição que estimulam essa mudança que são MIST1 e PTF1 governam, através da sua expressão no contexto de circuitos reguladores auto-sustentáveis, a especificação e manutenção do estado diferenciado. Acredita-se que a metaplasia desempenhe uma função protetora diante de danos crônicos, seja substituindo tecidos perdidos ou formando barreiras mais adequadas para resistir a condições hostis (63).

Outra linha de evidência para esse processo da plasticidade e TEM e a regulação epigenética, que envolve a capacidade de crescimento invasivo das células cancerígenas. Um exemplo clássico de indução reversível de invasividade de células cancerígenas, *ZEB1*, induz a expressão de uma histona metiltransferase, *SETD1B*, que por sua vez sustenta a expressão de *ZEB1* em um ciclo de feedback positivo que mantém o estado regulatório (invasivo) do TEM (64).

Um estudo anterior documentou de forma semelhante que a indução de TEM pela expressão regulada positivamente de um PTF1 relacionado, *SNAIL1*, causou alterações marcantes na paisagem da cromatina consequentes à indução de uma série de modificadores da cromatina, cuja atividade foi comprovadamente necessária para a manutenção do estado fenotípico (65).

Além disso, uma lista de condições e fatores aos quais as células cancerígenas nas margens dos tumores estão expostas, incluindo hipóxia e citocinas secretadas pelas células do estroma, podem evidentemente induzir a TEM e, por sua vez, a invasividade (66).

Outro exemplo de plasticidade regulada por epigenética foi descrito em carcinomas de células escamosas orais humanos (OSCC), em que as células cancerígenas nas margens invasivas adotam um estado EMT parcial (p-EMT) sem os PTFs mencionados acima, mas expressando outros genes definidores de TEM que são não expresso no núcleo central dos tumores (67).

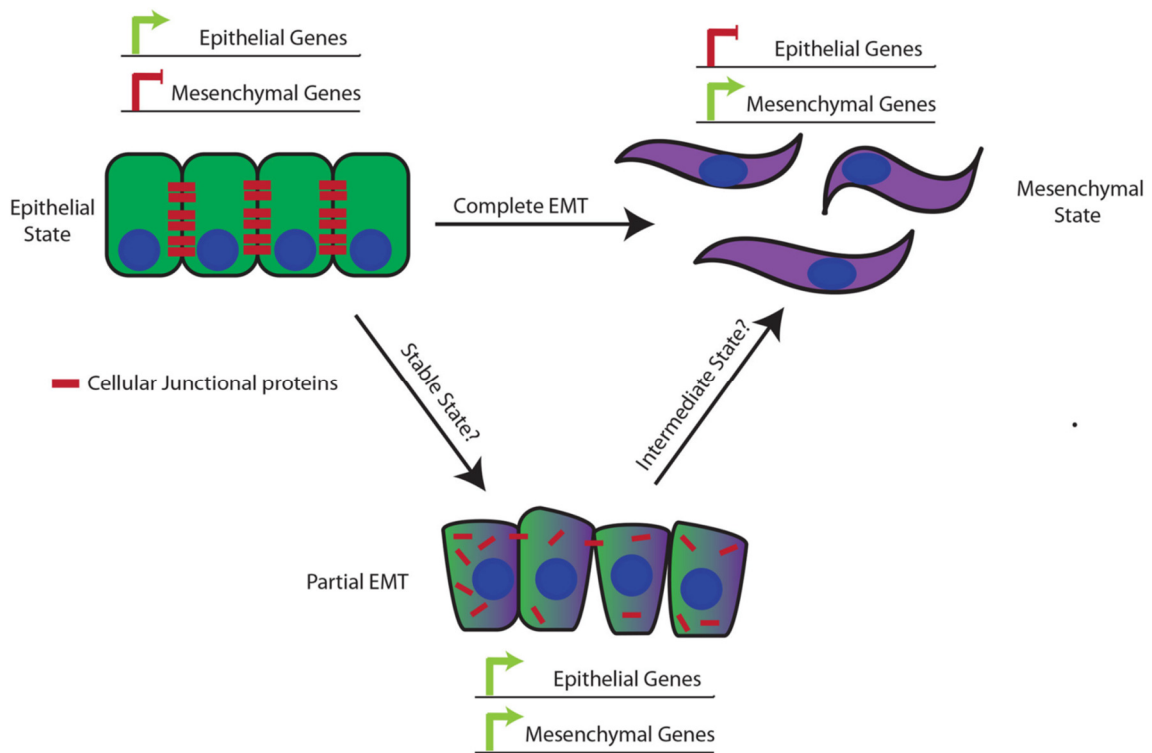


Figura 4: Efeitos da adesão célula-célula sobre a transição epitélio-mesênquima: As células epiteliais são caracterizadas por conexões intercelulares compostas por proteínas junçãoais, como a E-caderina. Ao longo da TEM, essas células perdem essas junções e, em vez disso, adquirem fenótipos funcionais e morfológicos que lembram os fibroblastos. Essas mudanças são orquestradas por uma re ligação transcricional que resulta no silenciamento ou repressão de genes epiteliais. Embora este processo represente classicamente um TEM completa”, há evidências crescentes de estados TEM parciais, que são frequentemente definidos pela expressão dupla de genes epiteliais e mesenquimais. Não está claro se esses estados TEM parciais observados representam estados estáveis ou são intermediários transitórios ao longo de um TEM. Embora os mecanismos subjacentes à TEM parcial ainda sejam em grande parte desconhecidos, há evidências de que a relocalização das proteínas junçãoais desempenha um papel durante este processo (59).

2. CÉLULAS TUMORAIS E A VIA GLICOLÍTICA

A via glicolítica, envolvida no crescimento dos tumores, tem como consequência, a superprodução de lactato, que provoca um estado de acidose metabólica, inibição de vias apoptóticas e contribui para o crescimento do tumor (69). Neste processo, ocorre uma maior captação e degradação de glicose devido ao ambiente hipóxico que as células tumorais se encontram. Outro fator importante neste cenário é a falta, pelo menos inicialmente, de redes de capilares localizadas na região do tumor para suprir as necessidades das células tumorais que dependem de uma maior captação de glicose para maior parte de produção de ATP em relação a uma célula normal (68).

O aumento da atividade glicolítica nas células tumorais é alcançado devido ao aumento de atividade de determinadas enzimas, como por exemplo, as enzimas hexoquinase, PFK1 e PKM2, e também pelos transportadores de membrana GLUT1 e GLUT3 que carregam a glicose para interior da célula (69).

Também é importante a ação de vários fatores que induzem esses processos. Um deles é o fator induzido por hipóxia (HIF-1) que ativa a enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK) e ao mesmo tempo, inibe a piruvato desidrogenase (PDH). A PDH é responsável pela conversão do piruvato em acetil-CoA, na mitocôndria, além de alterar os processos mitocondriais (Ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa), aumentando as concentrações de piruvato intracelular. O HIF-1 está entre os principais fatores envolvidos no processo de aumentar a vascularização (angiogênese) em tumores permitindo sua sobrevivência e proliferação (70).

Existem evidências de que a ativação de vários oncogêneses pode realmente resultar em uma supressão semelhante da função mitocondrial, independente da hipóxia. Em outras palavras, a sinalização não hipóxica durante a oncogênese pode imitar os efeitos do HIF-1 e sustentar o mesmo fenótipo metabólico, continuando a oferecer uma vantagem de crescimento e inibição da apoptose no tumor em crescimento (71). Por exemplo, o p53 inibe a expressão da enzima glicolítica fosfogliceratomutase, o p53 pode regular a atividade mitocondrial aumentando a expressão das subunidades mitocondriais do citocromo c oxidase e da proteína de reparo do DNA mitocondrial p52R2 (72).

Nessa reprogramação metabólica, o tumor utiliza mais a via glicolítica, acarretando aumento da quantidade de lactato, que conseqüentemente aumenta a acidez metabólica intracelular. O controle dessa acidez é feito pelas proteínas transportadoras de monocarboxilatos (MCT4 e MCT1). MCT4 é responsável pelo efluxo de lactato e o MCT1 pelo influxo de lactato. Ambos os transportadores são permeases não eletrogênicas e respondem às concentrações imediatas de lactato e H⁺ em ambos os lados da membrana (73).

A indução geral dessas vias pode refletir sua regulação por vias de sinalização que são comumente perturbadas nas células cancerosas. Essas alterações estimulam a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (a qual regula diversos processos celulares, como proliferação, crescimento, apoptose e rearranjo citoesquelético), a AKT (a qual regula a função de muitas proteínas celulares envolvidas em processos que incluem metabolismo, apoptose e proliferação) e o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (proteína quinase que regula o crescimento, sobrevivência, metabolismo e imunidade celular), promovendo assim um programa anabólico robusto com aumento do fluxo glicolítico, síntese de ácidos graxos e aminoácidos, respectivamente. As células tumorais frequentemente contêm mutações que permitem que a rede PI3K-AKT-mTOR atinja maior eficiência com dependência mínima da estimulação extrínseca por fatores de crescimento (74).

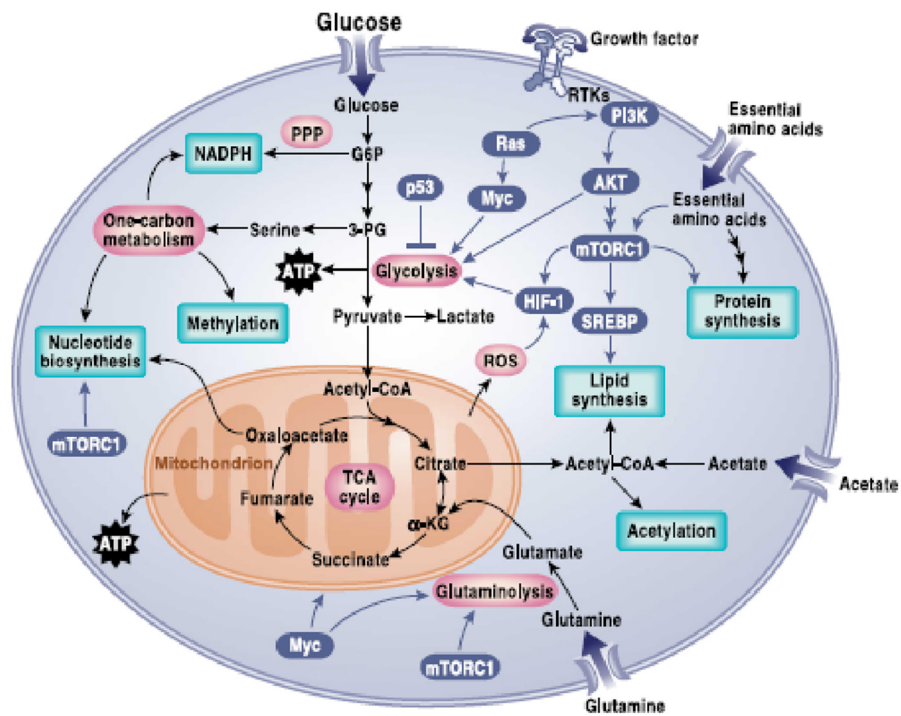


Figura 5. vias de sinalização do metabolismo do câncer (76).

As células tumorais alteram a via da mTORC1 que induz um programa de crescimento anabólico na síntese de nucleotídeos, proteínas e lipídios. Além dessas alterações, outras estão ocorrendo, como a perda de supressores tumorais, a ativação de oncogenes como MYC, que promove ainda mais o anabolismo por meio da regulação da transcrição de genes metabólicos. O metabolismo tumoral controla a sinalização por meio de regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio e da via das pentoses fosfato (PPP) (74).

3. RELAÇÃO METABOLISMO E PLASTICIDADE

A invasão e metástase de células cancerígenas resultam da ativação do citoesqueleto nas células tumorais que inicia a migração e separação das células do tumor primário e também o rompimento da membrana basal, seguida de sua disseminação através do tecido intersticial. As células tumorais podem espalhar-se através dos vasos sanguíneos e linfáticos para outros órgãos e iniciar nova colonização (75).

O estresse bioenergético resultante leva a respostas de sinalização e adaptação metabólica, garantindo a sobrevivência e ajustando a atividade migratória das células tumorais. Esta resposta ao déficit energético foi recentemente identificada, incluindo uma mudança de células cancerígenas invasivas para a migração amebóide com conservação de energia e uma capacidade aprimorada de metastatização. A migração celular é essencial para muitos processos biológicos, enquanto a migração celular anormal é característica das células cancerígenas. As células epiteliais tornam-se móveis ao passarem pela transição epitelial-mesenquimal, e as células mesenquimais aumentam a velocidade de migração ao adotar características amebóides (76).

Além da migração amebóide existem outros tipos de migração envolvendo os processos proliferativos das células tumorais. O movimento coletivo depende da adesão célula-célula e representa um importante modo de migração na morfogênese embrionária, cicatrização de feridas e metástase de células cancerosas (77). A migração mesenquimal de células individuais envolve adesões célula-matriz, contratilidade da actina-miosina e remodelação proteolítica do tecido, conforme detectado em fibroblastos e células tumorais que sofreram a transição epitelial-mesenquimal (78).

Sob condições de estresse metabólico, incluindo acidose, hipóxia e privação de nutrientes, mecanismos adicionais para a produção de ATP são ativados, metabolismo de aminoácidos, oxidação lipídica. Poucos minutos após a privação de energia, as células cancerosas podem adaptar a produção de ATP ativando vias que regulam o metabolismo celular, incluindo a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e o fator induzível por hipóxia (HIF-1), que permitem uma resposta bioenergética (79). A AMPK estimula a captação de glicose (através dos transportadores GLUT1 e GLUT4) e a produção de ATP através da glicólise. Esta enzima promove ainda o uso de fontes alternativas de energia,

incluindo a importação de lipídios para as mitocôndrias para oxidação de ácidos graxos (80).

3.1 Equilíbrio redox através da Via das pentoses fosfato (PPP)

O ciclo das pentoses é uma rota alternativa para oxidação da glicose-6-fosfato, no citosol sem gerar ATP. As células normais, na via da glicólise, convertem a glicose em glicose-6-fosfato; porém existem outros caminhos catabólicos para glicose-6-fosfato (81). A glicose-6-fosfato tem outra finalidade que leva a formação de outro tipo de composto para célula, a formação desse novo composto ocorre através da oxidação da glicose-6-fosfato que acontece pela via das pentoses fosfato (PPP) (82).

A formação do NADPH é iniciada pela oxidação da glicose-6-fosfato por ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) para formar 6-fosfoglicona- δ -lactona. Nessa ação, o NADP, que é aceptor de elétrons, é em seguida reduzido gerando NADPH reduzido. Em seguida a lactona é oxidada pela enzima 6-fosfogliconato-desidrogenase para formar ribulose-5-fosfato, e nessa reação acaba gerando a segunda molécula de NADPH. Esta fase é conhecida como a fase oxidativa do ciclo das pentoses (83). Na fase não oxidativa, ocorre a formação contínua de NADPH, através da ribulose-5-fosfato produzidas na fase oxidativa, e é convertida em ribose-5-fosfato. Essa pentose-5-fosfato é reutilizada por intermédio da atividade das transcetolases (TKTL) e transaldoses (TAL), que são enzimas responsáveis por reações de interconversão. Essas enzimas agem regenerando a glicose-6-fosfato, que em seguida passa para fase oxidativa, permitindo a formação contínua de NADPH (84). Em resumo, a via das pentoses permite a produção de NADPH, que pode ser utilizado como fonte de poder redutor nas reações biossintéticas (ácidos graxos) e na proteção contra espécies reativas de oxigênio. Essa via ainda permite a produção da ribose-5-fosfato, precursor da ribose e da desoxirribose (síntese de ácidos nucleicos) (85).

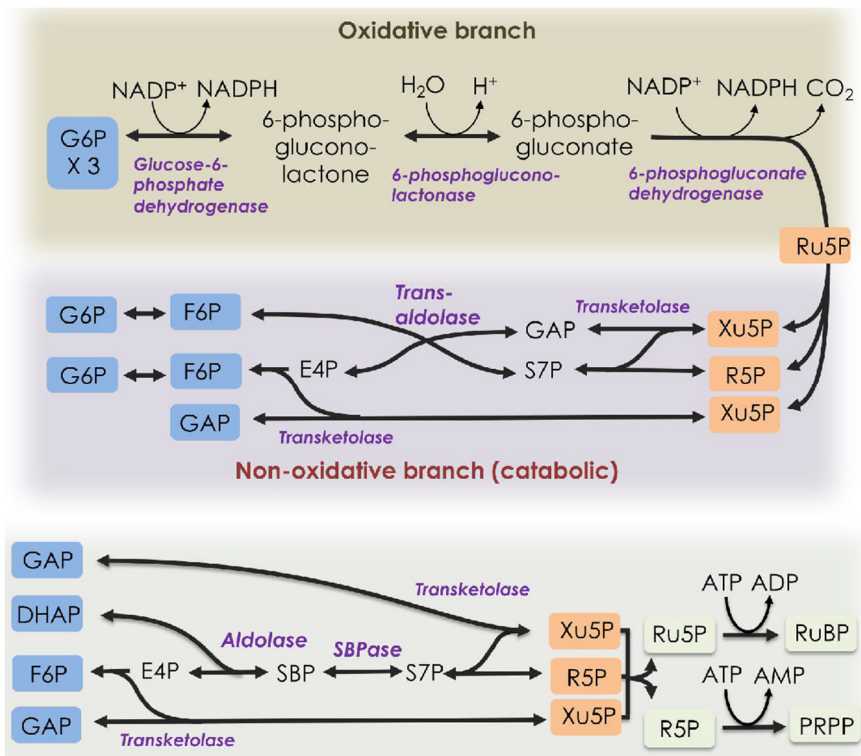


Figura 6: Via das pentoses-fosfato. O NADPH, formado na fase oxidativa, é aproveitado para gerar glutatona, e sofre a ação da enzima glutatona redutase, originando GSH (glutatona reduzida). Na fase oxidativa a ribose-5-fosfato serve como precursor para nucleotídeos, coenzimas e ácidos nucleicos. Em células que não estão utilizando a ribose-5-fosfato para a biossíntese, se deslocam para fase não oxidativa pela ação da atividade transcetolases (TKTL) e transaldoses (TAL) com isso permitindo a produção contínua de NADPH (86).

3.2 Como a célula tumoral utiliza NADPH ao seu favor contra espécies reativas de oxigênio (EROs)?

O oxigênio é um dos principais compostos orgânicos de oxidação e também na produção de ATP envolvendo o metabolismo celular. Nesse processo de produção de energia através da utilização do oxigênio, são produzidas espécies reativas e radiculares, que são átomos ou moléculas que contêm número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica, e por causa deste não emparelhamento acabam por ficar muito instáveis e reativas (87). Nessas reações, principalmente relacionadas ao metabolismo do oxigênio, ocorre a produção de uma variedade de substâncias químicas que são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs em altas concentrações podem alterar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e

proteínas. Esse desequilíbrio provocado por espécies reativas de oxigênio leva a uma condição prejudicial à célula denominada estresse oxidativo; este processo é uma das principais causas de danos às células e pode levar à apoptose. Entretanto, nosso organismo consegue se proteger desses danos através de compostos muito importantes denominados antioxidantes (88).

Em condições fisiológicas, as EROs são constantemente produzidas e removidas dentro das células. Outro detalhe importante dessas espécies no aspecto fisiológico é na transdução de sinal e a resposta imunológica. Para manter controle dessas reações o sistema de antioxidantes tem que estar em equilíbrio. No entanto, a superprodução de espécies reativas ou desregulação dos sistemas antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo localizado ou sistêmico. No entanto, o estresse oxidativo mais grave e especialmente crônico pode levar a muitos efeitos no nível molecular, gerando formas oxidadas de proteínas, lipídios e DNA (89). Dentre os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo crônico estão o envelhecimento mais rápido, mutações de DNA, mudanças epigenéticas que, nos piores casos, se acumulam com o desenvolvimento e progressão de muitas doenças, incluindo alterações malignas (90).

Muitos processos no nível celular dependem de vias de sinalização para regenerar e manter o estado/equilíbrio redox celular. Os níveis de EROs constantemente ou periodicamente elevados podem ser consideradas como fator de risco para tumorigênese e ao mesmo tempo, também estão envolvidos na indução da angiogênese, transição epitelial-mesenquimal (TEM) e sua "interconexão" com as células circundantes que, por sua vez, apoiam a tumorigênese, juntamente conduzindo o desenvolvimento do tumor. Assim, o estresse oxidativo tem papel central na mudança metabólica que leva as células à adaptação a estressores carcinogênicos e à transformação maligna (91). Talvez a característica metabólica mais marcante de muitos tumores seja a forte dependência da glicólise anaeróbica, apesar da mitocôndria funcional e da disponibilidade de oxigênio. Portanto, os níveis de EROs intracelulares devem ser mantidos equilibrados e abaixo de um limiar tóxico, ao passo que uma mudança drástica em direção à oxidação causaria a morte das células tumorais (92).

Esse alto consumo metabólico acaba aumentando o estresse oxidativo nas células tumorais. Nesse processo o NADPH é utilizado como redutor doando íons de hidrogênio. Para explicar melhor esse assunto podemos citar o ciclo da glutatona (GSSG/GSH), onde NADPH é utilizado pela glutatona redutase para regenerar o tripeptídeo na forma reduzida (GSH), e desta forma, reduzir o dano oxidativo sobre lipídios, proteínas e outras moléculas sensíveis (87). Para evitar o dano oxidativo, as células se valem de vários tipos de antioxidantes chamados de enzimáticos (enzimas SOD, CAT, GPx, tioredoxinas), e também os não enzimáticos que são em sua maioria compostos exógenos. Baseado nestes apontamentos se afigura razoável afirmar que as células tumorais utilizam o NADPH produzido pela via das pentoses para manter o equilíbrio redox intracelular (93). Resultados foram obtidos em carcinoma de células renais, onde a atividade alterada da PPP foi identificada como uma característica metabólica chave do estado do câncer (94).

A compreensão da via Glicolítica e do ciclo das Pentoses Fosfato revela aos poucos um mundo novo, onde a possibilidade do desenvolvimento de métodos de tratamento inovadores que visam reprogramar a glicólise e o fluxo desta via no câncer estão cada vez mais ao alcance.

4. HIPÓTESE

A modulação do ciclo das pentoses e da via glicolítica pode afetar os processos de invasão, metastátese e proliferação celular das células do carcinoma espinocelular oral.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o comportamento celular de linhagens tumorais de carcinoma espinocelular oral (CAL27, SCC9) através da modulação da via glicolítica e das vias pentoses através da inibição da piruvato desidrogenase kinase (via glicolítica) e da inibição da glicose-6-fosfato desidrogenase (ciclo das pentoses).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico (culturas 2D) dos inibidores 6-AN e DCA na linhagem de queratinócitos normais, células displásicas (CAL27) e de carcinoma invasivo (SCC9);
- Avaliar o efeito dos inibidores 6-AN e DCA na adesão célula-célula e coesão de culturas organotípicas (esferóides);
- Avaliar o comportamento migratório em termos de velocidade, direcionalidade e migração efetiva das 3 linhagens celulares frente à ação dos inibidores.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

Este estudo utiliza linhagens comerciais de células epiteliais não tumorais e tumorais, não havendo conflitos éticos.

6.2 Delineamento do Estudo

Estudo experimental em laboratório, descritivo, analítico, utiliza modelo experimental in vitro.

6.3 Reagentes e cultura celular

6.3.1 Linhagens Celulares

Linhagens celulares de HACAT (queratinócitos – ATCC® PCS-200-011TN TM), CAL27 (CEC bucal similar a displasia – ATCC® CRL-2095 TM), SCC9 (CEC bucal invasivo– ATCC® CRL-1628 TM). Todos os meios de cultura serão suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa de cultivo celular com CO₂, 5% e umidade constante.

6.3.2. Reagentes que foram utilizados

- A 6-aminonicotinamida (6-AN), é uma amida do ácido monocarboxílico resultante da condensação formal do grupo carboxi do ácido 6-aminonicotínico com amônia. Um inibidor da enzima dependente de NADP⁺, 6-fosfogulonato desidrogenase, interfere na glicólise, resultando na depleção de ATP e aumento do estresse oxidativo;
- Dicloroacetato de sódio (DCA) é o sal de sódio do ácido dicloroacético com potencial de atividade antineoplásica. O íon dicloroacetato inibe

a piruvato desidrogenase Kinase, esse agente pode estimular a apoptose nas células cancerígenas, restaurar fosforilação oxidativa.

6.3.3. Cálculo de Amostra

Por se tratar de experimentos in vitro utilizando ambientes controlados, os experimentos com linhagens celulares foram realizados em triplicata, obtidas médias \pm erro padrão de pelo menos três experimentos independentes.

6.3.4 Cultivo Celular

As células cultivadas passaram por meio de cultivo trocado a cada 48 horas até atingirem confluência de 80%, em seguida foram tripsinizadas e replaqueadas. No dia das análises as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos em tubo apropriado e então foram realizadas as técnicas experimentais propostas.

6.4 Ensaio de proliferação

As células HACAT, CAL27 e SSC9, foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em atmosfera controlada a 37°C e CO₂ em 5% por 24 horas para aderência na densidade de 3×10^3 de células/poço. Após este período, as células foram expostas aos inibidores DCA (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM) e 6AN (1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M), pelo período de 24 e 48 horas.

Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido, as células remanescentes lavadas com PBS 1X por 3 vezes. Após, foi adicionado 50 μ M de ácido tricloroacético a 50% a todos os poços e a placa foi armazenada a uma temperatura de 4°C por 24 horas. Após a fixação, foi feita uma lavagem para retirada do fixador e adicionado 50 μ M da solução SRB e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente para permitir a adequada marcação. Após a marcação, 100 μ M de Trisma foi adicionado em cada poço por uma hora em temperatura ambiente para a completa solubilização do corante, permitindo desta forma a leitura espectrofotométrica a 560 nm.

6.5 Ensaio por esferoides

As células foram cultivadas em meio de cultura e divididas em grupos experimentais: controle e os inibidores 6 AN e DCA, até atingirem uma confluência de 80%, e logo em seguida passaram por protocolos já estabelecidos, para ver velocidade de migração. A direcionalidade foi analisada pelo ensaio de time lapse, na qual as linhagens celulares serão plaqueadas em placas de 12 poços e logo em seguida passaram por protocolos pertencentes a cultura de células. Após, foi feita análise através do software image J.

6.6 Ensaio de migração

As esferas de 96 poços foram previamente recobertas por 50 μ L de agarose, após solidificação foram semeadas 1×10^4 células das três linhagens estudadas. A placa foi levada a incubadora em 37°C com 5% de CO₂, por 72 horas para a correta formação dos esferóides. Após este período, foi realizado tratamento com os inibidores 6AN e DCA, sendo obtidas micrografias de cada esfera nos tempos 0, 24 horas, 48 horas e 72 horas, a um aumento padronizado de 100X. As análises da área e perímetro foi utilizado software Image J.

6.7 Análise estatística

Os dados coletados foram plotados no *software* Prisma 8.0 e em seguida foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados seguiam distribuição Gaussiana, sendo a distribuição considerada normal e a comparação entre os grupos foi realizada através do teste paramétrico One-Way ou Two-Way Anova quando necessário. Foi assumido um $p < 0,05$ como significativo. Se o teste Shapiro-Wilk resultasse em $p > 0,05$, a distribuição seria considerada não normal e o teste não paramétrico adequado seria utilizado.

10. REFERÊNCIAS

1. Awojobi O, Scott SE, Newton T. Patients' perceptions of oral cancer screening in dental practice: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2012;12:55.
2. D'Souza S, Addepalli V. Preventive measures in oral cancer: An overview. *Biomed Pharmacother*. 2018;107:72-80.
3. Dalanon J, Matsuka Y. Decreased Global Interest in Oral Cancer During the COVID-19 Pandemic. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(7):2117-24.
4. Hung LC, Kung PT, Lung CH, Tsai MH, Liu SA, Chiu LT, et al. Assessment of the Risk of Oral Cancer Incidence in A High-Risk Population and Establishment of A Predictive Model for Oral Cancer Incidence Using A Population-Based Cohort in Taiwan. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(2).
5. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884-94.
6. Feller LL, Khammissa RR, Kramer BB, Lemmer JJ. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):31.
7. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:603740.
8. Carnelio S, Rodrigues GS, Shenoy R, Fernandes D. A brief review of common oral premalignant lesions with emphasis on their management and cancer prevention. *Indian J Surg*. 2011;73(4):256-61.
9. Giri D, Agarwal N, Sinha A, Srivastava S, Mishra A. Diode laser: In treatment of recurrent verrucous leukoplakia. *Contemp Clin Dent*. 7. India2016. p. 250-4.
10. Jimson S, Murali S, Zunt SL, Goldblatt LI, Srinivasan M. Epithelial expression of keratinocytes growth factor in oral precancer lesions. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016;13(3):199-205.
11. Warnakulasuriya S. Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. *Oral Oncol*. 2020;102:104550.
12. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP, et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2010;267(7):1001-17.
13. de Menezes RF, Bergmann A, Thuler LC. Alcohol consumption and risk of cancer: a systematic literature review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(9):4965-72.
14. Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2014;44(6):1799-805.
15. Seliger B, Massa C, Yang B, Bethmann D, Kappler M, Eckert AW, et al. Immune Escape Mechanisms and Their Clinical Relevance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19).
16. Tan Y, Wang Z, Xu M, Li B, Huang Z, Qin S, et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *Int J Oral Sci*. 2023;15(1):44.
17. Tranby EP, Heaton LJ, Tomar SL, Kelly AL, Fager GL, Backley M, et al. Oral Cancer Prevalence, Mortality, and Costs in Medicaid and Commercial Insurance Claims Data. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2022;31(9):1849-57.
18. Chaturvedi AK, Udaltsova N, Engels EA, Katznel JA, Yanik EL, Katki HA, et al. Oral Leukoplakia and Risk of Progression to Oral Cancer: A Population-Based Cohort Study. *J Natl Cancer Inst*. 2020;112(10):1047-54.

19. Kumari P, Debta P, Dixit A. Oral Potentially Malignant Disorders: Etiology, Pathogenesis, and Transformation Into Oral Cancer. *Front Pharmacol.* 2022;13:825266.
20. Evren I, Brouns ER, Poell JB, Wils LJ, Brakenhoff RH, Bloemena E, et al. Associations between clinical and histopathological characteristics in oral leukoplakia. *Oral Dis.* 2023;29(2):696-706.
21. Wils LJ, Poell JB, Evren I, Koopman MS, Brouns E, de Visscher J, et al. Incorporation of differentiated dysplasia improves prediction of oral leukoplakia at increased risk of malignant progression. *Mod Pathol.* 2020;33(6):1033-40.
22. Hasina R, Martin LE, Kasza K, Jones CL, Jalil A, Lingen MW. ABT-510 is an effective chemopreventive agent in the mouse 4-nitroquinoline 1-oxide model of oral carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009;2(4):385-93.
23. Beerenwinkel N, Schwarz RF, Gerstung M, Markowitz F. Cancer evolution: mathematical models and computational inference. *Syst Biol.* 2015;64(1):e1-25.
24. Welch DR, Hurst DR. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* 2019;79(12):3011-27.
25. Hayflick L. The illusion of cell immortality. *Br J Cancer.* 2000;83(7):841-6.
26. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):8.
27. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene.* 2010;29(41):5545-55.
28. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65.
29. Brown LM, Hanna DT, Khaw SL, Ekert PG. Dysregulation of BCL-2 family proteins by leukemia fusion genes. *J Biol Chem.* 2017;292(35):14325-33.
30. Roufayel R, Younes K, Al-Sabi A, Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life (Basel).* 2022;12(2).
31. Lucantoni F, Salvucci M, Düssmann H, Lindner AU, Lambrechts D, Prehn JHM. BCL(X)L and BCL2 increase the metabolic fitness of breast cancer cells: a single-cell imaging study. *Cell Death Differ.* 2021;28(5):1512-31.
32. Voutsadakis IA. Mutations of p53 associated with pancreatic cancer and therapeutic implications. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2021;25(3):315-27.
33. Ko J, Winslow MM, Sage J. Mechanisms of small cell lung cancer metastasis. *EMBO Mol Med.* 2021;13(1):e13122.
34. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* 2019;9(2):109-27.
35. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 9. England2009. p. 285-93.
36. Madu CO, Wang S, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer.* 2020;11(15):4474-94.
37. Barratt SL, Flower VA, Pauling JD, Millar AB. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
38. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(5):700-12.
39. Menakuru SR, Brown NJ, Staton CA, Reed MW. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br J Cancer.* 2008;99(12):1961-6.
40. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Ngosa Toka F, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer-A Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20).

41. Sisto M, Ribatti D, Lisi S. Cadherin Signaling in Cancer and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24).
42. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a003129.
43. Blagosklonny MV. Hallmarks of cancer and hallmarks of aging. *Aging (Albany NY).* 2022;14(9):4176-87.
44. Martinez CA, Scafoglio C. Heterogeneity of Glucose Transport in Lung Cancer. *Biomolecules.* 2020;10(6).
45. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009;23(5):537-48.
46. Fu XZ, Wang Y. Interferon- γ regulates immunosuppression in septic mice by promoting the Warburg effect through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Med.* 2023;29(1):95.
47. Schiliro C, Firestein BL. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells.* 2021;10(5).
48. Mattos SEC, Diel LF, Bittencourt LS, Schnorr CE, Gonçalves FA, Bernardi L, et al. Glycolytic pathway candidate markers in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Braz J Med Biol Res.* 2021;54(3):e10504.
49. Croteau E, Renaud JM, Richard MA, Ruddy TD, Bénard F, deKemp RA. PET Metabolic Biomarkers for Cancer. *Biomark Cancer.* 2016;8(Suppl 2):61-9.
50. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307.
51. Huang Z, Zhang Z, Zhou C, Liu L, Huang C. Epithelial-mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. *MedComm (2020).* 2022;3(2):e144.
52. Huang Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):129.
53. Scott LE, Weinberg SH, Lemmon CA. Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:135.
54. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol.* 2021;11(1):200358.
55. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(3):151-67.
56. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2021;21(6):345-59.
57. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med.* 2019;18(3):121-6.
58. Katz S, Zsiros V, Dóczy N, Kiss AL. Inflammation-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and GM-CSF Treatment Stimulate Mesenteric Mesothelial Cells to Transdifferentiate into Macrophages. *Inflammation.* 2018;41(5):1825-34.
59. Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov.* 2019;9(7):837-51.
60. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45.
61. Merrell AJ, Stanger BZ. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(7):413-25.

62. Spechler SJ, Souza RF. Barrett's esophagus. *N Engl J Med.* 2014;371(9):836-45.
63. Jiang M, Azevedo-Pouly AC, Deering TG, Hoang CQ, DiRenzo D, Hess DA, et al. MIST1 and PTF1 Collaborate in Feed-Forward Regulatory Loops That Maintain the Pancreatic Acinar Phenotype in Adult Mice. *Mol Cell Biol.* 2016;36(23):2945-55.
64. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell.* 2019;24(1):65-78.
65. Javaid S, Zhang J, Anderssen E, Black JC, Wittner BS, Tajima K, et al. Dynamic chromatin modification sustains epithelial-mesenchymal transition following inducible expression of Snail-1. *Cell Rep.* 2013;5(6):1679-89.
66. Skrypek N, Goossens S, De Smedt E, Vandamme N, Berx G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet.* 2017;33(12):943-59.
67. Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell.* 2017;171(7):1611-24.e24.
68. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl:S129-s50.
69. Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):555-64.
70. Luo Z, Tian M, Yang G, Tan Q, Chen Y, Li G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):218.
71. Bao MH, Wong CC. Hypoxia, Metabolic Reprogramming, and Drug Resistance in Liver Cancer. *Cells.* 2021;10(7).
72. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, et al. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2007;39(6):776-80.
73. Pillai SR, Damaghi M, Marunaka Y, Spugnini EP, Fais S, Gillies RJ. Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38(1-2):205-22.
74. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv.* 2016;2(5):e1600200.
75. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):28.
76. Graziani V, Rodriguez-Hernandez I, Maiques O, Sanz-Moreno V. The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme. *Trends Cell Biol.* 2022;32(3):228-42.
77. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(2):97-109.
78. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):129-35.
79. Xu C, Hong Q, Zhuang K, Ren X, Cui S, Dong Z, et al. Regulation of pericyte metabolic reprogramming restricts the AKI to CKD transition. *Metabolism.* 2023;145:155592.
80. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2):121-35.

81. TeSlaa T, Ralser M, Fan J, Rabinowitz JD. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nat Metab.* 2023;5(8):1275-89.
82. Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J, Kang HB, Seo JH, et al. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2012;22(5):585-600.
83. Kowalik MA, Columbano A, Perra A. Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2017;7:87.
84. Kochetov G, Sevostyanova IA. Binding of the coenzyme and formation of the transketolase active center. *IUBMB Life.* 2005;57(7):491-7.
85. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(11):741-52.
86. Sharkey TD. Pentose Phosphate Pathway Reactions in Photosynthesizing Cells. *Cells.* 2021;10(6).
87. Ju HQ, Lin JF, Tian T, Xie D, Xu RH. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):231.
88. Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, Aparicio S, Behbod F, Bentires-Alj M, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(4):547-73.
89. Nakamura H, Takada K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* 2021;112(10):3945-52.
90. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021;17(1):22-8.
91. Yang IH, Lee JJ, Wu PC, Kuo HK, Kuo YH, Huang HM. Oxidative stress enhanced the transforming growth factor- β 2-induced epithelial-mesenchymal transition through chemokine ligand 1 on ARPE-19 cell. *Sci Rep.* 2020;10(1):4000.
92. Nakashima C, Yamamoto K, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Matsushima S, Fujii K, et al. Expression of cytosolic malic enzyme (ME1) is associated with disease progression in human oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2018;109(6):2036-45.
93. Cao X, Wu L, Zhang J, Dolg M. Density Functional Studies of Coenzyme NADPH and Its Oxidized Form NADP(+) : Structures, UV-Vis Spectra, and the Oxidation Mechanism of NADPH. *J Comput Chem.* 2020;41(4):305-16.
94. Ju HQ, Lu YX, Wu QN, Liu J, Zeng ZL, Mo HY, et al. Disrupting G6PD-mediated Redox homeostasis enhances chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncogene.* 2017;36(45):6282-92.
95. PO DEL, Jorge CC, Oliveira DT, Pereira MC. Hypoxic condition and prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014;34(2):605-12.
96. Yang HC, Wu YH, Yen WC, Liu HY, Hwang TL, Stern A, et al. The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells.* 2019;8(9).
97. Mahmood U, Street JC, Matei C, Ballon D, Martin DS, Koutcher JA. In vivo detection by ^{31}P NMR of pentose phosphate pathway block secondary to biochemical modulation. *NMR Biomed.* 1996;9(3):114-20.
98. Budihardjo, II, Boerner SA, Eckdahl S, Svingen PA, Rios R, Ames MM, et al. Effect of 6-aminonicotinamide and other protein synthesis inhibitors on formation of platinum-DNA adducts and cisplatin sensitivity. *Mol Pharmacol.* 2000;57(3):529-38.
99. Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2).

100. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol.* 2016;43:7-13.
101. Almasi S, Long CY, Sterea A, Clements DR, Gujar S, El Hiani Y. TRPM2 Silencing Causes G2/M Arrest and Apoptosis in Lung Cancer Cells via Increasing Intracellular ROS and RNS Levels and Activating the JNK Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2019;52(4):742-57.
102. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(11):5931-7.
103. Wang Y, Li Q, Niu L, Xu L, Guo Y, Wang L, et al. Suppression of G6PD induces the expression and bisecting GlcNAc-branched N-glycosylation of E-Cadherin to block epithelial-mesenchymal transition and lymphatic metastasis. *Br J Cancer.* 2020;123(8):1315-25.
104. Tamborindéguy MT, Lorenzatto PF, Lamers ML, Lenz G. Asymmetric mitosis contributes to different migratory performance in sister cells. *Exp Cell Res.* 2023;430(1):113715.
105. Nguyen LK, Kholodenko BN, von Kriegsheim A. Rac1 and RhoA: Networks, loops and bistability. *Small GTPases.* 2018;9(4):316-21.
106. Jia D, Lu M, Jung KH, Park JH, Yu L, Onuchic JN, et al. Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(9):3909-18.
107. Agani F, Jiang BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2013;13(3):245-51.
108. Tataranni T, Piccoli C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8201079.
109. Bays JL, Campbell HK, Heidema C, Sebbagh M, DeMali KA. Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. *Nat Cell Biol.* 2017;19(6):724-31.
110. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
111. Fendt SM, Frezza C, Erez A. Targeting Metabolic Plasticity and Flexibility Dynamics for Cancer Therapy. *Cancer Discov.* 2020;10(12):1797-807.