

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer
de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais**

Cristiana Bernadelli Garcia

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer
de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Cristiana Bernadelli Garcia

Orientadora: Prof. Dra. Andreia Machado
Leopoldino

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 03/04/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RESUMO

GARCIA, C. B. **Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais.** 2014. 89f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K) é uma proteína envolvida em processos de expressão gênica e tem sido proposta como ligante de RNAs mensageiros mitocondriais. Apesar de ser considerada um marcador de pior prognóstico no câncer de cabeça e pescoço, o papel da hnRNP K nesta doença ainda é pouco conhecido. O objetivo deste trabalho foi estudar o envolvimento da hnRNP K na mitocôndria com ênfase na bioenergética e na identificação de novos potenciais ligantes de hnRNP K. As linhagens celulares utilizadas foram de carcinoma de cabeça e pescoço (HN13 e CAL 27) com silenciamento de RNA para hnRNP K e células HEK293 com super-expressão de hnRNP K. O efeito do acúmulo celular da hnRNP K na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial foi avaliado por meio da atividade dos complexos mitocondriais I, II e V em células HN13. A redução do nível de hnRNP K usando RNA de interferência promoveu uma diminuição da atividade dos complexos nas células HN13, indicando o envolvimento da proteína na eficiência do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Células HEK293 com super-expressão da hnRNP K (HEK293/hnRNP K) e as linhagens HN13 e CAL 27 com silenciamento e redução estável de hnRNP K foram utilizadas para determinar o papel de hnRNP K no potencial de membrana mitocondrial, níveis de ATP, produção de lactato e consumo de oxigênio. Células HEK293/hnRNP K comparadas ao controle apresentaram maior nível de ATP, menor potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxigênio e maior produção de lactato. As células HN13 com redução da hnRNP K apresentaram níveis mais baixos de ATP, com menor liberação de lactato para o meio extracelular e maior consumo de oxigênio. Esses resultados sugerem que o acúmulo da proteína hnRNP K tem ação importante na mitocôndria por alterar o metabolismo bioenergético celular de fosforilação oxidativa para glicólise anaeróbica. A estratégia de co-immunoprecipitação usando anticorpos para hnRNP K, digestão de proteínas com tripsina e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa foi usada para encontrar novos potenciais ligantes de hnRNP K. A análise dos dados com o software SEPro identificou 57 proteínas candidatas a ligantes da hnRNP K. Três proteínas foram validadas por co-IP e Western blotting: o fator de transcrição mitocondrial PTCD3, YB1 e PSF. Propomos que a hnRNP K apresenta função na energética mitocondrial, e provavelmente, a sua interação com PTCD3 participa desta função.

Palavras-chave: hnRNP K, câncer de cabeça e pescoço, mitocôndria, bioenergética, espectrometria de massas.

ABSTRACT

GARCIA, C. B. **Accumulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in head and neck cancer: mitochondrial studies**. 2014. 89f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a protein involved in gene expression processes, which has been proposed to bind mitochondrial mRNAs. Despite it to be considered a prognostic marker in cancer, the hnRNPK role in this disease is unknown. We addressed the involvement of hnRNP K in mitochondria with emphasis on bioenergetics and identification of new potential ligands of hnRNP K. The cell lines used were from head and neck squamous cell carcinoma (HN13 and CAL 27) with RNA silencing for hnRNP K, and HEK293 cells with overexpression of hnRNP K. The effects of cellular accumulation of hnRNP K in mitochondrial electron chain carriers were assessed by the activity of mitochondrial complexes I, II and V in HN13 cells. Reduced levels of hnRNP K using RNA interference promoted a decrease in the activity of the complexes in HN13 cells, indicating the involvement of the protein in the efficiency of the electron transport in mitochondrial respiratory chain. HEK293 cells with overexpression of hnRNP K (HEK293/hnRNP K) and HN13 and CAL 27 cells with silencing and stable reduction of hnRNP K were used to determine the role of hnRNP K in mitochondrial membrane potential, ATP levels, lactate production and oxygen consumption. HEK293/hnRNP K, compared to control cells, showed higher levels of ATP, reduced mitochondrial membrane potential, lower oxygen consumption and higher production of lactate. HN13 cells with reduced hnRNP K had lower ATP levels, with lower release of lactate to the extracellular medium and higher oxygen consumption. These results suggest that accumulation of hnRNP K protein plays a role in mitochondria by changing the cellular energetic metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis. The strategy of co-immunoprecipitation using antibodies for hnRNP K, protein digestion with trypsin, and liquid chromatography, coupled to mass spectrometer, were used to search for new potential ligands of hnRNP K. Data analysis with software SEPro identified 57 candidate proteins binding to hnRNP K. Three proteins were validated by co-IP and Western blotting: the mitochondrial transcription factor PTCD3, YB1, and PSF. We propose that hnRNP K plays a role in the mitochondrial energetics, and probably its interaction with PTCD3 participates in this function.

Keywords: hnRNP K, HNSCC, mitochondria, bioenergetics, mass spectrometry.

ABSTRACTO

GARCIA, C. B. **Acumulación de ribonucleoproteína nuclear heterogénea de K en cáncer de cabeza y cuello: estudios mitocondriales**. 2014. 89f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

La ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (hnRNP K) es una proteína implicada en procesos de expresión génica y se ha propuesto como ligante del RNAm mitocondrial. Aunque se considera un marcador de mal pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello, el papel de la hnRNP K en esta enfermedad es aún desconocido. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de la hnRNP K en la función mitocondrial, con énfasis en la bioenergética y la identificación de nuevos ligandos para la hnRNP K. Las líneas celulares utilizadas fueron el carcinoma de la cabeza y el cuello (HN13 y CAL 27) con el silenciamiento de RNA y las células HEK293 con la sobreexpresión de hnRNP K. El efecto de la acumulación celular de hnRNP K en la cadena transportadora de electrones mitocondrial se evaluó mediante la actividad mitocondrial de los complejos I, II y V en las células HN13. La reducción del nivel de hnRNP K usando la interferencia de RNA promovió una disminución en la actividad de los complejos en las células HN13, lo que sugiere la implicación de la proteína en la eficiencia del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Células HEK293 con sobreexpresión de hnRNP K (HEK293/hnRNP K) y células HN13 y CAL 27 con silenciamiento y disminución estable de hnRNP K se utilizaron para determinar el papel de hnRNP K en el potencial de membrana mitocondrial, los niveles de ATP, la producción de lactato y el consumo de oxígeno. Las células HEK293/hnRNP K mostraron mayores niveles de ATP, menor potencial de membrana mitocondrial, una reducción del consumo de oxígeno y un aumento de la producción de lactato en comparación con los controles. Las células HN13 con reducida hnRNP K tenían niveles de ATP inferiores, con una menor liberación de lactato en el medio extracelular y mayor consumo de oxígeno. Estos resultados sugieren que la acumulación de la proteína hnRNP K tiene un papel importante en las mitocondrias para alterar el metabolismo bioenergético celular de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaeróbica. La estrategia de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos hnRNP K, digestión de proteínas con tripsina y cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas se utilizó para buscar nuevos ligandos de hnRNP K. El análisis de los datos con el software PatternLab identificaron 57 proteínas candidatas para la unión a la hnRNP K. Tres proteínas fueron validadas por la co-IP y Western Blot: el factor de transcripción mitocondrial PTCD3, YB1 y PSF. Se puede proponer que hnRNP K tiene un papel importante en la mitocondria y, al que menos en parte, su interacción con PTCD3 debe contribuir a esta función.

Palabras clave: hnRNP K, cáncer de cabeza y cuello, mitocondria, bioenergetica, espectrometría de masas

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço está entre as neoplasias mais comuns em todo o mundo, com cerca de 600.000 casos novos e 300.000 mortes a cada ano (Parkin *et al.*, 2005; Curado e Hashibe, 2009). No Brasil, as estimativas da incidência deste tipo de câncer para o ano de 2014 apontam 4.010 casos novos em mulheres e 11.280 casos novos em homens, representando a quinta neoplasia mais frequente na população masculina, excetuando as neoplasias de pele não melanoma (Ministério Da Saúde, 2013).

O câncer de cabeça e pescoço compreende as lesões localizadas no lábio, nariz, boca, faringe, laringe, glândulas salivares e tireóides. Quando diagnosticado precocemente, esse tipo de câncer apresenta bom prognóstico. Pacientes com lesões em estágios iniciais frequentemente manifestam poucos sintomas, o que resulta no atraso do diagnóstico e na diminuição do tempo de sobrevivência. O tratamento de escolha, tanto nesses casos como nos mais avançados, é, em geral, a ressecção cirúrgica, mas também são utilizadas, de forma isolada ou combinadas, a radioterapia e a quimioterapia (Forastiere *et al.*, 2001; Ministério Da Saúde, 2013).

Os principais fatores de risco para as neoplasias de cabeça e pescoço são o uso prolongado de tabaco e álcool (Sturgis, 2013) e as infecções por papilomavírus humano (Ragin, Modugno e Gollin, 2007). O uso concomitante de álcool e tabaco estabelece um sinergismo entre esses fatores de risco, aumentando 30 vezes o risco de desenvolvimento deste tipo de tumor (Ministério Da Saúde, 2013).

Sabe-se que a maioria das células tumorais são derivadas da expansão clonal e crescimento aberrante de uma célula tronco tumoral ou a partir de algumas células iniciadoras de tumor que tenha readquirido a capacidade de auto-renovação (Lobo *et al.*, 2007). Células normais proliferam-se somente quando necessário, como resultado de um equilíbrio delicado entre fatores de promoção e inibição do crescimento sob a influência de sinais bioquímicos fornecidos por células vizinhas e fatores circulantes. No câncer, as células substituem esses mecanismos de controle e ditam seu próprio programa de proliferação, geralmente se multiplicando de forma irrestrita e, ao longo do tempo, passam a escapar de processos de senescência e morte celular. Além disso, conseguem aumentar a sua oferta de oxigênio e nutrientes, pela formação de novos vasos sanguíneos, e adquirem a capacidade de

migrar de seu sítio original, invadindo os tecidos circundantes e promovendo metástases em locais anatômicos distantes. Essas mudanças progressivas no comportamento celular tumoral, da proliferação ligeiramente desregulada para malignidade (metástase), são o resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em um conjunto limitado de genes, oncogenes e genes supressores tumorais, duas classes de genes que alterados podem desencadear e promover o crescimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011).

A atividade e/ou quantidade aumentada ou diminuída de certas moléculas presentes em células de carcinoma de cabeça e pescoço são responsáveis por seu comportamento maligno. Por conseguinte, vários grupos têm explorado o uso de técnicas de proteômica para investigar a natureza das proteínas presentes nesse tipo de câncer. Tal abordagem permitiu a identificação em amostras de carcinoma de língua quando comparado com mucosa normal de proteínas associadas à tumores, tais como proteínas de choque térmico (HSP 60 e HSP27), calgranulina B, ATP sintase β , miosina, tropomiosina e galectina 1 (He *et al.*, 2004). Em outro estudo, várias enzimas glicolíticas, HSPs, antígenos de tumor, proteínas do citoesqueleto, enzimas envolvidas nos sistemas de desintoxicação e anti-oxidantes, proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular e mitocondrial foram consideradas como superexpressos em tumores de cabeça e pescoço. Estes dados indicam que várias vias celulares estão envolvidas no processo de tumorigênese e sugerem uma abordagem de estratégia múltipla para combater a doença (Chen *et al.*, 2004).

1.2. Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K)

O grupo de ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNP)s constitui uma grande família de proteínas, com aproximadamente 20 membros (Swanson e Dreyfuss, 1988; Matunis, Michael e Dreyfuss, 1992; Dreyfuss, Kim e Kataoka, 2002; Leopoldino *et al.*, 2007). Uma das proteínas mais estudadas é a hnRNP K, uma proteína de 65 quilodaltons (kDa) que contém três domínios homólogos K (KH) onde se ligam moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) (Siomi *et al.*, 1993), e um domínio de interação proteica (KI) responsável pela associação de hnRNP K com outras proteínas (Makeyev e Liebhaber, 2002), que

contém sítios de ancoragem ricos em prolina que interagem, por exemplo, com domínios SH3 da família de quinases Src (Van Seuningen *et al.*, 1995).

A hnRNP K é uma proteína localizada em múltiplos compartimentos subcelulares, como núcleo, citoplasma e mitocôndria (Ostrowski *et al.*, 2002; Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004; Mikula *et al.*, 2006). A diversidade das interações de hnRNP K sugere seu envolvimento em vários processos que compõem a expressão gênica, como remodelagem de cromatina, transcrição, *splicing*, tradução e estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) (Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004).

Vários trabalhos têm mostrado aumento na expressão de hnRNP K em diversos tipos de câncer e o seu papel na regulação da tumorigênese. Esta atividade tumorigênica de hnRNP K parece ser conferida pela sua habilidade de aumentar a proliferação celular (Lynch *et al.*, 2005), seus efeitos antiapoptóticos (Chen *et al.*, 2009), potencial clonogênico (Notari *et al.*, 2006) e capacidade de metástases (Inoue *et al.*, 2007).

Elementos localizados na região promotora de genes importantes na tumorigênese tais como *c-MYC*, *c-SCR*, *BRCA*, e timidina quinase são reconhecidos pela hnRNP K (Michelotti *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2005). Além disto, o gene *BCL-X*, que codifica uma proteína envolvida na regulação de apoptose, possui duas isoformas produzidas por *splicing*, *BCL-X_L* e *BCL-X_S*, com atividade anti-apoptótica e pró-apoptótica, respectivamente. Recentemente, hnRNP K foi descrita como participante da regulação negativa da produção da isoforma pro-apoptótica *BCL-X_S* em células sob estímulo de insulina (Revil *et al.*, 2009).

hnRNP K pode regular a expressão da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) por meio de ligação a sequências regulatórias denominadas acentuadoras de *splicing* exônico (*exonic splicing enhancers* - ESE) ou silenciadoras de *splicing* exônico (*exonic splicing silencers* - ESS). Sob condições de privação de nutrientes, a expressão de hnRNP K é aumentada, o que leva ao aumento de sua ligação à região ESS inibindo o *splicing* de transcritos de G6PD e o acúmulo de seu RNAm (Cyphert *et al.*, 2013). A enzima G6PD participa de várias vias de biossíntese, como a síntese de ácidos graxos, colesterol e aminoácidos, e na manutenção dos níveis de glutatona reduzida. Além disso, regula a taxa de conversão de glicose à ribose-5-fosfato, precursor para a biossíntese de nucleotídeos (Salati e Amir-Ahmady, 2001).

A proteína hnRNP K possui também capacidade de ligar ao promotor do gene do fator de iniciação da tradução eucariótico 4E (*eIF4E*) e ativar sua transcrição. Este fator desempenha importante papel na proliferação celular e sua superexpressão ocorre em vários tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço, mama, cólon, pulmão e vesícula biliar. A transcrição de *eIF4E* apresenta-se aumentada quando ambos *c-Myc* e hnRNP K estão superexpressos, sugerindo que a proteína hnRNP K pode cooperar com outras proteínas na indução de genes envolvidos no crescimento do tumor (Lynch *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram que o aumento da proteína hnRNP K em câncer de próstata é mais evidente na matriz nuclear e é crucial para ativação de várias vias de sinalização envolvidas na carcinogênese (Barboro *et al.*, 2009). Em pacientes com carcinoma de pâncreas foi observado acúmulo citoplasmático de hnRNP K associado a *p53* mutante (Zhou *et al.*, 2010). Níveis alterados de expressão de hnRNP K foram descritos em pacientes com carcinoma colorretal, e seu acúmulo no citoplasma foi associado a pior prognóstico nesse tipo de neoplasia (Carpenter *et al.*, 2006). Em câncer de cabeça e pescoço também foi verificada associação significativa entre a expressão de hnRNP K e prognóstico (Matos-Silva, 2009; Matta *et al.*, 2009). Em carcinoma nasofaríngeo, a localização citoplasmática aberrante de hnRNP K foi associada com menor sobrevida global e sobrevida livre de metástase (Chen *et al.*, 2008). De acordo com Inoue e cols. (Inoue *et al.*, 2007), seu acúmulo no citoplasma está envolvido na migração celular/metástase e aumenta a resistência das células de carcinoma nasofaríngeo a apoptose induzida por hipóxia.

hnRNP K foi identificada como alvo de degradação proteossomal dependente da *murine double minute 2* (MDM2/HDM2), uma proteína que controla a atividade e o nível da proteína *p53* em células não danificadas (Moumen *et al.*, 2005). MDM2 pode atuar como uma ubiquitina ligase E3 para degradar *p53*. Níveis elevados de MDM2 podem inativar as funções de apoptose e parada do ciclo celular de *p53*, como acontece em mutações ou deleções de *p53*, eventos comuns na gênese de muitos tipos de tumores (Iwakuma e Lozano, 2003). Em resposta ao dano no DNA, a regulação negativa de *p53* por MDM2 é inibida, o que leva a estabilização e ativação de *p53*; *p53* e hnRNP K são recrutadas para os promotores de genes responsivos a *p53* de um modo mutuamente dependente. Acredita-se que a hnRNP K, servindo como um co-fator para *p53*, facilita a montagem e/ou estabilidade do complexo

promotor de p53 (Moumen *et al.*, 2005) e ajuda a proteína p53 a buscar sítios alvos no genoma, um evento chave na ativação gênica (Prives e Hall, 1999).

O papel da hnRNP K no desenvolvimento e na progressão das neoplasias tem sido bem documentado na literatura, mas ainda existem várias lacunas no conhecimento sobre suas diversas funções. Um estudo de proteômica, por exemplo, mostra uma ampla interação e envolvimento da proteína hnRNP K com proteínas mitocondriais (Mikula *et al.*, 2006), mas pouco se sabe sobre o seu papel na atividade mitocondrial. A ação da proteína hnRNP K no nível da proteína mitocondrial desacopladora 2 (UCP2) foi demonstrada de modo associado a insulina (Ostrowski *et al.*, 2004a). Outro fato importante é que a hnRNP K interage *in vivo* com diversos RNAs nucleares e mitocondriais codificantes e não-codificantes (Klimek-Tomczak *et al.*, 2004), podendo integrar sinais de várias cascatas de sinalização no núcleo, citoplasma e mitocôndria, e esta ligação proteína-RNA é estimulada pela insulina (Dzwonek, Mikula e Ostrowski, 2006). Com base nestas evidências, a investigação do papel de hnRNP K na mitocôndria e em sua função é essencial.

1.3. Mitocôndria

Mitocôndrias são organelas presentes em células eucarióticas superiores e desempenham diversas funções relacionadas à produção de energia e manutenção da vida celular. A principal cascata bioquímica que acontece nessa organela é a fosforilação oxidativa, uma série de reações coordenadas de oxidação e redução, catalisadas por cinco subunidades enzimáticas transportadoras de elétrons incorporadas à membrana mitocondrial interna (complexos I-IV e F₁F₀-ATP sintase) e dois fatores solúveis (citocromo c e coenzima Q10), que funcionam como translocadores de prótons para o espaço intermembrana, resultando na geração de um gradiente eletroquímico que é dissipado de forma controlada pela ATP sintase para gerar a maior parte do ATP intracelular (Reichert e Neupert, 2004). Vias metabólicas adicionais que ocorrem dentro da mitocôndria incluem o ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs), β -oxidação de ácidos graxos, biossíntese do heme, esteroidogênese, metabolismo de certos aminoácidos, os passos iniciais do ciclo da uréia e algumas reações de gliconeogênese e cetogênese (Galluzzi *et al.*, 2010).

Alterações nos padrões normais dos componentes mitocondriais podem ocasionar disfunções nessas organelas e conseqüentemente desencadear doenças como o câncer. Em 2000, Hanahan e Weinberg postularam os *Hallmarks of Cancer* (Hanahan e Weinberg, 2000), que caracterizam a maioria das neoplasias humanas: auto-suficiência em sinais de crescimento; insensibilidade para sinais de inibição de crescimento; evasão da morte celular programada; potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada; capacidade de invadir tecidos e criar metástases. Mais recentemente, foram incluídas duas características cruciais para a aquisição das anteriores, a instabilidade genômica e a inflamação promovida pelo tumor, e outras características emergentes, como a reprogramação do metabolismo energético e o escape do sistema imune (Hanahan e Weinberg, 2011). É importante ressaltar que várias dessas características podem ser direta ou indiretamente ligadas à mitocôndria (Galluzzi *et al.*, 2010).

O DNA mitocondrial humano (DNAMt) é uma molécula de dupla fita circular com 16,6 quilobases (kb) que codifica 13 polipeptídeos, que inclui sete subunidades do complexo I da cadeia respiratória (*ND1-ND6, ND4L*), uma subunidade do complexo III (*CYTB*), três subunidades do complexo IV (*COI-COIII*), e duas subunidades do complexo V (*ATP6 e ATP8*); 22 RNA transportadores e dois RNA ribossomais (Attardi e Schatz, 1988). O DNAMt é mais vulnerável a lesões oxidativas que o DNA nuclear, por estar mais exposto a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas como subprodutos do processo da fosforilação oxidativa; isso pode ser responsável pelo aumento das mutações no DNAMt frequentemente observadas em câncer (Chatterjee, Mambo e Sidransky, 2006). Além disso, uma série de alterações metabólicas associadas com função mitocondrial foram observadas em carcinomas, como aumento da gliconeogênese e glicólise, aumento da expressão de proteínas transportadoras de glicose, redução da oxidação de piruvato e aumento da produção de ácido láctico, redução na oxidação de ácidos graxos, modificação no metabolismo do aminoácidos e aumento na atividade da via das pentoses fosfato (Chatterjee, Mambo e Sidransky, 2006).

Em tumores de cabeça e pescoço, estudos mostraram uma freqüência de mutações mitocondriais que variam de 21% a 51% (Lièvre *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007) e a maioria das mutações mitocondriais ocorrem durante ou após a transição do epitélio pré-neoplásico para carcinoma, indicando que estas alterações são um acontecimento tardio nesta doença (Mithani *et al.*, 2007).

1.4. Metabolismo energético no câncer

A observação de que células tumorais apresentavam diferenças no metabolismo energético comparadas com células normais originou a hipótese de Warburg (Warburg, 1956b). Otto Warburg observou que tecidos tumorais consumiam glicose em níveis mais altos que tecidos normais e criou a seguinte hipótese, conhecida como efeito Warburg (Warburg, 1966):

Cancer, above all other diseases, has countless secondary causes. But, even for cancer, there is only one prime cause. Summarized in a few words, is the replacement of the respiration of oxygen in normal body cells by a fermentation of sugar.

A alta taxa de glicólise aeróbica sob condições normais de oxigênio é devido a uma deficiência na respiração. De fato, a formação de ATP pela via glicolítica tem baixa eficiência, porém acontece de forma mais rápida que a fosforilação oxidativa. Essa geração rápida de energia é benéfica para células em proliferação, pois também fornece intermediários glicolíticos necessários para a biossíntese de ácidos nucleicos, lipídeos e aminoácidos (Deberardinis *et al.*, 2008).

O aumento da glicólise é acompanhado pela produção aumentada de lactato, com a consequente acidificação do microambiente tumoral. Sugere-se que esta acidose láctica local serve para degradar o estroma que circunda o tumor, induzindo a apoptose e necrose de células não malignas (Gillies e Gatenby, 2007). No entanto, o metabolismo tumoral é muito complexo para ser explicado por um simples fenótipo metabólico (Nakajima e Van Houten, 2013). Recentes estudos ressaltam a complexidade do metabolismo tumoral, propondo um modelo de simbiose metabólica no microambiente tumoral, em que duas populações metabolicamente distintas se relacionam - quer sejam entre células tumorais ou entre células do tumor e do estroma - e os produtos finais da glicólise de uma serve como metabólitos para a fosforilação oxidativa da segunda população (Sonveaux *et al.*, 2008; Bonuccelli *et al.*, 2010; Migneco *et al.*, 2010).

Embora alguns tipos de câncer tenham uma preferência pela glicose como fonte primária de energia (Sandulache *et al.*, 2011), o consumo de glutamina tem sido apontado como essencial para o crescimento tumoral em alguns tipos de câncer (Wise e Thompson, 2010). O catabolismo da glutamina tem um duplo propósito, de gerar NADPH para funções biossintéticas pela glutaminólise a lactato e fornecer esqueletos de carbono na forma de oxaloacetato (Deberardinis *et al.*, 2008).

O papel da hipóxia no microambiente tumoral também merece destaque. A maioria dos tumores sólidos contém áreas pobremente oxigenadas (Höckel e Vaupel, 2001). A resposta a limitação de oxigênio é mediada em parte pela proteína fator indutor de hipóxia (HIF)-1 α , que desencadeia uma série de eventos conduzindo a um rearranjo metabólico, incluindo o aumento da expressão de transportador de glicose 1 (Glut-1), aumento da atividade de enzimas glicolíticas, além de limitar a fosforilação oxidativa, induzindo a expressão de piruvato desidrogenase quinase (PDK1), que leva à redução no consumo de oxigênio e na produção de piruvato, dois substratos importantes para a fosforilação oxidativa (Papandreou *et al.*, 2006).

Alterações genéticas específicas em proteínas chave podem também alterar o metabolismo (Figura 1). Mutações que ativem Akt e inativem p53 são associadas com glicólise aumentada (Nakajima e Van Houten, 2013). O oncogene Akt tem sido descrito como regulador da proliferação e sobrevivência celular (Cheng *et al.*, 1997). A via fosfatidilinositol 3-quinase está frequentemente ativada no tumor, e sua ativação através de Akt aumenta a captação de glicose e sua utilização (Weinberg e Chandel, 2009). A proteína supressora tumoral p53 tem sido mostrada controlando importantes funções metabólicas. p53 não mutada estimula a fosforilação oxidativa pela regulação da proteína síntese de citocromo c oxidase 2 (SCO2). SCO2 é importante para a regulação da citocromo c oxidase, principal local de utilização do oxigênio em células eucarióticas. A diminuição da expressão de p53 resultou na diminuição da expressão da proteína SCO2 e no consumo reduzido de oxigênio, imitando o fenótipo de células deficientes em p53 (Matoba *et al.*, 2006). Além disso, p53 controla a proteína reguladora de glicólise e apoptose induzida por p53 (TIGAR), assim sob condições em que há a perda de função de p53 a regulação diminuída de TIGAR pode estar associada com o aumento de glicólise (Bensaad *et al.*, 2006).

Myc também está envolvida na biogênese mitocondrial. Por exemplo, c-myc é conhecido por ativar a maioria dos genes de enzimas glicolíticas, incluindo lactato desidrogenase-A (LDHA) e GLUT1, no intuito de melhorar tanto a produção de lactato quanto a absorção de glicose (Shim *et al.*, 1997; Osthus *et al.*, 2000). Curiosamente, tem sido sugerido que HIF-1 α colabora com c-myc na promoção do fenótipo glicolítico quando c-myc está superexpresso, por meio da indução cooperativa de PDK1, hexoquinase II (HK-II) e LDHA (Dang *et al.*, 2008).

superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, EROs acumulam-se, podendo inclusive induzir mais EROs por causar mutação no genoma mitocondrial, dando origem a transportadores de elétrons ineficientes (Penta *et al.*, 2001; Indo *et al.*, 2007). Além disso, EROs tem sido associado ao aumento da sobrevivência celular no câncer, por inibir vias que causam apoptose (Clerkin *et al.*, 2008).

Com base nestas informações, neste trabalho propôs-se identificar novos ligantes de hnRNP K e caracterizar o papel da proteína hnRNP K no metabolismo energético de células tumorais.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Entender o papel da proteína hnRNP K na bioenergética celular e identificar novas proteínas ligantes da hnRNP K com impacto na mitocôndria.

Objetivos específicos

1. Avaliar o papel de hnRNP K na bioenergética celular tumoral por meio dos seguintes parâmetros: potencial de membrana mitocondrial, níveis intracelulares de ATP, nível de lactato no meio extracelular, consumo de oxigênio e captação de glicose em células não tumorais superexpressando a proteína e em linhagens tumorais com silenciamento de hnRNP K.
2. Identificar novas proteínas que interagem com hnRNP K em células não tumorais usando estratégias experimentais de co-imunoprecipitação, proteômica e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).
3. Validar novas interações hnRNP K-proteína com potencial ação na atividade mitocondrial utilizando técnica de *Western blotting*.

6. CONCLUSÕES

O dados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

1. A proteína hnRNP K influencia o metabolismo, favorecendo a glicólise em relação à fosforilação oxidativa;
2. Novos potenciais ligantes da hnRNP K foram identificados por co-
imunoprecipitação e espectrometria de massas, sendo dois deles validados por *Western blotting*: PSF e PTCD3;
3. hnRNP K regula o nível e atividade dos complexos I, II e V da cadeia respiratória mitocondrial e a interação hnRNP K-PTCD3 pode ter um importante papel nesta ação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of mitochondria. **Annu Rev Cell Biol**, v. 4, p. 289-333, 1988. ISSN 0743-4634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461720> >.

BARBORO, P. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Br J Cancer**, v. 100, n. 10, p. 1608-16, May 19 2009. ISSN 1532-1827 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19401687 >.

BENSAAD, K. et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 107-20, Jul 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839880> >.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem Biophys**, v. 303, n. 2, p. 474-82, Jun 1993. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390225> >.

BOMSZTYK, K.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J. hnRNP K: one protein multiple processes. **Bioessays**, v. 26, n. 6, p. 629-38, Jun 2004. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170860> >.

BONUCCELLI, G. et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. **Cell Cycle**, v. 9, n. 17, p. 3506-14, Sep 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818174> >.

BRIZEL, D. M. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 51, n. 2, p. 349-53, Oct 2001. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567808> >.

CARDINALI, M. et al. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 98-103, Mar 29 1995. ISSN 0020-7136 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7705939 >.

CARPENTER, B. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 7, p. 921-927, Oct 2006. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241079700022 >.

CARVALHO, P. C. et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 944-9, Apr 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311825> >.

CARVALHO, P. C.; YATES III, J. R.; BARBOSA, V. C. Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 13, p. Unit 13.13.1-15, Jun 2010. ISSN 1934-340X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521246> >.

CHATTERJEE, A.; MAMBO, E.; SIDRANSKY, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4663-74, Aug 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892080> >.

CHEN, G. I.; GINGRAS, A. C. Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. **Methods**, v. 42, n. 3, p. 298-305, Jul 2007. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532517> >.

CHEN, J. et al. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. **Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 2465-75, Aug 2004. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15274141> >.

CHEN, L. C. et al. Heterogeneous ribonucleoprotein K and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for nasopharyngeal carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 12, p. 3807-3813, Jun 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256779100026 >.

_____. Thymidine phosphorylase mRNA stability and protein levels are increased through ERK-mediated cytoplasmic accumulation of hnRNP K in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncogene**, v. 28, n. 17, p. 1904-15, Apr 2009. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330019> >.

CHENG, J. Q. et al. Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and

oncogenesis. **Oncogene**, v. 14, n. 23, p. 2793-801, Jun 1997. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190895> >.

CLERKIN, J. S. et al. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 266, n. 1, p. 30-6, Jul 2008. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372105> >.

COOK, C. C. et al. Consumption of oxygen: a mitochondrial-generated progression signal of advanced cancer. **Cell Death Dis**, v. 3, p. e258, 2012. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22258408> >.

CUEZVA, J. M. et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6674-81, Nov 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438266> >.

CURADO, M. P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr Opin Oncol**, v. 21, n. 3, p. 194-200, May 2009. ISSN 1531-703X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363341> >.

CYPHERT, T. J. et al. Starvation actively inhibits splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA via a bifunctional ESE/ESS element bound by hnRNP K. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 9, p. 905-15, Sep 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631859> >.

DANG, C. V. et al. The interplay between MYC and HIF in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 1, p. 51-6, Jan 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046334> >.

DAVIES, S. M. K. et al. Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. **Febs Letters**, v. 583, n. 12, p. 1853-1858, Jun 2009. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267797800007 >.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metab**, v. 7, n. 1, p. 11-20, Jan 2008. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177721> >.

DENG, S. et al. UCP2 inhibits ROS-mediated apoptosis in A549 under hypoxic conditions. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30714, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292025> >.

DHUP, S. et al. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 10, p. 1319-30, 2012. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360558> >.

DIMROTH, P.; KAIM, G.; MATTHEY, U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. **J Exp Biol**, v. 203, n. Pt 1, p. 51-9, Jan 2000. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600673> >.

DREYFUSS, G.; KIM, V. N.; KATAOKA, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 3, p. 195-205, Mar 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994740> >.

DZWONEK, A.; MIKULA, M.; OSTROWSKI, J. The diverse involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in mitochondrial response to insulin. **FEBS Lett**, v. 580, n. 7, p. 1839-45, Mar 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16519889> >.

FEICHTINGER, R. G. et al. Low aerobic mitochondrial energy metabolism in poorly- or undifferentiated neuroblastoma. **BMC Cancer**, v. 10, p. 149, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398431> >.

FISCHER, J. E. S. et al. Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. **J Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 1018-27, Mar 2010. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083244> >.

FORASTIERE, A. et al. Head and neck cancer. **N Engl J Med**, v. 345, n. 26, p. 1890-900, Dec 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756581> >.

FUKUDA, T. et al. hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. **Genes Cells**, v. 14, n. 2, p. 113-28, Feb 2009. ISSN 1365-2443. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170760> >.

FURTADO, C. M. et al. Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30462, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347377> >.

GALLUZZI, L. et al. Mitochondrial gateways to cancer. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 1, p. 1-20, Feb 2010. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698742> >.

GILLIES, R. J.; GATENBY, R. A. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 3, p. 251-7, Jun 2007. ISSN 0145-479X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624581> >.

GIOANNI, J. et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 24, n. 9, p. 1445-55, Sep 1988. ISSN 0277-5379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3181269> >.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**, v. 36, n. 1, p. 59-74, Jul 1977. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304> >.

GUPPY, M.; GREINER, E.; BRAND, K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. **Eur J Biochem**, v. 212, n. 1, p. 95-9, Feb 1993. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8444168> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HAQUE, M. E. et al. Contacts between mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and ribosomal proteins in the small subunit. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 12, p. 1779-1784, Dec 2011. ISSN 1570-9639. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298363200021 >.

HE, Q. Y. et al. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 271-8, Jan 2004. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730689> >.

HÖCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 4, p. 266-76, Feb 2001. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181773> >.

INDO, H. P. et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1-2, p. 106-18, 2007 Feb-Apr 2007. ISSN 1567-7249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307400> >.

INOUE, A. et al. Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: identification of hnRNP-K as a potential target for metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 21, p. 8983-8, May 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483488> >.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G. MDM2, an introduction. **Mol Cancer Res**, v. 1, n. 14, p. 993-1000, Dec 2003. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707282> >.

JEONG, D. W. et al. Modification of glycolysis affects cell sensitivity to apoptosis induced by oxidative stress and mediated by mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 4, p. 984-91, Jan 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706639> >.

JIANG, L. et al. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. **Oral Oncol**, v. 45, n. 11, p. e204-7, Nov 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631575> >.

KIM, J. H. et al. Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. **Journal of Molecular Biology**, v. 298, n. 3, p. 395-405, May 2000. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086985100005 >.

KLIMEK-TOMCZAK, K. et al. Characterization of hnRNP K protein-RNA interactions. **J Mol Biol**, v. 342, n. 4, p. 1131-41, Sep 2004. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351640> >.

KOC, E. C. et al. Identification and characterization of CHCHD1, AURKAIP1, and CRIF1 as new members of the mammalian mitochondrial ribosome. **Front Physiol**, v. 4, p. 183, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908630> >.

KOC, E. C.; SPREMULLI, L. L. RNA-binding proteins of mammalian mitochondria. **Mitochondrion**, v. 2, n. 4, p. 277-91, Mar 2003. ISSN 1567-7249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120328> >.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472-82, Jun 2008. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538731> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Reactive oxygen species production by mitochondria. **Methods Mol Biol**, v. 554, p. 165-81, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513674> >.

LEOPOLDINO, A. M. et al. Sequence and transcriptional study of HNRPK pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms. **Genome**, v. 50, n. 5, p. 451-462, May 2007. ISSN 0831-2796. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248591300004 >.

_____. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncol**, Jun 2012. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068> >.

LIÈVRE, A. et al. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. **Br J Cancer**, v. 94, n. 5, p. 692-7, Mar 2006. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495928> >.

LOBO, N. A. et al. The biology of cancer stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 675-99, 2007. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645413> >.

LYNCH, M. et al. hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 15, p. 6436-53, Aug 2005. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024782> >.

MAILLOUX, R. J.; HARPER, M. E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 6,

p. 1106-15, Sep 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762777> >.

MAKEYEV, A. V.; LIEBHABER, S. A. The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. **RNA**, v. 8, n. 3, p. 265-78, Mar 2002. ISSN 1355-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003487> >.

MARBACH, E. P.; WEIL, M. H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. **Clin Chem**, v. 13, n. 4, p. 314-25, Apr 1967. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6036716> >.

MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650-3, Jun 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728594> >.

MATOS-SILVA, F. A. **Estudos das proteínas hnRNP K, SET e MARK3 como potenciais marcadores de prognóstico em câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC)**. 2009. (Dissertação (Mestrado)). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

MATTA, A. et al. Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1398-406, Sep 2009. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19548310> >.

MATUNIS, M. J.; MICHAEL, W. M.; DREYFUSS, G. Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 164-71, Jan 1992. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729596> >.

MICHELOTTI, E. F. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 5, p. 2350-60, May 1996. ISSN 0270-7306 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8628302 >.

MIGNECO, G. et al. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. **Cell Cycle**, v. 9, n. 12, p. 2412-22, Jun 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562527> >.

MIKULA, M. et al. Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. **Proteomics**, v. 6, n. 8, p. 2395-2406, Apr 2006. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237398700009 > .

MINISTÉRIO DA SAÚDE, I. N. D. C. I. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2013. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> > .

MITHANI, S. K. et al. Mitochondrial mutations are a late event in the progression of head and neck squamous cell cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4331-5, Aug 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671113> > .

MOORE, C. B. et al. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. **Methods Mol Biol**, v. 629, p. 141-58, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20387148> > .

MOUMEN, A. et al. ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. **Cell Cycle**, v. 12, n. 4, p. 698-704, Feb 2013. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343766> > .

_____. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. **Cell**, v. 123, n. 6, p. 1065-78, Dec 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360036> > .

NAKAJIMA, E. C.; VAN HOUTEN, B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. **Mol Carcinog**, v. 52, n. 5, p. 329-37, May 2013. ISSN 1098-2744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228080> > .

NOTARI, M. et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2507-2516, Mar 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236014200047 > .

ORTEGA, A. D. et al. Glucose avidity of carcinomas. **Cancer Lett**, v. 276, n. 2, p. 125-35, Apr 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790562> > .

OSTHUS, R. C. et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21797-800, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823814> > .

OSTROWSKI, J. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. **J Biol Chem**, v. 279, n. 52, p. 54599-609, Dec 24 2004a. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15485813 >.

_____. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54599-54609, Dec 2004b. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225793600086 >.

_____. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein associates with multiple mitochondrial transcripts within the organelle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6303-6310, Feb 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173989200081 >.

PAPANDREOU, I. et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. **Cell Metab**, v. 3, n. 3, p. 187-97, Mar 2006. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517406> >.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078> >.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 2, p. 97-110, Apr 2004. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158766> >.

PENTA, J. S. et al. Mitochondrial DNA in human malignancy. **Mutat Res**, v. 488, n. 2, p. 119-33, May 2001. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344040> >.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 301-11, 2004. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220539> >.

PRIVES, C.; HALL, P. A. The p53 pathway. **J Pathol**, v. 187, n. 1, p. 112-26, Jan 1999. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341712> >.

RAGIN, C. C.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S. M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. **J Dent Res**, v. 86, n. 2, p. 104-14, Feb 2007. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251508> >.

REICHERT, A. S.; NEUPERT, W. Mitochondriomics or what makes us breathe. **Trends Genet**, v. 20, n. 11, p. 555-62, Nov 2004. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475115> >.

REVIL, T. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of the pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. **J Biol Chem**, Jun 11 2009. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19520842 >.

RITCHIE, S. A. et al. Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 5, p. 1502-13, Mar 1 2003. ISSN 1362-4962 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12595559 >.

SALATI, L. M.; AMIR-AHMADY, B. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Annu Rev Nutr**, v. 21, p. 121-40, 2001. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375432> >.

SAMUDIO, I. et al. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. **Cancer Res**, v. 68, n. 13, p. 5198-205, Jul 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593920> >.

SANDULACHE, V. C. et al. Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. **Cancer**, v. 117, n. 13, p. 2926-38, Jul 2011. ISSN 1097-0142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692052> >.

SHIM, H. et al. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 13, p. 6658-63, Jun 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192621> >.

SHNYREVA, M. et al. Interaction of two multifunctional proteins - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15498-15503, May 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087128300097 >.

SIOMI, H. et al. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. **Nucleic Acids Res**, v. 21, n. 5, p. 1193-8, Mar 1993. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464704> >.

SONVEAUX, P. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 12, p. 3930-42, Dec 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033663> >.

STURGIS, E. M. International head and neck cancer epidemiology consortium: Update no. 14. **Head Neck**, Nov 2013. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243765> >.

SWANSON, M. S.; DREYFUSS, G. Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 5, p. 2237-41, May 1988. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3386636> >.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 51, n. 3, p. 187-200, 2005 May-Jun. ISSN 1056-8719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862464> >.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 2003. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561818> >.

VAN SEUNINGEN, I. et al. The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26976-85, Nov 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592945> >.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, v. 124, n. 3215, p. 269-70, Aug 1956a. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13351639> >.

_____. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 1956b. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683> >.

WARBURG, O. H. **The prime cause and prevention of cancer - Part 1** 1966. Disponível em: < <http://healingtools.tripod.com/primecause1.html/> >.

WEINBERG, F.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial metabolism and cancer. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1177, p. 66-73, Oct 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845608> >.

WISE, D. R.; THOMPSON, C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 8, p. 427-33, Aug 2010. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570523> >.

XU, R. H. et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. **Cancer Res**, v. 65, n. 2, p. 613-21, Jan 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695406> >.

YAMAMOTO, N. et al. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. **Anal Biochem**, v. 351, n. 1, p. 139-45, Apr 2006. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442489> >.

ZANCAN, P. et al. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. **Mol Genet Metab**, v. 100, n. 4, p. 372-8, Aug 2010. ISSN 1096-7206. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483646> >.

ZHOU, R. et al. Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53. **Int J Cancer**, v. 126, n. 2, p. 395-404, Jan 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609950> >.

ZHOU, S. et al. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 18, p. 7540-5, May 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456604> >.

ZHOU, Y. et al. Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. **Cancer Res**, v. 72, n. 1, p. 304-14, Jan 2012. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084398> >.