



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CARLOS HERMANN SCHAAL

Assinatura Bioenergética em Tumores de Próstata de Baixo
Grau, Com e Sem Recorrência Bioquímica.

CAMPINAS
2020

CARLOS HERMANN SCHAAL

Assinatura Bioenergética em Tumores de Próstata de Baixo Grau, Com e Sem Recorrência Bioquímica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiopatologia Cirúrgica.

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER EDUARDO MATHEUS

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO CARLOS HERMANN SCHAAL, E ORIENTADA PELO PROF. DR. WAGNER EDUARDO MATHEUS.

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Schaal, Carlos Hermann, 1962-
Sch11a Assinatura bioenergética em tumores de próstata de baixo grau, com e sem recorrência bioquímica / Carlos Hermann Schaal. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Wagner Eduardo Matheus.
Coorientador: Wagner José Fávoro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da próstata. 2. Metabolismo energético. 3. Bioenergética. 4. Neoplasias - Metabolismo. I. Matheus, Wagner Eduardo. II. Fávoro, Wagner José, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bioenergetic signature of low-grade prostate cancer with and without biochemical recurrence

Palavras-chave em inglês:

Prostatic neoplasms

Energy metabolism

Bioenergetics

Neoplasms, Metabolism

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Wagner Eduardo Matheus [Orientador]

Rodolfo Borges dos Reis

Marcelo Lopes de Lima

Data de defesa: 10-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3768-6379>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1449269908353690>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CARLOS HERMANN SCHAAL

ORIENTADOR: WAGNER EDUARDO MATHEUS

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. WAGNER EDUARDO MATHEUS

2. PROF. DR. RODOLFO BORGES DOS REIS

3. PROF. DR. MARCELO LOPES DE LIMA

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 10/11/2020

DEDICATÓRIA:

Dedico esta tese de mestrado a toda a minha família, meus pais, minha esposa e minhas filhas, pois me apoiaram irrestritamente em todas as minhas iniciativas profissionais e acadêmicas. Quero dedicar este mestrado também aos meus colegas de profissão, meus colegas urologistas que tanto me apoiaram quando eu tive que me ausentar do nosso trabalho conjunto, me dando todo o suporte necessário. Um agradecimento especial ao Dr. Renato Prado Costa, que foi o urologista que inaugurou o serviço de urologia do hospital Amaral Carvalho e tanto batalhou para que houvesse o maior progresso científico e acadêmico do nosso serviço e tanto me estimulou e apoiou esta realização.

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer imensamente o professor Dr. Wagner José Fávaro, que além de ser meu co-orientador se tornou meu amigo nestes anos de convivência. Desde de meados de 2014 quando ele nos procurou e viemos a nos conhecer, através de meu sócio e amigo Fernando Cesar Sala, iniciamos um diálogo que tinha como objetivo a criação de trabalhos científicos. Desde então o Dr. Guilherme de Almeida Prado Costa iniciou seu trabalho de mestrado no estudo do metabolismo do câncer de bexiga. Com isso eu também me entusiasmei e comecei a fazer o mestrado com o estudo metabólico do câncer de próstata. Aproveito também para dar um agradecimento muito especial ao professor Dr. Wagner Matheus, amigo de longa data, que muito me apoiou, orientou e ajudou na execução deste estudo do mestrado. Agradeço também meus amigos e colegas de trabalho, Renato Prado Costa, Fernando Cesar Sala, André Pereira Vanni e Guilherme de Almeida Prado Costa que me deram todo apoio para a realização deste enorme desafio profissional e pessoal. Durante os numerosos períodos de ausência no trabalho eles me deram toda a cobertura necessária. E por fim quero agradecer

especialmente a minha esposa, Maria Clara e minhas filhas médicas, Luísa e Renata, por darem todo o suporte necessário para que esta realização se concretizasse.

RESUMO

Introdução: A neoplasia maligna da próstata é o câncer mais comum no sexo masculino, excetuando-se câncer de pele. Mesmo com o diagnóstico de câncer de próstata, muitos destes tumores são de baixa agressividade, não necessitando um tratamento ativo, apenas um acompanhamento, também chamado de “vigilância ativa”. A vigilância ativa, significa simplesmente a não intervenção ou a postergar o tratamento, de acordo com a velocidade da progressão do câncer. O principal critério para se indicar a vigilância ativa é o grau histológico do tumor. Denominado grau de Gleason, este varia de baixo grau (grau 6), de grau intermediário (grau 7) e de alto grau (de 8 a 10).

Mas observamos em alguns pacientes com câncer de baixo grau (grau 6), submetidos a cirurgia radical, em nosso serviço, em uma época que o conceito de vigilância ativa ainda não estava estabelecida, embora o tumor estivesse totalmente circunscrito à glândula retirada, eles apresentaram recorrência tumoral. Isto é, embora de baixo grau, a neoplasia apresentou um comportamento mais agressivo, semelhante às neoplasias de grau intermediário ou alto.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a assinatura bioenergética do câncer de próstata de baixo grau (grau 6 de Gleason), com e sem recorrência bioquímica (elevação do PSA > 0,2ng/ml), após prostatectomia radical. Também foi desenvolver um índice celular bioenergético, que possa fornecer mais dados para uma melhor decisão na prática clínica, para a condução do caso.

Material e Métodos: Foram estudadas amostras de câncer de próstata de dois grupos de pacientes (20 pacientes em cada grupo).

Grupo 1: escore de Gleason 6 (3+3) em prostatectomia radical, por tumor localizado, sem recorrência bioquímica em 5 anos (PSA pós-op. < 0,2ng/ml). Grupo 2: escore de Gleason 6 (3+3) em prostatectomia radical, por tumor localizado, com recorrência bioquímica (PSA pós-op. > 0,2ng/ml) entre 2 a 5 anos após a cirurgia. As amostras foram submetidas aos estudos imunohistoquímicos para enzimas metabólicas. O Índice Bioenergético Celular (BEC index) foi avaliado pela β -F1-ATPase/Hsp60: razão de pontuação imunorreativa.

Resultados e Conclusão: Os resultados mostraram que no grupo 1 não ocorreu uma redução na marcação para β -F1-ATPase, o que é compatível com uma não-redução da fosforilação oxidativa. Já no grupo 2, houve uma redução β -F1-ATPase levando a uma limitação da fosforilação oxidativa da mitocôndria (OXPHOS). Adicionalmente, no grupo 2 houve um aumento na regulação da via glicolítica (GLUT 1 e DHL) e diminuição da imunorreatividade da OXPHOS (HADHSC, CS E PDH). O Índice Bioenergético Celular (BEC) foi significativamente reduzido no grupo 2 em relação ao grupo 1, dando uma assinatura bioenergética para esses tumores.

Palavras Chave: Câncer de próstata, metabolismo energético, bioenergia celular, metabolismo do câncer

ABSTRACT

The goal for this study was to analyze the bioenergetic signature of low-grade prostate cancer with or without biochemical recurrence (PSA<0,2ng/ml and PSA>0,2ng/ml), after radical prostatectomy. Simultaneously we established a bioenergetic cellular (BEC) index that might determine more data for an optimal decision-making in a clinical context. We investigated prostate samples from 2 groups (20 patients in each): Group 1: Gleason score 6 (3+3) in Radical Prostatectomy (RP) and no biochemical recurrence (BR) > 5 years after surgery (PSA<0,2ng/ml); Group 2: Gleason score 6 (3+3) and BR 2-5 years after RP (PSA>0,2ng/ml). Immunohistochemical analyses for metabolic enzymes was performed in every sample. BEC index was predicted by β -F1-ATPase/Hsp60: immunoreactivities score ratio. The results indicated no decrease in the labeling for β -F1-ATPase in Group 1, which is compatible with suppression of the mitochondrial proliferation program. On the other hand, Group 2 did show a decrease in the specific regulation for β -F1-ATPase, promoting limitation of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). Furthermore, Group 2 showed a surge in the regulation of glycolytic pathway (GLUT 1 and LDH), and reduced immunoreactivities for OXPHOS (HADHSC, CS and PDH). The BEC index was significantly diminished in Group 2 vs. Group 1, providing a bioenergetic signature for these tumors.

Keywords: Prostate cancer, Energy metabolism, Bioenergetic cellular, Cancer metabolism

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP: Câncer de Próstata

PSA: Antígeno Prostático Específico

ADP: Difosfato de Adenosina

ATP: Trifosfato de Adenosina

BEC: Índice Bioenergético Celular

OXPPOS: Fosforilação oxidativa

GLUT 1: Proteína transportadora de glicose 1

GLUT 3: Proteína transportadora de glicose 3

HADHSC: 3-Hidroxiacil-coA Desidrogenase

LDH-A: Lactato Desidrogenase A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13 a 25
2. MATERIAL E MÉTODO.....	26 a 29
3. RESULTADOS.....	29 a 37
4. DISCUSSÃO.....	37 a 40
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	42 a 45
7. ANEXOS.....	46 a 47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Próstata

1.2.

A próstata é uma glândula sexual masculina acessória composta de várias unidades alvéolo-tubulares. A manutenção da morfologia, da funcionalidade e da diferenciação das suas células são reguladas por andrógenos. A participação fundamental da glândula prostática no processo reprodutivo masculino, associada à grande incidência de lesões sobre a mesma tem causado um grande número de estudos sobre sua genética, endocrinologia e biologia celular (1,2). A neoplasia maligna da próstata, o câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais comum no homem, excetuando-se as neoplasias de pele (1). Atualmente nos Estados Unidos a projeção é que o risco de um cidadão desenvolver CaP é entre 17,4% a 20,6% dependendo da origem racial, pois é mais frequente em negros (3). Já o risco de morte pela doença atualmente é de menos de 3,0% para caucasianos e 4,7% para negros respectivamente. (1) O CaP raramente é diagnosticado em indivíduos abaixo de 50 anos (1%), porém estudos de autópsia mostram presença de CaP, em homens na faixa dos 50 anos, de 30% chegando a mais de 80% nos homens acima dos 80 anos. Embora os achados de autópsia sejam semelhantes em todo o mundo, a incidência de CaP clínico varia muito, sendo mais frequente em norte-americanos e em países nórdicos da Europa do que em países asiáticos. Esses achados evidenciam que existam outras causas ainda não conhecidas que venham a interferir na sua progressão, de câncer indolente para a sua forma clínica (3,4,5). Evidências epidemiológicas mostram haver

também um componente genético e familiar importante. Ter um ascendente de primeiro grau ou irmão com a doença, no mínimo dobra o risco de o paciente desenvolver a doença (6,7,8).

Os eventos relacionados ao desenvolvimento do CaP não estão plenamente elucidados. Atualmente a maioria dos autores aceitam que o CaP venha a se desenvolver a partir de alterações genéticas provocadas por um microambiente inflamatório (9).

Aproximadamente 95% dos CaP constituem-se de adenocarcinomas, sendo o restante constituído por sarcomas, carcinomas epidermóides e de células transicionais. Em 85% dos casos o CaP é multicêntrico, com áreas de maior e menor diferenciação celular (6). O sistema de graduação histológica e, por conseguinte de agressividade tumoral mais empregado, é o grau de Gleason. O grau de Gleason é dividido em 5 subtipos, sendo o grau 1 o mais bem diferenciado e o grau 5 o mais indiferenciado (9). Como o CaP é habitualmente heterogêneo, o que é ainda mais utilizado é a soma das duas notas do grau de Gleason, formando assim o “escore de Gleason”. Porém em cerca de 30% a 50% dos casos há uma discordância do escore de Gleason achado na biópsia e o achado final, na peça da prostatectomia radical (9). Um outro fenômeno encontrado é a variação dada ao escore de Gleason dependendo do patologista. Em que pese todos esses fatores, o achado do escore de Gleason tanto na biópsia quanto na peça da prostatectomia radical é muito importante na conduta médica a ser seguida (9, 10). Atualmente a “International Society Urologic Pathology” (ISUP) denomina os Gleason 6 de ISUP 1; Gleason 7 (3+4) de ISUP 2; Gleason (4+3) de ISUP 3; GLEASON 8 (4+4) de ISUP 4 e Gleason 9 (4+5) e Gleason 10 (5+5) de ISUP 5. Como a mudança foi só de denominação, não havendo qualquer mudança

nas características histológicas, neste estudo continuaremos ainda a denominar os graus histológicos como Gleason, pois somente o Gleason 6 será o objeto deste estudo.

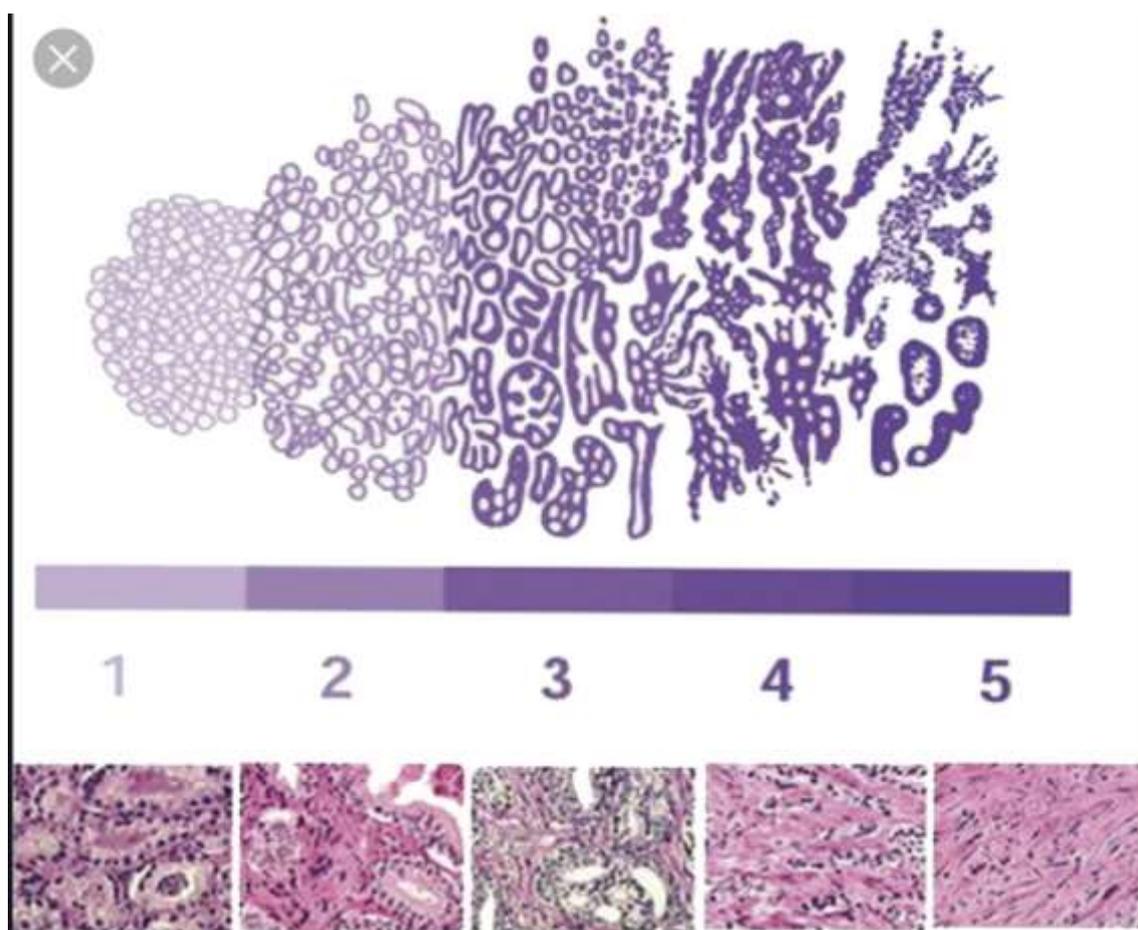


FIGURA 1. Graus histológicos de Gleason: do mais bem diferenciado (1) até o mais indiferenciado (5).

Está bem aceito na literatura médica que são necessários seis eventos para transformar uma célula benigna em maligna: 1- capacidade ilimitada de replicação, 2-angiogênese sustentada, 3- evasão de apoptose, 4-autossuficiência na transmissão de sinais de crescimento, 5-insensibilidade ao bloqueio de sinais de crescimento e 6- nvasão/metástase tecidual. Recentemente tem-se procurado adicionar a esses eventos citados anteriormente, a importância do metabolismo energético das células tumorais ressaltando o desbalanço entre a atividade mitocondrial e a glicogênese anaeróbica. Estudos recentes têm mostrado a relevância e implicação deste tópico em algumas neoplasias humanas, no que se refere a diagnóstico, seguimento, prognóstico e tratamento de tais neoplasias. Contudo, o estudo deste assunto em neoplasias urológicas ainda é escasso (9,10,11).

É curioso como ainda é difícil prever com acurácia o prognóstico de homens com estadio clínico, nível de PSA e escore de Gleason na biópsia semelhantes, podem ter evoluções marcadamente diferentes (12,13).

As células tumorais enfrentam dois grandes desafios: como atender as demandas bioenergéticas e biossintéticas do crescimento e proliferação celular aumentados e, como empreender estratégias de adaptação metabólica para sobreviver às flutuações ambientais de disponibilidade de nutrientes e oxigênio quando o crescimento tumoral ultrapassa a capacidade de abastecimento da vascularização existente.

Para suprir essas demandas, as células tumorais reorganizam todos os mecanismos de sinalização celular relacionados com as

vias de controle de crescimento e todo o seu processo metabólico com o objetivo de aumentar as reações anabólicas necessárias para manter a viabilidade tumoral. Como todas as células tumorais são dependentes desta alteração metabólica, essas vias alteradas representam um alvo terapêutico extremamente atraente.

O entendimento de como as células tumorais são capazes de assegurar um balanço energético positivo e associá-lo ao processo anabólico é vital para o desenvolvimento de terapias eficazes no combate ao câncer. O estudo do metabolismo energético visa compreender e indicar, por exemplo, qual combustível está sendo utilizado preferencialmente, isto é, de qual via está participando esse combustível, além dos fatores que regulam ou modulam a velocidade dessas vias, entre outros.

Com o advento do PSA, a grande maioria das neoplasias de próstatas são detectadas quando a doença ainda seria curável, isto é, a doença ser de baixo grau (escore de Gleason 6) ou intermediária (escore de Gleason 7) (ISPU 1 ou 2); PSA < 10,0 ng/dl e estar clinicamente limitada à glândula prostática (estádios T1 a T2). D'Amico estabeleceu estes critérios clínicos para se estabelecer um quadro de prognóstico desta neoplasia (13). Posteriormente foi constatado que tumores pequenos de baixo escore de Gleason poderiam não ser tratados, uma vez que a sua progressão é muitas vezes muito lenta e nunca iria prejudicar o paciente. Qualquer intervenção na próstata com objetivo curativo, traz com muita frequência, efeitos colaterais severos e permanentes (14).

Um grande número de séries cirúrgicas publicadas relatou uma taxa de metástase próximas a zero, em peças que foram cirurgicamente confirmadas como escore de Gleason 6. Eggener e colaboradores conduziram um estudo multicêntrico com 24.000

homens operados e longo seguimento. Destes, 12.000 tinham doença Gleason 6. A mortalidade por CaP neste grupo, em 15 anos, foi de só 0,2% (13,14)

Nascia assim somente o seguimento destes casos, denominada “Vigilância Ativa” (VA), com raras intervenções caso houvesse uma progressão do CaP. O primeiro estudo de vigilância ativa começou na universidade de Toronto em 1996. Incluiu 740 pacientes de baixo risco (escore de Gleason ≤ 6 e PSA ≤ 10 ng/ml). Neste grupo, após um seguimento de 15 anos, 95% estavam sem doença metastática (15).

Pelo protocolo de vigilância ativa do Johns Hopkins, que é um dos mais rígidos, pois utiliza os critérios de Epstein (Até 3 fragmentos de biópsia positivos, com menos de 50% do fragmento comprometido, densidade do PSA $< 0,15$ ng/ml/cc), um total de 1298 homens foram incluídos no estudo. Após um seguimento médio de 15 anos a sobrevida livre de metástases foi de 69% e sobrevida câncer-específica de 99,4%. Mas 31% destes pacientes apresentaram recorrência clinicamente significantes (15,16).

Porém, como os tumores com estas mesmas características clínicas, podem variar muito com relação a sua evolução: a maioria nunca irá progredir, mas outros, embora sejam minoria, terão evolução desfavorável, mesmo com tratamento local pretensamente curativo: cirurgia radical ou radioterapia. Vários marcadores tissulares tentam dar um uma avaliação mais precisa do prognóstico e eventual necessidade de um tratamento adjuvante, mas ainda não existe um marcador tumoral preciso que possa predizer o prognóstico da doença com grau histológico baixo na prática clínica.

1.3. Metabolismo Energético e Câncer

As células neoplásicas possuem um padrão metabólico muito diferente daquele encontrado nas células saudáveis diferenciadas (17). Por terem um rápido processo proliferativo, tanto a demanda por oxigênio, quanto as sínteses de macromoléculas necessitam ser readequadas para a progressão tumoral. Dessa maneira cria-se uma área de estudo promissora e atraente, visando o se avaliar o metabolismo energético celular como um possível alvo diagnóstico e terapêutico para os diversos tipos de neoplasias (18).

Os tecidos neoplásicos caracterizam-se por apresentar populações celulares que perderam o controle sobre a divisão celular. Dentre as várias alterações intracelulares observadas, tem-se a peculiaridade de que as células neoplásicas produzem energia preferencialmente pela glicólise, em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial (18,19). Esta opção de metabolismo da célula neoplásica tem várias causas, embora não esteja plenamente explicada.

Em condições de normalidade e estabilidade celular, a fosforilação oxidativa, fornece energia preferencialmente para o citoplasma enquanto a glicólise o faz para o núcleo. O núcleo tende a ser o compartimento mais susceptível à deficiência de ATP, tanto nas células normais como nas células malignas (20,21).

Vários tipos celulares neoplásicos metabolizam glicose pela via glicolítica (fenômeno conhecido como efeito Warburg) (21). Esse processo se caracteriza por elevado consumo de glicose e produção de lactato, independentemente do aporte de O₂ (22,23). A glicólise é frequentemente acompanhada por um aumento na captação de glicose. O produto final do metabolismo energético ATP é crucial para a manutenção dos processos celulares (21).

As células tumorais são metabolicamente adaptadas para um rápido crescimento e a proliferação em condições hostis, como baixas tensões de O₂; e pH ácido, condições nas quais as células normais dificilmente conseguiriam sobreviver. As células cancerosas parecem se adaptar ao microambiente criado, alterando seu padrão metabólico em direção ao uso de combustíveis celulares: glicose, lipídios e aminoácidos, de maneira mais eficiente que as células normais. O consumo desses nutrientes tem basicamente dois destinos preferenciais: geração de ATP pela via glicolítica e fosforilação oxidativa; e biossíntese de macromoléculas: proteínas, lipídios de membranas e DNA (17,22,23,24).

As neoplasias apresentam uma grande variedade de estados de diferenciação celular simultânea, indo desde células altamente diferenciadas semelhantes às células originais normais, com a glicólise normal e uma baixa taxa de crescimento; até células altamente indiferenciadas com alta taxa de via glicolítica e rápida velocidade de crescimento (24,25,26).

Uma série de alterações mitocondriais foi verificada ao logo dos estudos em células tumorais, dentre as quais citamos: a diminuição do número de mitocôndrias, diminuição da quantidade de DNA mitocondrial, alteração ultra estrutural da cadeia de transporte de elétrons e conseqüente da atividade da cadeia respiratória, com diminuição do afluxo de citrato do Ciclo de Krebs (27,28,29).

As alterações mitocondriais supracitadas vêm se somando cada vez mais à análise de marcadores envolvidos na bioenergética celular, denominado na literatura atual de "assinatura bioenergética do câncer". Estes estudos mostram as alterações da função bioenergética da mitocôndria.

1.4. Assinatura Bioenergética do Câncer

As recentes técnicas de biologia molecular permitiram uma análise dos padrões de expressão dos genes e proteínas associados com o fenótipo de alguns tipos de tumores, proporcionando conhecimento da assim denominada "assinatura bioenergética do câncer" (30,31).

A maioria das pesquisas que estudaram o metabolismo bioenergético de células neoplásicas o fez avaliando a concentração da subunidade β -catalítica do complexo H^+ -ATP sintase (β -F1-ATPase), proteína de choque 60 (Hsp 60) e a série de marcadores presentes na via glicolítica (31,32,33).

A partir das respectivas concentrações supramencionadas se calcula o índice bioenergético celular (BEC index) obtido a partir da relação β -F1-ATPase: Hsp 60: um dos marcadores da via glicolítica (30,32,333).

Observou-se a partir destes estudos, que para determinados tipos histológicos tumorais, quando se comparava o tecido neoplásico ao tecido normal, havia uma diferença estatística em relação à concentração dos marcadores bioenergéticos referidos (33).

De um modo geral, a expressão da β -F1-ATPase e da Hsp 60, apresentou-se significativamente reduzida nos adenocarcinomas de mama e gástrico, no carcinoma de pulmão e no carcinoma epidermóide de esôfago, sugerindo fortemente que a alteração da função bioenergética das mitocôndrias participa nas características desses tumores (30,32,33).

A consequência metabólica do detrimento à fosforilação oxidativa mitocondrial, é o desvio da produção de ATP celular para

vias alternativas à esta via principal. Diante deste microambiente alterado e inóspito, causado pela condição tumoral, as células neoplásicas são forçadas à necessidade de garantir a manutenção de energia intracelular por vias menos usuais, às quais normalmente estão habituadas. Estas outras formas alternativas para obtenção de ATP intracelular são: glicólise anaeróbia, alterações no aporte intracelular de glicose, alterações no metabolismo de lipídios (síntese e β -oxidação) e catabolismo da glutamina. Todas essas formas de obtenção de energia isoladamente produzem muito menos ATP quando comparadas à fosforilação oxidativa mitocondrial. A essa alteração do metabolismo energético em células tumorais, observada desde a década de 1920, damos atualmente o nome de efeito Warburg, devido ao fato de ter sido o autor que primeiramente descreveu este fato (24,28,29).

Ao se estudar a glicólise, estudos observaram que os marcadores desta via estavam elevados em relação ao tecido normal: o GAPDH (gliceraldeído-fosfato-dehidrogenase) no câncer de mama, pulmão, colo-retal, gástrico e rins e o PK (pirofosfato-quinase) nos tumores de mama (32,33,34).

Desta forma, muitas destas enzimas intracelulares são consideradas “enzimas-reguladoras”, pois controlam pontos metabólicos irreversíveis e que, portanto, são bons indicadores da velocidade e relevância da via glicolítica para obtenção de ATP. O controle da glicólise anaeróbia está associado à ativação ou inibição de algumas “enzimas-chave”, dentre as quais a lactato desidrogenase (LDH). A LDH é a enzima responsável pela inter conversão piruvato-lactato, sendo esta parte imprescindível no processo que assegura à célula, suprimento de ATP, mesmo em condições de baixo débito de oxigênio (hipóxia) (17,24). Dessa

maneira, essa enzima é fundamental para a glicólise e para manutenção do efeito Warburg. Atualmente o HDL é um marcador de atividade neoplásica de grande uso na prática médica.

Para que ocorra a absorção de glicose para o interior celular, tanto células normais, quanto células cancerosas, utilizam transportadores de membrana específicos. O grupo proteico mais importante de transportadores de glicose para o meio intracelular denomina-se GLUT. Dentro deste grupo, composto de vários subtipos, o GLUT-1 é o que apresenta maior distribuição tecidual no organismo, sendo o principal responsável pela captação basal de glicose na maioria das células, sejam normais ou cancerosas (35,36). A maioria das neoplasias humanas mostraram aumento na expressão desses receptores, o que é coerente com a necessidade de um maior aporte energético requisitado por estas células tumorais, para manter sua capacidade metabólica elevada (35,36).

Além da glicose, outro combustível bastante consumido pelas células, tanto normais quanto neoplásicas, são os lipídios. Similarmente às alterações marcantes que ocorrem no metabolismo da glicose, os estudos em pacientes com câncer sugerem que muitas vezes também há aumento na mudança da oxidação e depuração de ácidos graxos livres. A síntese de ácidos graxos nos tecidos tumorais ocorre em taxas muito mais elevadas que em condições normais de estabilidade celular (37). Demonstrou-se que em células neoplásicas, quase todos os ácidos graxos derivam de uma nova síntese, mesmo que haja fornecimento nutricional adequado. Além disso, os tumores que sobre expressam a ácido graxo sintase (FAS), enzima responsável pela síntese de novos ácidos graxos, apresentam comportamento biológico mais agressivo em

comparação com os tumores com níveis normais de FAS. Esta constatação sugere que a sobre expressão FAS confere uma vantagem de crescimento seletivo (37). A oxidação de uma molécula de ácido graxo garante um suprimento maior de ATP comparado ao catabolismo da glicose. Além disso, o metabolismo celular de carboidratos e lipídios estão intimamente inter-relacionados (38,39). Uma destas enzima marcadora da via de oxidação dos ácidos graxos é 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase (HADHSC).

As células neoplásicas enfrentam dois grandes desafios: como atender as demandas bioenergéticas e biossintéticas do crescimento e proliferação celular aumentadas e, como empreender estratégias de adaptação metabólica para sobreviver a flutuações ambientais de disponibilidade de nutrientes e oxigênio, quando o crescimento tumoral ultrapassa a capacidade de abastecimento da vascularização existente. Para suprir essas demandas, as células neoplásicas adaptam todos os mecanismos de via celular relacionados com as vias de controle de crescimento e todo o seu processo metabólico, com o objetivo de aumentar as reações anabólicas necessárias para manter a viabilidade tumoral. Como todas as células neoplásicas são dependentes desta alteração metabólica, essas vias alteradas, representam um importante alvo terapêutico.

O entendimento de como as células neoplásicas são capazes de assegurar um balanço energético positivo e associá-lo a processos anabólicos é vital para o desenvolvimento de terapias eficazes no combate ao câncer. O estudo do metabolismo energético visa compreender e indicar, por exemplo, qual combustível está sendo utilizado preferencialmente, de qual via está participando esse

combustível, quais são os fatores que regulam ou modulam a velocidade dessas vias, entre outros (40).

Assim, os objetivos gerais do presente estudo foram:

1. Comparar e caracterizar o padrão metabólico energético celular nos adenocarcinomas prostáticos de baixo grau (Gleason 6), localizados (pT2N0M0).
2. Dentre os tumores de baixo grau, foram avaliados os tumores sem progressão bioquímica ≥ 5 anos pós-prostatectomia radical e com progressão bioquímica > 2 anos e < 5 anos, que supomos ter um comportamento mais agressivo, por apresentar o mesmo estadió clínico e grau de Gleason dos outros.
3. Em 5 anos não conseguimos identificar clinicamente a maior agressividade destes tumores com recorrência bioquímica, porque o câncer de próstata de baixo grau demora mais tempo para dar metástases clinicamente significantes. Mas se baseando em estudos prévios com seguimento médio de 15 anos, 31% dos pacientes com recorrência bioquímica apresentaram recorrência neoplásica local ou metástases à distância clinicamente significante (15,16).

3. Criação do índice bioenergético celular (BEC) para os adenocarcinomas prostáticos de baixo grau nestes dois grupos.

4. Verificar a viabilidade do index BEC como indicador para inclusão ou exclusão de pacientes com adenocarcinoma de baixo grau no seguimento vigilante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras e procedimentos

No atual estudo foram inicialmente utilizadas amostras prostáticas provenientes de 40 pacientes na faixa etária de 54 a 76 anos, com diagnóstico de CaP, submetidos a cirurgia radical de próstata, realizadas pela mesma equipe no Serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP. O PSA variou de 3,8 a 18,1 ng/ml (média 7,06 ng/ml). Este único caso com PSA de 18,1ng/ml, tinha uma hipertrofia benigna da próstata associada de aproximadamente 100g, o que justificava este PSA mais elevados. Todos os outros casos o PSA era menor que 10ng/ml Todas as amostras foram obtidas no Serviço de Patologia do Hospital Amaral Carvalho e estavam adequadamente estocadas. O diagnóstico de adenocarcinoma de próstata foi confirmado histologicamente em todos os casos, de acordo com os critérios morfológicos (12), por dois uropatologistas seniores, do hospital Amaral Carvalho e da UINCAMP. Foi utilizada a graduação de Gleason. Todos os casos eram escore de Gleason 6 (3+3) e estadio patológico T2N0M0. Em todos os casos o PSA no pós-operatório imediato ficou menor ou igual a 0,1 ng/ml. As amostras prostáticas foram divididas em 2 grupos de 20 pacientes. Grupo 1: escore de Gleason 6 em PR sem recorrência bioquímica (PSA < 0,2 ng/dl) em 5 anos de pós-operatório; Grupo 2: escore de Gleason 6 com recorrência bioquímica (PSA > 0,2 ng/dl) em 2 a 5 anos após cirurgia radical de próstata.

Todas as amostras prostáticas foram obtidas de uma área parasagital média da superfície da zona periférica da próstata e

submetidas a exame histopatológico e imunohistoquímico. As amostras foram fixadas por imersão em Formol 10%, embebidas em parafina altamente purificada contendo polímero plástico (Parapalst Plus, Brasil). Foram cortados em fragmentos de 5 µm de espessura no Micrótopo rotativo Slee CUT 5062 RM 2165 (Slee Mainz, Germany) e corados com Hematoxilina-Eosina na técnica padrão. As amostras de câncer foram analisadas e fotografadas com um fotomicroscópio DM2500 (Leica, Munich, Germany). O estudo foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa do hospital Amaral Carvalho (No: 1.220.165).

Imunotipagem GLUT 1, LDH, HADHSC, β -F1-ATPase, Hsp60, CS e PDH:

Todas as amostras prostáticas, as mesmas utilizadas na análise histopatológica, foram obtidas e cortadas com espessura de 6µm no micrótopo rotativo Slee CUT5062 RM 2165 (Slee Mainz, Germany). A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em meio de citrato (pH 6,0) a 100°C em micro-ondas. O bloqueio endógeno da peroxidase foi obtida com Bicarbonato de Sódio a 0,3% em metanol, e daí encubada em solução blocante com albumina bovina a 3% em amortizador TBS-T, por 1 hora à temperatura ambiente. Antígeno para transportador-1 de glicose (GLUT 1: de coelho, policlonal, sc7903, Santa Cruz Biotechnology, USA), Desidrogenase Láctea A (LDH-A: monoclonal, de rato, sc137243 Biotechnology, USA), 3-Hidroxiacilil-CoA desidrogenase (HADHSC: policlonal de rato, sc-292196, Santa Cruz Biotechnology, USA), ATPsintase mitocondrial F1-beta-subunidade (β -F1-ATPsintase: coelho policlonal, sc134962, Santa Cruz Biotechnology, USA), proteína de choque térmico 60 (hsp60: rato monoclonal, sc 376240, Santa Cruz Biotechnology, USA), Citrato sintase (CS: rato,

monoclonal, sc390693, Santa Cruz Biotechnology, USA) e Desidrogenase pirúvica (PDH: coelho policlonal, gtx104040, Gene Tex, USA) foram localizados através de anticorpos primários específicos, diluídos em albumina sérica de bovino 1% (BSA) e estocados por uma noite a 4°C. O kit “EasyLinkOne” (Immunobioscience, USA) foi utilizado para detecção antigênica de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem com o neutralizador TBS-T, os fragmentos foram incubados com anticorpos secundários conjugados HRP do kit da EasyLinkOne (Immunobioscience, USA) por 40 minutos e então revelados com Diaminobenzidina (DAB), corados com Harris Hematoxilina e fotografados no foto-microscópio DM2500 (Leica, Munich, Germany). Para se medir a intensidade da imunorreatividade, a porcentagem de células epiteliais prostáticas positivamente coradas, foram utilizados 10 campos de cada anticorpo, com magnificação alta (400x), utilizando o software “Image J” (<https://imagej.nih.gov/ij/>). A intensidade da coração foi graduada numa escala de 0 a 3, com: 0, sem imunorreatividade, 0% de células epiteliais prostáticas positivas; 1 (imunorreatividades fraca), 1 – 35% de células do epitélio prostático positiva; 2 (imunorreatividade moderada), 36 – 70% de células epiteliais prostáticas positivas e 3 (imunorreatividades intensa), >70% de células prostáticas positivas.

Determinação do Índice Bioenergético Celular (IBEC)

Para a aferição do índice BEC, a intensidade da porcentagem da imunorreatividades para β -F1-ATPase foi dividida pela porcentagem da intensidade de imunorreatividade dos hsp60 para as mesmas amostras.

Análise Estatística

Para os valores quantificados nas análises imunohistoquímicas, o teste de proporção foi usado, e para essa análise. O erro de 1% foi considerado significativo.

Para a determinação do índice BEC, a análise foi realizada utilizando-se o “Student’s t-test” para as amostras pareadas, seguido do teste “Turkey Post- hoc” para comparação entre as médias

TABELA 1. Características dos anticorpos primários para Imunomarcação.

Anticorpos Primários	Espécie hospedeira	Código	Fonte
GLUT 1	Coelho (policlonal)	ab652	<i>abcam, EUA</i>
PFK	Camundongo (monoclonal)	LS-C173559	<i>LSBio, EUA</i>
LDH-A	Camundongo (monoclonal)	Sc137243	<i>Santa Cruz, EUA</i>
PDH	Coelho (policlonal)	GTX104040	<i>GeneTex, EUA</i>
CS	Coelho (policlonal)	ab96600	<i>abcam, EUA</i>
HADHSC	Coelho (policlonal)	sc292196	<i>Santa Cruz, EUA</i>
ATPsintase (β -F1-ATPase)	Camundongo (monoclonal)	MBS190588	<i>MyBioSource, EUA</i>
hsp60	Camundongo (monoclonal)	Sc376240	<i>Santa Cruz, EUA</i>
GAPDH	Coelho (policlonal)	ab37168	<i>abcam, EUA</i>

3. RESULTADOS

As análises histopatológicas dos 20 pacientes de cada grupo foram realizadas. Após a preparação dos slides corados com

Hematoxilina-eosina, um patologista sênior delimitou a área tumoral baseada na gradação de Gleason. Todos os casos foram escore de Gleason 3+3=6. A gradação de Gleason não considera as atipias nucleares e sim a morfologia glandular e o padrão de crescimento em relação ao estroma. Nesta série, todos os tumores prostáticos mostraram os mesmos padrões citológicos: citoplasma volumoso, núcleos vesiculosos com nucléolos proeminentes e principalmente a ausência de membrana basal (figura 2). As células acinares dos ácinos prostáticos normais eram altamente cilíndricas, havendo citoplasma claro e núcleos na porção basal. Além disso, os ácinos normais eram dotados com uma camada de células basais.

O Grupo 1 mostrou uma predominância da via de fosforilação oxidativa. A imunorreação β -F1-A ATPase foi significativamente intensa neste grupo quando comparado com o Grupo 2, que mostrou uma imunorreatividade fraca (Figuras 3a, 3b). Similarmente, os imunorreagentes HADHSC e PDH foram significativamente intensos no grupo 1 (figuras 4a,4b) em relação ao grupo 2, que mostrou uma imunorreatividades fraca (figuras 4c, 4d). Também a imunorreatividades Citrato Sintase foi significativamente mais intensa no Grupo1 (figura 5a Tabela 1) quando comparada com o Grupo 2, que apresentou moderada imunorreatividade (figura 5b). A imunorreatividades do GLUT 1 foi significativamente intensa no grupo 2, quando comparada com o grupo 1, que mostrou uma reação fraca (Figuras 6a, 6b).

A imunorreatividades da LDH-A foi muito mais intensa no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, que mostrou uma imunorreatividades moderada (Figuras 7a, 7b).

A Imunorreatividade para hsp 60 não mostrou diferença estatística entre os 2 grupos estudados (Figuras 8a, 8b), indicando que a estrutura mitocondrial estava preservada.

Índice de Bioenergia Celular (BEC) como indicador de progressão tumoral: considerando que o índice BEC foi calculado da porcentagem de intensidade de Imunomarcacão para β -F1-ATPase dividido pela porcentagem de intensidade de Imunomarcacão para hsp60, foi observado que tumores de próstata de baixo grau, sem recorrência bioquímica > 5 anos da prostatectomia radical, tem um índice bioenergético (BEC) muito superior em relação aos tumores que recorreram em um prazo de 2 a 5 anos, no qual a predominância da via glicolítica foi evidente (Gráfico 1).

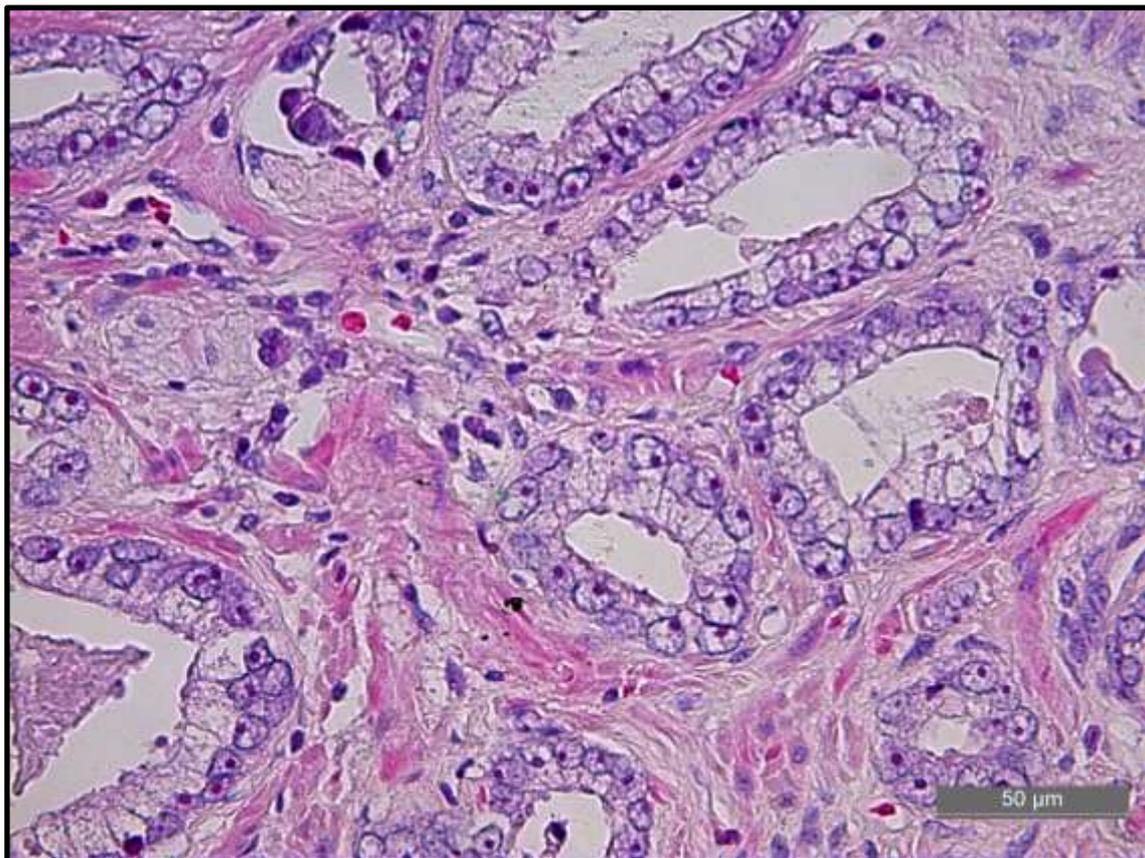


FIGURA 2. Microfotografia de zona periférica da próstata com um câncer de próstata Gleason 3+3= 6. A neoplasia prostática é evidenciada com padrão citológico volumoso, núcleos vesiculosos, nucléolos proeminentes e ausência de células basais. Hematoxilina-Eosina (400x)

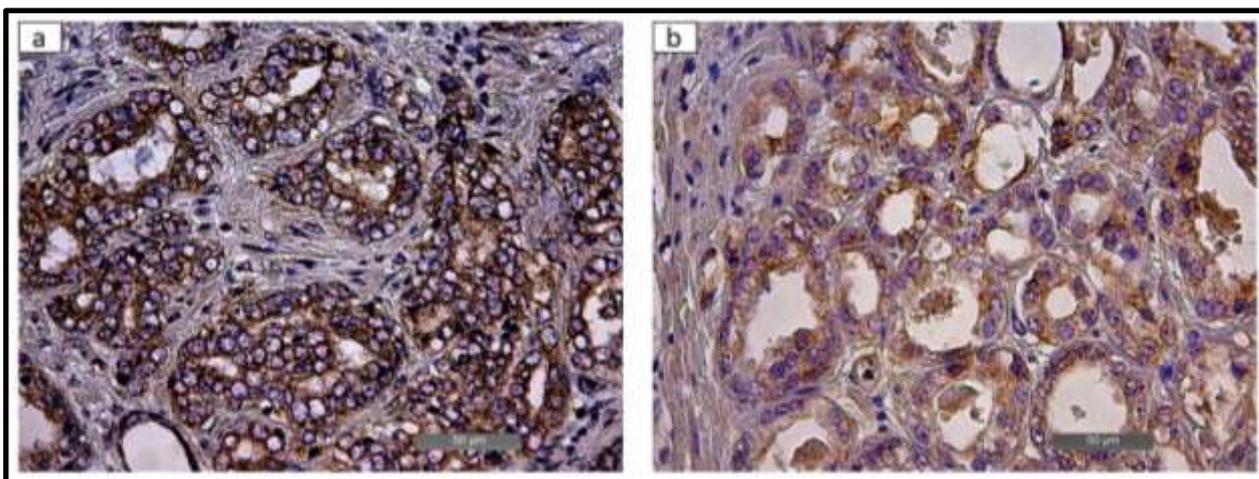


FIGURA 3. β -F1-ATPase Imunocaracterizada diferentemente nas amostras de câncer de próstata de baixo grau do Grupo 1 (a) e grupo 2 (b) (400x)

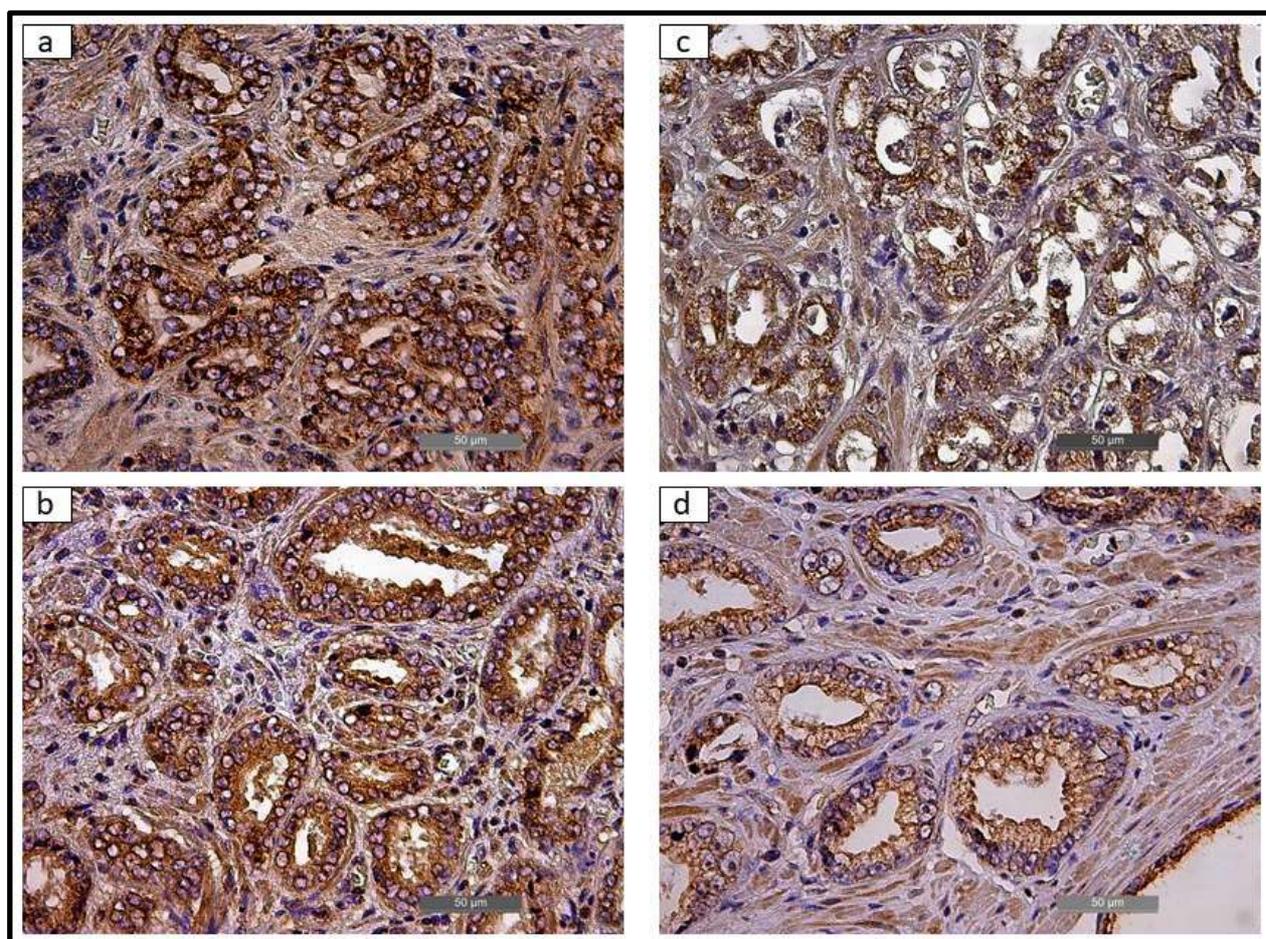


FIGURA 4. Captações mais intensas de antígenos imunomarcadas, HADHSC e PDH 1 no Grupo1 (a,c) em relação ao Grupo 2 (b,d). (400x)

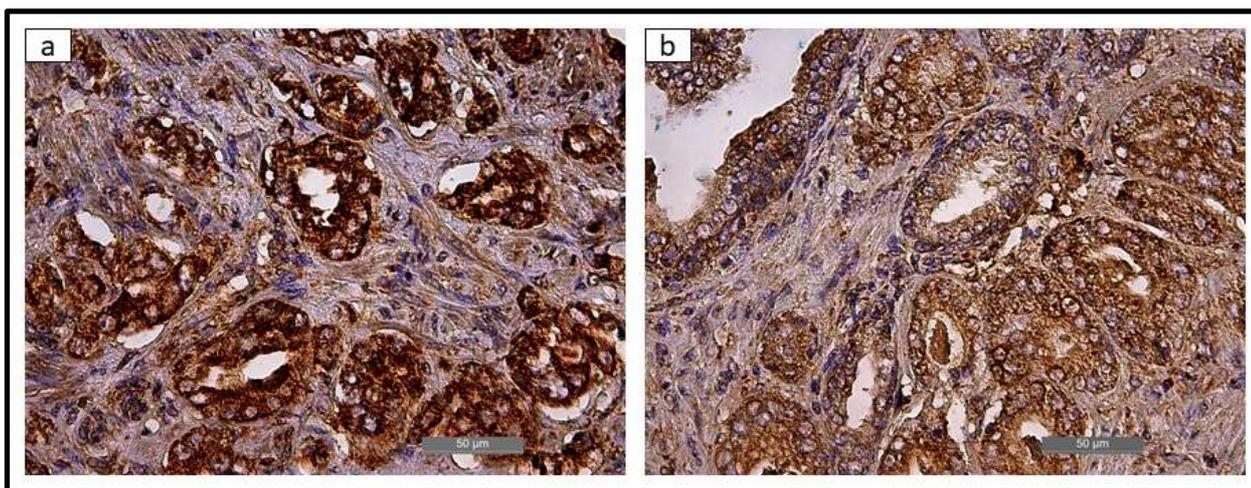


FIGURA 5. Intensidade mais intensa da amostra de próstata do Grupo 1 (a) e Grupo 2 (b) imunomarcadas com Citrato-sintase. (400x)

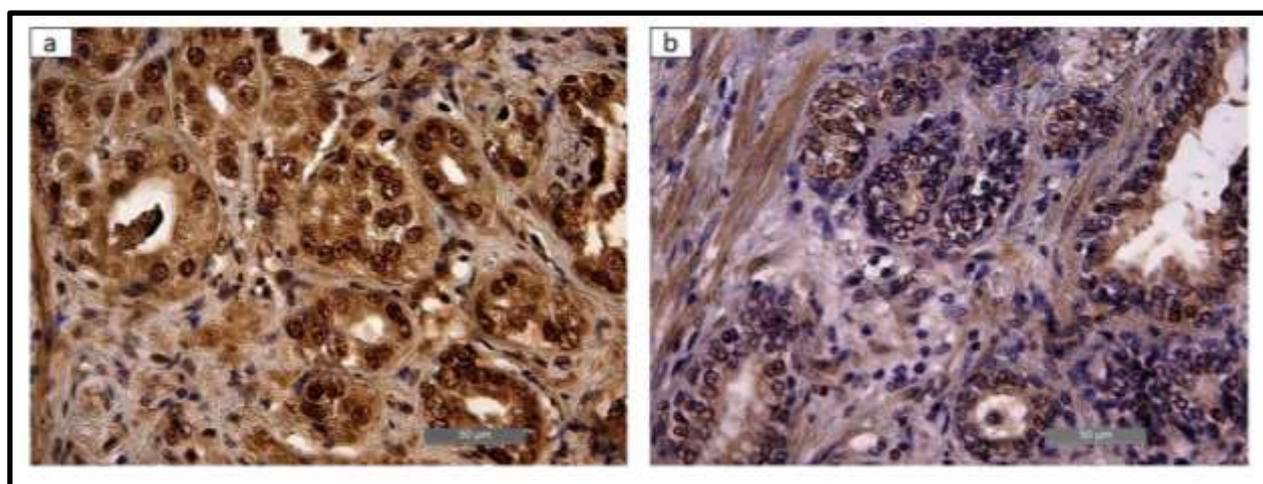


FIGURA 6. Imunomarcção GLUT 1 mais intensa no Grupo 2 (b) em relação ao do Grupo 1 (a). (400x)

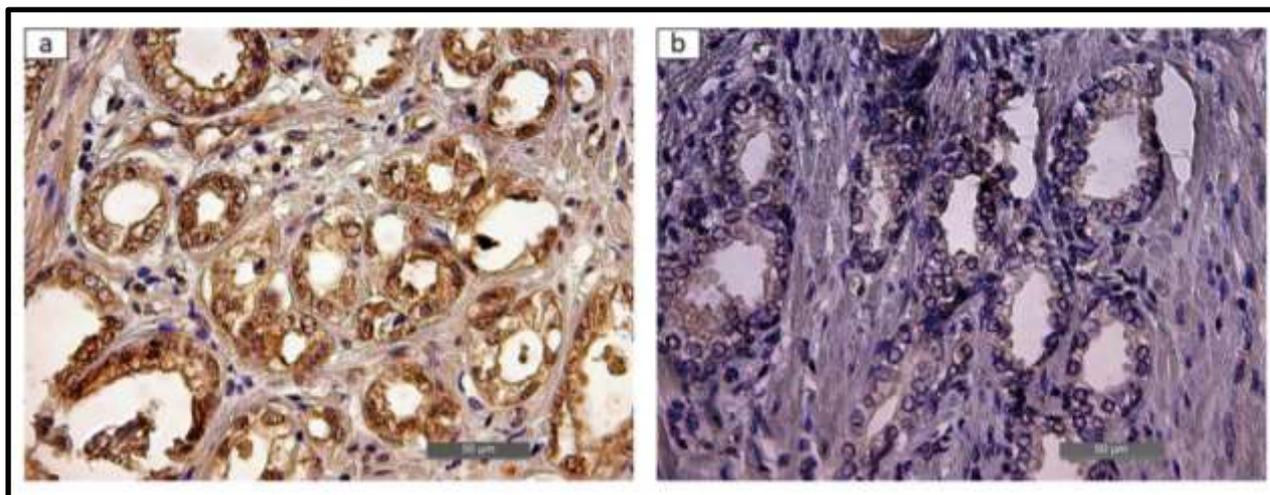


FIGURA 7. Intensidade das imunomarcações LDH-A do Grupo 1(a) e do Grupo 2 (b), mais intensa. (400x)

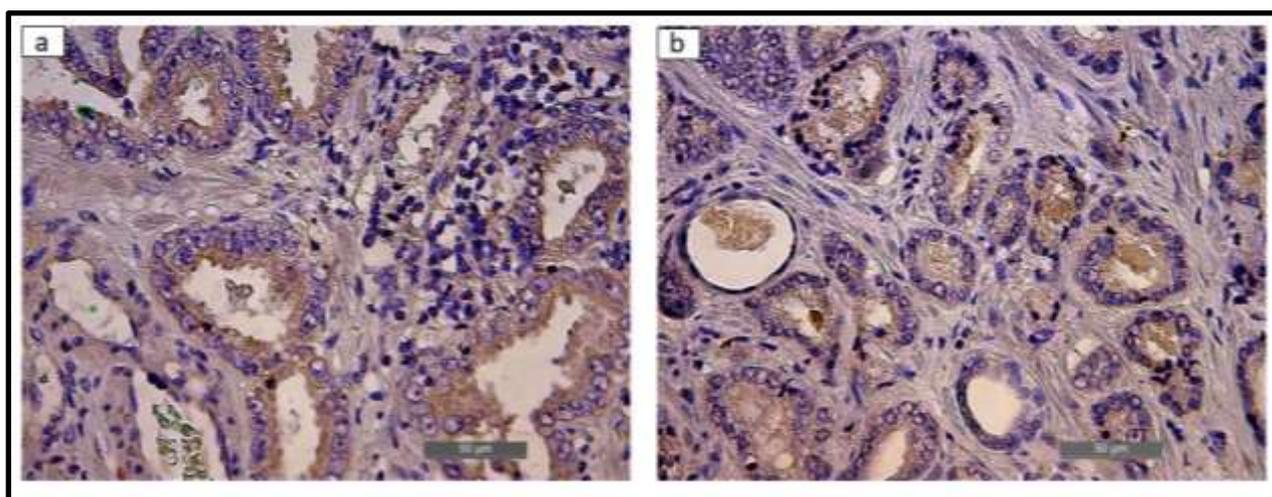


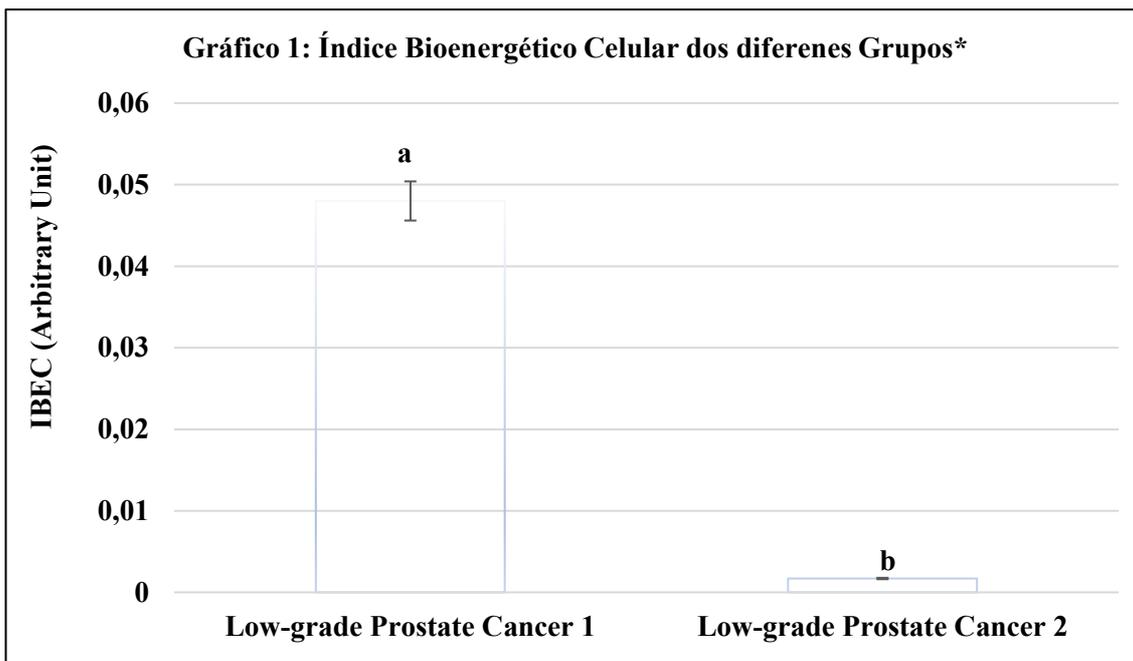
FIGURA 8. Intensidades semelhantes das imunomarcações hsp60 no Grupo 1 (a) e Grupo 2 (b). (400x)

TABELA 2. Média das intensidades de Imunomarcção dos diferentes antígenos nas amostras de neoplasia de próstata de baixo grau do Grupo 1 e Grupo 2.

Antígenos	Grupos	
	Grupo 1 (sem recorrência) (n= 20)	Grupo 2 (com recorrência) (n= 20)
ATPIF1	3 (87.0%)*	1 (15.2%)
HADHSC	3 (93.7%)*	1 (19.1%)
CS	3 (92,1%)*	2 (46.9%)
GLUT 1	1 (15.8%)	3 (81.4%)*
PFK	1 (11.3%)	3 (89.1%)*
LDH-A	2 (50.1%)	3 (86.9%)*
Hsp60	3 (88.4%)*	3 (94.2%)*

0 (ausência de imunorreatividades), 0% de células prostáticas epiteliais; 1 (baixa imunorreatividades), 1-35% de células prostáticas epiteliais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células prostáticas epiteliais positivas; 3 (alta imunorreatividades), >70% de células prostáticas positivas.

*Significância estatística (teste de proporção, $P < 0.0001$)



*Todos os dados expressos como média \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.01$) entre os grupos *Tukey test*.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, o perfil de metabolismo de energia celular foi caracterizado e comparado em câncer de próstata, com e sem recorrência bioquímica, após prostatectomia radical da próstata. Recorrência bioquímica, isto é, PSA $> 0,2$ ng/dl no pós-operatório, significa recorrência da neoplasia (3,10,13), uma vez que pelo exame da peça cirúrgica, o tumor estava circunscrito a ela, com margens cirúrgicas livres da neoplasia.

A associação de câncer de próstata com o metabolismo energético celular é de particular relevância no estabelecimento de critérios prognósticos para os pacientes, em um mesmo padrão histopatológico. Isto é ainda mais importante para se decidir se

incluiu ou não um paciente em um protocolo de vigilância ativa. Também serve para ajudar a desenvolver novas terapias, focadas no metabolismo das células tumorais, que podem ser mais efetivas e com menos efeitos colaterais.

Nestes resultados, uma diferença significativa do metabolismo energético foi observada no mesmo grau histológico. Neoplasias prostáticas de baixo grau, sem recorrência bioquímica em 5 anos após PR mostraram uma preferência absoluta pela via da OXPHOS, enquanto que no grupo de apresentou recorrência no período de 2 a 5 anos após PR, pela via glicolítica. Estes achados foram encontrados se analisando as proteínas das diferentes vias metabólicas.

O grupo sem recorrência tinha um índice BEC alto, porque a predominância da OXPHOS observada pela β -F1-ATPase intensificada, além da HADHSC e PDH também; além da fraca imunorreatividades para GLUT 1 e LGH-A.

O aumento da atividade da β -F1-ATPase demonstrou uma grande atividade mitocondrial desde que esta proteína atravessa a membrana própria da mitocôndria e é responsável pela conversão de ADP em ATP. Isto ocorre através da combinação de ADP com o radical livre de fosfato iônico, adicionando um radical de alta energia à molécula. O processo final ocorre quando o ATP é transportado por difusão facilitada da mitocôndria no citoplasma. Ao final de todo o processo, cada molécula de glicose gera 38 ATPs, dióxido de carbono e água (19,20).

Alto índice BEC no Grupo 1 pode ser um indicador de bom prognóstico e ser útil para ajudar nas decisões terapêuticas e seguimento destes pacientes. Baixo índice BEC no Grupo 2 demonstrou que houve uma grande mudança no metabolismo

energético das células. Como foi previamente proposto por Otto Warburg, a via glicolítica é a mais comumente utilizada por neoplasias malignas (43,44,45). O metabolismo aumentado das células tumorais demanda grande uso de ATP, e desde que a via glicolítica produz menos ATP que a fosforilação oxidativa, mas mais rapidamente, algumas enzimas tem a atividade aumentada com o objetivo de fornecer as necessidades imediatas destas células. GLUT 1 pertence à família de moléculas transportadoras de glicose, sendo de grande importância nesse cenário, desde a sua responsabilidade para introduzir a glicose na célula. Foi demonstrado e está na literatura, que o aumento da sua atividade está presente em uma série de neoplasias, com câncer de pâncreas, ovário e rim, entre outros (46). LDH-A é outra proteína com grande valor no metabolismo de células tumorais, sendo o seu piruvato convertido em lactado, que será transportado para fora do citoplasma, para então ser utilizada na produção de outras moléculas, pela mesma célula ou utilizada pelas células vizinhas. Neste estudo, LDH-A apresentou-se com intensa imunorreatividades no Grupo 2 em relação ao grupo 1. Não houve mudança na estrutura das mitocôndrias nos dois grupos, tanto na imunorreatividades quanto nos níveis de proteína hsp 60. Isto é um indicador que a função mitocondrial talvez possa ser restaurada em tumores no qual a oxphos tenha diminuído, como observado por Fantin et al. (47). A tendência atual no curso do tratamento do câncer de próstata aumentou a necessidade de mais dados para assegurar uma decisão adequada na avaliação clínica do paciente. Os achados clínicos e o escore de Gleason não são completamente suficientes para se ter um prognóstico preciso. Na última década, muitos marcadores genéticos foram aprovados para a prática clínica: Oncotype DX®;

Prolaris®; ProMark®; Decipher®(47). Apesar da eficácia dos Biomarcadores moleculares, não existe ainda um estudo prospectivo randomizado comparando-os, para avaliar a sua precisa empregabilidades(48).

Gonzales-Menendes et al. relataram que foi recentemente demonstrado que as células do PCa super-expressa GLUT4, e mais importante, que isto parece estar relacionado com o fenótipo do câncer de próstata hormônio-refratário (CRPC), embora pouco se saiba sobre sua participação na progressão tumoral (49). Luczynska et al. concluíram que a sobre expressão de GLUT-1 pode ser utilizada como um marcador de malignidade no PC uma vez que ele se correlaciona com o grau (15,16) e também com a proliferação, e reflete uma sobre regulação de glicólise anaeróbica, que pode em última análise promover a sobrevivência da célula tumoral (50). Effert et al, concluíram que a GLUT-1 é expressada nas linhas de células do PC. O nível de expressão aumenta com o avanço do grau de malignidade (51).

5. CONCLUSÃO

A despeito da similaridade histológica do câncer de próstata de baixo grau, o escore de Gleason 6 (3+3) neste estudo, o metabolismo energético celular mostrou uma diferença significativa no grupo que apresentou recorrência neoplásica em comparação com o grupo sem recorrência. Os resultados obtidos neste estudo são muito evidentes, e o seu uso na prática clínica do índice BEC poderá vir a ser uma nova ferramenta, um marcador, para ajudar nas decisões terapêuticas, ao menos para os tumores de próstata de baixo grau, quanto à decisão de um tratamento mais intervencionista, ao invés da vigilância ativa.

6. REFERÊNCIAS

1. Wilson AH. The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment. JAMA. 2014; 312(5): 562.
2. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. Urol Clin North Am. 2016; 43(3): 279-88.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN, 2012. Int J Cancer. 2015; 136: 359-86.
4. Siegel R, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015; 65: 5-29.
5. Alberts AR, Schoots IG, Roobol MJ. Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: past and future. Int J Urol. 2015; 22(6): 524-32.
6. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89: 3367–71.
7. Grönberg H, Damber L, Damber J-E, Iselius L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: Support for dominant inheritance. Am J of Epid. 1997;146:552–57.
8. Ostrander EA, Johannesson B. Prostate cancer susceptibility loci: finding the genes. Adv Exp Med Biol. 2008;617:179-90.
9. Sfanos KS, Isaacs WB, De Marzo AM. Infections and inflammation in prostate cancer. Am J Clin Exp Urol. 2013; 1(1): 3-11.
10. Gonzalo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. J Urol. 2003;170:2444-52.
11. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nature Reviews in Cancer. 2007;7: 256-69.
12. Karan D, Lin MF, Johansson SL, Batra SK. Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. Int J Cancer. 2003; 103(3): 285-93.
13. Epstein JI, Zelevsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, Vickers AJ, Parwani AV, Reuter VE, Fine SW, Eastham JA, Wiklund

- P, Han M, Reddy CA, Ciezki JP, Nyberg T, Klein EA. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. Eur Urol. 2016; 69(3): 428-35.
14. US Preventive Services Task Force, Grossman DC, Curry SJ, Owens DK, Bibbins-Domingo K, Caughey AB, Davidson KW, et al: Screening for prostate cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. JAMA. 2018; 319: 1901-1913.
15. Glaser ZA, Porter KK, Thomas JV, Gordetsky JB, Rais-Bahrami S: MRI findings guiding selection of active surveillance for prostate cancer: a review of emerging evidence. Transl Androl Urol. 2018; 7: S411-S419.
16. Romero-Otero J, Garcia-Gomez B, Duarte-Ojeda JM, Rodriguez-Antolin A, Vilaseca A, Carlsson SU et al.: Active surveillance for prostate cancer. Int J Urol. 2016; 23: 211-218.
17. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. Cancer Cell. 2008; 13: 472–82.
18. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and cancer. Mol Cell. 2016; 61(5): 667-76.
19. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. Cancer Research. 2004; 64: 985-93.
20. Gajewski CD, Yang L, Schon EA, Manfredi G. New insights into the bioenergetics of mitochondrial disorders using intracellular ATP reporters . Molecular Biology of the Cell. 2003;14: 3628-35.
21. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. Biochem Soc Trans. 2016; 44(5): 1499-505.
22. Tran Q, Lee H, Park J, Kim SH, Park J. Targeting cancer metabolism - revisiting the Warburg effects. Toxicol Res. 2016;32(3):177-93.
23. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. Sci Adv. 2016; 2(5): e1600200.
24. Dang CV. Links between metabolism and cancer. Genes Dev. 2012; 26(9): 877-90.
25. Baggetto LG. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. Biochim. 1992; 74: 959-74.
26. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? Trends Biochem Sci. 2016; 41(3): 211-18.

27. Hanahan, D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57–70.
28. Griffiths JR. Causes and consequences of hypoxia and acidity in tumors microenvironments. *Bioessays*. 2001; 23: 295-96.
29. Formentini L, Martínez-Reyes I, Cuezva JM. The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas - critical review. *Life*. 2010; 62(7): 554–60.
30. Cuezva JM, Ortega AD, Willers I, Sanchez-Cenizo L, Aldea M, Sanchez-Arago M. The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792: 1145–58.
31. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003; 33: 49-54.
32. Cuezva JM, Krajewska M, López de Heredia M, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res*. 2002; 62: 6674-81.
33. Isodoro A, Martinez M, Fernández PL, Ortega AD, Santamaría G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*. 2004; 378: 17-20.
34. Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isodoro A, Misek DE, Hanash SM, Beer DG. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis*. 2004; 25(7): 1157-63.
35. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 170(1): 223–230.
36. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. [J Cell Physiol](#). 2005;202(3):654-62.
37. Barger JF, Plas DR. Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17(4): 287-304.
38. Biswas S, Lunec J, Bartlett K. Non-glucose metabolism in cancer cells--is it all in the fat? *Cancer Metastasis Rev*. 2012; 31(3-4): 689-98.
39. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):227-32.

40. Fávaro WJ, Hetzl AC, Reis LO, Ferreira U, Billis A, Cagnon VH. Periacinar retraction clefting in nonneoplastic and neoplastic prostatic glands: artifact or molecular involvement. *Pathol Oncol Res.* 2011; 18: 285-92.
41. Sathianathan NJ, Konety BR, Crook J, Saad F, Lawrentschuk N: Landmarks in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2018; 15: 627-642.
42. Johns LE, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* 2003; 91: 789-794.
43. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029-33.
44. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB: The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7:11-20.
45. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ: Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell.* 2017; 168: 657-669.
46. Macheda ML, Rogers S, Best JD: Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005; 202: 654-662.
47. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P: Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006 *Cell.* 2006; 9: 425-434.
48. Kretschmer A, Tiki D: Biomarkers in prostate cancer - Current clinical utility and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 120:180-193.
49. Gonzalez-Menendez P, Hevia D, Mayo JC, Sainz RM: The dark side of glucose transporters in prostate cancer: Are they a new feature to characterize carcinomas? *Pol J Pathol.* 2012; 63: 272-277.
50. Luczynska E, Gasinska A, Will K: Expression of KI-67 (MIB-1) and GLUT-1 protein in non-advanced prostatic cancer. *Pol J Pathol.* 2012; 63: 272-277.
51. Effert P, Beniers AJ, Tamini Y, Handt S, Jakse G: Expression of glucose transporter 1 (Glut-1) in cell lines and clinical specimens from human prostate adenocarcinoma. *Anticancer Research.* 2004; 24: 3057-3064.

7. ANEXOS

Anexo 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Assinatura Bioenergética do Câncer de Próstata: Glicólise Versus Fosforilação Oxidativa

Pesquisador: Carlos Hermann Schaal

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50984615.0.0000.5434

Instituição Proponente: FUNDACAO DOUTOR AMARAL CARVALHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.351.323

Apresentação do Projeto:

O baixo grau de eficácia das terapias contra as lesões prostáticas proliferativas pode estar relacionado aos baixos efeitos dessas terapias sobre o metabolismo energético e espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres. Em muitos cânceres, a natureza das EROs que amplifica a lesão primária não é conhecida, tornando-se difícil o planejamento correto da utilização de fármacos com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente as EROs, impedindo sua reação com alvos celulares ou interrompendo as cadeias radicalares e assim, evitando a propagação das lesões provocadas por essas moléculas. O emprego adequado destes fármacos e das estratégias terapêuticas depende de diversos fatores, os quais incluem o entendimento dos processos dependentes dos EROs envolvidos no desenvolvimento de lesões prostáticas, a identificação dos compostos que possam atuar como antioxidantes, bem como a sua distribuição na próstata e seu mecanismo de ação.

O entendimento de como as células tumorais são capazes de assegurar um balanço energético positivo e associá-lo a processos anabólicos é vital para o desenvolvimento de terapias eficazes no combate ao câncer. O estudo do metabolismo energético visa compreender e indicar, por exemplo, qual combustível está sendo utilizado preferencialmente, de qual via está participando esse combustível, fatores que regulam ou modulam a velocidade dessas vias, entre outros. Ainda,

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
Bairro: VILA ASSIS **CEP:** 17.210-120
UF: SP **Município:** JAU
Telefone: (14)3602-1194 **Fax:** (14)3602-1207 **E-mail:** cep.aurea@amaralcarvalho.org.br



Continuação do Parecer: 1.351.323

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Realizar as recomendações solicitadas

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acompanha o parecer do relator, solicitamos que seja realizada a recomendação descrita acima.

Informamos que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_614710.pdf	13/11/2015 09:51:23		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	13/11/2015 09:50:32	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
Outros	Autorizacao.pdf	13/11/2015 09:49:30	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
Outros	Onusfinanceiro.pdf	05/11/2015 08:21:28	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
Outros	Documentoscpc.pdf	30/10/2015 10:06:19	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_prostata.doc	26/10/2015 18:38:30	Carlos Hermann Schaal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.doc	24/10/2015 16:35:01	Carlos Hermann Schaal	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
Bairro: VILA ASSIS **CEP:** 17.210-120
UF: SP **Município:** JAU
Telefone: (14)3602-1194 **Fax:** (14)3602-1207 **E-mail:** cep.aurea@amaralcarvalho.org.br