



Universidad Andrés Bello

Facultad de Medicina

Tecnología Médica

## **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FRUCTOSA EN CÁNCER DE PRÓSTATA”.**

Unidad de investigación de pregrado aprobada para optar al título de  
Tecnólogo Médico.

Autores: Edson Francisco Reyes Cifuentes

Daniel Alexander Silva Munster.

Profesor Tutor: Alejandro Godoy S.

Santiago de Chile, 2015

## Índice de contenidos.

<b>1. Resumen.</b>	Pág. 6
<b>2. Introducción.</b>	Pág. 7
<b>3. Marco Teórico.</b>	Pág. 9
<b>3.1 Epidemiología.</b>	Pág. 9
<b>3.2 Próstata: Generalidades</b>	Pág. 9
<b>3.3 Método de pesquisa y tratamientos.</b>	Pág. 11
<b>3.4 ¿Cuál es la relación entre consumo de fructosa y el desarrollo de cáncer?</b>	Pág. 12
<b>3.5 Metabolismo de hexosas.</b>	Pág. 13
<b>3.6 Metabolismo de hexosas en cáncer.</b>	Pág. 17
<b>3.7 Transportadores de hexosas.</b>	Pág. 18
<b>3.8 Transportadores facilitativos SLC2 (GLUT).</b>	Pág. 18
<b>4. Hipótesis.</b>	Pág. 24
<b>5. Objetivo General.</b>	Pág. 24
<b>5.1 Objetivos Específicos.</b>	Pág. 24
<b>6. Metodología.</b>	Pág. 25
<b>6.1 Tipo de estudio.</b>	Pág. 25
<b>6.2 Lugar de realización.</b>	Pág. 25
<b>6.3 Variables a estudiar.</b>	Pág. 25
<b>6.4 Métodos y materiales.</b>	Pág. 27
<b>6.4.1 Extracción de RNA de cultivos celulares.</b>	Pág. 27
<b>6.4.2 Síntesis de cDNA (ADN complementario).</b>	Pág. 28
<b>6.4.3 qRT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction).</b>	Pág. 29
<b>6.4.3.1 Determinación de eficiencia de partidores.</b>	Pág. 29
<b>6.4.3.2 Determinación de doble delta CT.</b>	Pág. 29
<b>6.4.4 Extracción de proteínas totales.</b>	Pág. 32
<b>6.4.5 Método de Lowry para cuantificación de proteínas.</b>	Pág. 32
<b>6.4.6 Western Blot.</b>	Pág. 33
<b>6.4.7 Inmunohistoquímica.</b>	Pág. 35
<b>6.4.8 Citometría de Flujo: Ensayo de NaO.</b>	Pág. 37
<b>6.4.9 Análisis estadístico.</b>	Pág. 38

<b>7. Resultados.</b>	Pág. 39
<b>7.1 Eficiencia de partidores para qRT-PCR.</b>	Pág. 39
<b>7.2 Expresión de mRNA en líneas celulares.</b>	Pág. 41
<b>7.3 Ubicación y expresión tisular de transportadores de clase I (GLUT-1 y 2) y clase II (GLUT-5, 7, 9, 11) mediante Inmunohistoquímica.</b>	Pág. 43
<b>7.4 Expresión de <math>\alpha</math>-KGD y PDH en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica.</b>	Pág. 64
<b>7.4.1 Expresión cualitativa de <math>\alpha</math>-KGD en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica.</b>	Pág. 64
<b>7.4.2 Expresión cualitativa de PDH en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica.</b>	Pág. 66
<b>7.5 Expresión de mRNA de enzimas que participan en el metabolismo de hexosas por medio de qRT-PCR.</b>	Pág. 69
<b>7.5.1 Eficiencia de partidores para las enzimas Hexoquinasa y Fructoquinasa.</b>	Pág. 69
<b>7.5.2 Expresión de mRNA de las enzimas Hexoquinasa y Fructoquinasa.</b>	Pág. 70
<b>7.6 Citometría de Flujo.</b>	Pág. 71
<b>8. Discusión</b>	Pág. 76
<b>8.1 La progresión tumoral en cáncer de próstata se relaciona positivamente con la expresión de mRNA de isoformas GLUT clase II.</b>	Pág. 76
<b>8.2 La localización subcelular del inmunomarcaje de los transportadores Clase II (GLUT 5, 7, 9 y 11) presenta un patrón heterogéneo y puede relacionarse directamente con el fenotipo tumoral en cáncer de próstata.</b>	Pág. 80
<b>8.3 La utilización de la fructosa se ve reflejada por una mayor expresión de Fructoquinasa en el fenotipo prostático maligno y podría desencadenar una adaptación en la respiración celular.</b>	Pág. 86
<b>9. Conclusión</b>	Pág. 91
<b>10. Referencias bibliográficas</b>	Pág. 93

## Índice de figuras.

<b>Figura 1. Zonas de la próstata y patologías asociadas.</b>	Pág. 10
<b>Figura 2. Estructura molecular de proyección de Haworth de las moléculas de glucosa y fructosa.</b>	Pág. 13
<b>Figura 3. Reacción catalítica de la fosforilación de la molécula de glucosa.</b>	Pág. 15
<b>Figura 4. Rol de la molécula de fructosa en la vía glicolítica, productos e interconversiones.</b>	Pág. 16
<b>Figura 5. Modelo estructural de transportador GLUT clase I y II</b>	Pág. 19
<b>Figura 6. Eficiencia de los partidores.</b>	Pág. 40
<b>Figura 7. Expresión relativa (fold change) de mRNA.</b>	Pág. 43
<b>Figura 8. Inmunohistoquímica de GLUT-1</b>	Pág. 47-48
<b>Figura 9. Inmunohistoquímica de GLUT-2</b>	Pág. 50-51
<b>Figura 10. Inmunohistoquímica de GLUT-5</b>	Pág. 53-54
<b>Figura 11. Inmunohistoquímica de GLUT-7</b>	Pág. 56-57
<b>Figura 12. Inmunohistoquímica de GLUT-9</b>	Pág. 59-60
<b>Figura 13. Inmunohistoquímica de GLUT-11</b>	Pág. 62-63
<b>Figura 14. Expresión proteica para la enzima <math>\alpha</math>-KGD en líneas celulares</b>	Pág. 65
<b>Figura 15. Cuantificación relativa de la expresión proteica de <math>\alpha</math>-KGD</b>	Pág. 66
<b>Figura 16. Expresión proteica para la enzima PDH en líneas celulares</b>	Pág. 67
<b>Figura 17. Cuantificación relativa de la expresión proteica de PDH</b>	Pág. 68
<b>Figura 18. Eficiencia de los partidores de hexoquinasa y fructoquinasa</b>	Pág. 69
<b>Figura 19. Expresión relativa (fold change) de mRNA de Fructokinasa y Hexokinasa</b>	Pág. 70
<b>Figura 20. Citometría de flujo de NaO para RWPE-1.</b>	Pág. 71
<b>Figura 21. Citometría de flujo de NaO para PWR-1E.</b>	Pág. 72
<b>Figura 22. Citometría de flujo de NaO para LNCaP.</b>	Pág. 73
<b>Figura 23. Citometría de flujo de NaO para C4-2.</b>	Pág. 73
<b>Figura 24. Citometría de flujo de NaO para DU-145.</b>	Pág. 74
<b>Figura 25. Citometría de flujo de NaO para PC3.</b>	Pág. 74
<b>Figura 26. Porcentaje de la población de las líneas que ha marcado positivo para NaO.</b>	Pág. 75
<b>Figura 27. El aumento de la expresión de los transportadores de fructosa suple los requerimientos energéticos de la célula neoplásica prostática.</b>	Pág. 90
<b>Figura 28. El aumento de la expresión de los transportadores de fructosa se relaciona con la progresión tumoral en cáncer de próstata.</b>	Pág. 92

## **Índice de tablas.**

<b>Tabla 1. Transportadores GLUT, afinidad a sustrato y ubicación órgano-específica.</b>	<b>Pág. 19</b>
<b>Tabla 2. Secuencia de partidores para qRT-PCR.</b>	<b>Pág. 31</b>
<b>Tabla 3. Volúmenes y componentes de un gel de corrida de poliacrilamida 10%</b>	<b>Pág. 33</b>
<b>Tabla 4. Volúmenes y componentes de un gel concentrador de poliacrilamida 10%</b>	<b>Pág. 34</b>
<b>Tabla 5. Tejidos control para inmunohistoquímica.</b>	<b>Pág. 37</b>

## 1. Resumen

El cáncer de próstata corresponde a la segunda causa de muerte por cáncer en Chile, la cual ha aumentado progresivamente durante la última década. Esta neoplasia es de etiología multifactorial, entre ellas la dieta, debido a que el consumo de azúcar per cápita se ha incrementado en los últimos 20 años. El azúcar ampliamente utilizado en la dieta moderna es la fructosa, debido a sus variadas formas de presentación. Se ha correlacionado fuertemente el aumento del consumo de azúcar y el cáncer prostático en el continente americano y asiático, siendo este último el que presenta menor aumento en el consumo de azúcares y a su vez el que posee menor incidencia de esta patología. Muchos tumores dependen únicamente de glucosa para su sobrevivencia, sin embargo la próstata no posee este comportamiento, por lo que podría estar utilizando otros azúcares como fructosa que son ingresados a la célula neoplásica a través de transportadores específicos de esta y aumentando la expresión de la enzima fructoquinasa, que es específica para esta hexosa. Debido a lo anterior se tiene como hipótesis que la carcinogénesis y/o progresión de cáncer prostático se asocia con un aumento de la expresión de transportadores de fructosa y/o la expresión de fructoquinasa. El objetivo de este estudio es analizar la expresión de los transportadores de fructosa y enzima fructoquinasa *in vitro* y además la expresión de los transportadores en muestras clínicas, como también sus posibles consecuencias metabólicas analizando las enzimas clave  $\alpha$ -KGD y PDH en respiración celular y metabolismo de hexosas respectivamente. Esto se llevó a cabo a través de qRT-PCR lo que mostró un aumento de los transportadores de fructosa GLUT-5, GLUT-7 y GLUT-11, como de la enzima fructoquinasa en líneas celulares malignas. Por otra parte Western Blot y Citometría de Flujo mostró un aumento de la expresión de las enzimas anteriormente descritas. En muestras clínicas tumorales se mostró una alta expresión de GLUT-5, GLUT-9 y GLUT-11 con respecto a muestras no tumorales. Finalmente, este estudio sugiere que la fructosa es utilizada de manera imperativa en células de cáncer prostático. Lo que se refleja a nivel tisular y transcripcional en modelos *in vitro*. Este trabajo aporta una visión innovadora de la biología del cáncer de próstata desde un enfoque metabólico. Palabras clave: Fructosa, Cáncer de Próstata, Transportadores de Hexosas.

## 2. Introducción.

En los últimos 40 años se ha visto un aumento dramático en la incidencia de cáncer en países desarrollados (Ferlay et al., 2015). Se ha caracterizado además un cambio radical en la dieta de poblaciones modernas como Estados Unidos, por el aumento del consumo de azúcares como fructosa o sucrosa atribuyendo de esta forma a la nueva dieta del mundo occidental (Marriott, Cole, & Lee, 2009), y a su vez cambios en otros aspectos de la vida moderna en los seres humanos, como estilo de vida sedentario o un mayor consumo en calorías. La fructosa ha cumplido un rol clave en este proceso en su presencia como un endulzante muy atractivo para aumentar la vida media de ciertos alimentos o bien su mayor capacidad para endulzar bebidas, jarabes o alimentos superfluos muy comunes en la dieta moderna de países occidentales (George A. Bray, 2013). De manera interesante, los índices de síndrome metabólico y cáncer se han correlacionado perfectamente con el aumento en el consumo de fructosa (Tappy & Lê, 2010), lo que sugiere sustancialmente que este azúcar cumple un rol fundamental en la patogénesis de estas enfermedades. El cáncer de próstata en hombres Chilenos a su vez, se ha caracterizado como una neoplasia con mayor prevalencia durante las últimas décadas, después del cáncer de estómago (Ministerio de Salud, 2010), lo que es un problema alarmante de salud pública en nuestro país. El conocimiento que se tiene de esta enfermedad a través de un enfoque metabólico como una marca neoplásica propiamente tal posee un bajo peso en la literatura hoy en día, lo que ha hecho de esta patología producir más interrogantes sobre la naturaleza o biología de la misma. Las moléculas clave en estudio corresponden a transportadores que brindan el acceso de la fructosa hacia el interior de las células (Manolescu, Witkowska, Kinnaird, Cessford, & Cheeseman, 2007) del tejido neoplásico. Comúnmente, los estudios de expresión proteica en tejidos muestran una precisión muy alta utilizando marcadores en muestras biológicas con técnicas como Inmunohistoquímica (Matos, Trufelli, de Matos, & da Silva Pinhal, 2010). También una alta precisión a nivel de precursores transcripcionales como mRNA se ha correlacionado con la ejecución de otras técnicas moleculares que permiten cuantificar estos precursores en un enfoque de

alta precisión y sensibilidad, como lo es la técnica de qRT-PCR (Bustin, 2000), que en este caso nos brinda información precisa a un nivel de expresión génica. Debido al alto impacto de la fructosa como un posible sustrato metabólico predominante en la progresión del cáncer de próstata, se obtiene como hipótesis de trabajo que; el aumento en la expresión de los transportadores de fructosa y/o expresión de fructoquinasa se asocia con la carcinogénesis y/o progresión tumoral de esta neoplasia maligna. Este estudio tiene como objetivo principal analizar la expresión de las proteínas responsables del transporte de la fructosa en modelos de líneas celulares que recapitulan *in vitro*, los distintos grados de malignidad/progresión del cáncer de próstata, así, como también en muestras clínicas de biopsias de pacientes con cáncer prostático en los cuales se han disectado previamente regiones benignas y malignas de tejido. Específicamente, se realizará un estudio a nivel de expresión y distribución tisular de estos transportadores, expresión génica de los mismos en líneas celulares y capacidad respiratoria de las células prostáticas con distintos fenotipos malignos o benignos. Con este estudio, se pretendió obtener una mayor comprensión de la biología del cáncer de próstata desde un enfoque metabólico y sentar las bases para una futura validación de los transportadores de fructosa como biomarcadores de progresión y/o etapificación. Este conocimiento permitirá el desarrollo de nuevas herramientas moleculares que permitan un mejor abordaje clínico de este tipo de patologías en el campo de la tecnología médica, lo que contribuye a ampliar el rol en la investigación de neoplasias de importancia en salud pública en nuestro país y por otro lado, la generación de nuevas perspectivas biológicas que apoyen una mejor comprensión de este tipo de enfermedades.



### **3. Marco Teórico**

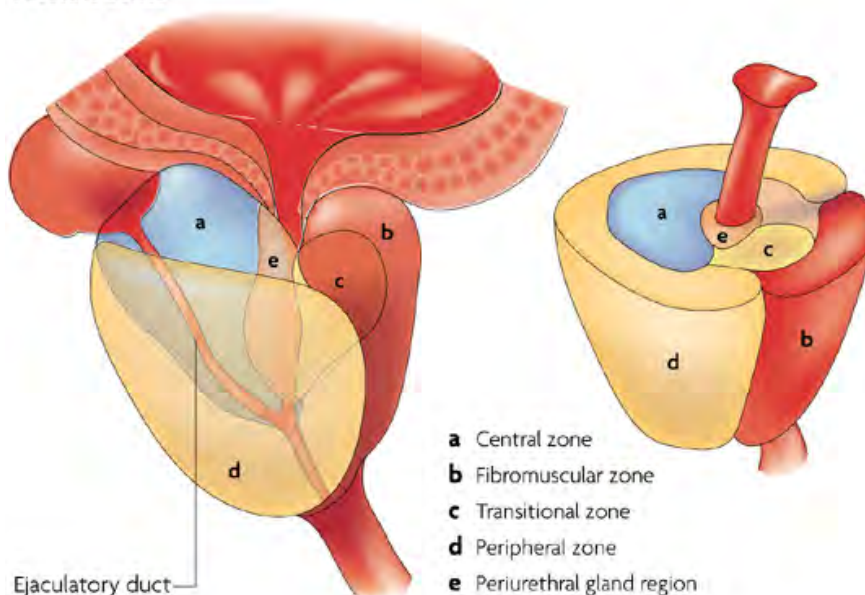
#### **3.1 Epidemiología.**

El cáncer de próstata (CaP) corresponde a la segunda causa de muerte por cáncer en Chile, con una incidencia de 55-57 casos por 100.000 (Ministerio de Salud, 2010) y, una tasa de mortalidad de 22,7 por 100.000 varones en el año 2011, la cual ha aumentado progresivamente durante la última década (Novoa, Anguita, Badilla-O, Aliaga, & Reyes, 2014). A nivel mundial, es el segundo cáncer más diagnosticado después del cáncer de pulmón (Novoa et al., 2014). En Estados Unidos se ha estimado que existe una tasa de sobrevida aproximada de 5 años dependiendo de la etapa de la enfermedad. Si se encuentra en etapa local (sin diseminación fuera de la próstata) los pacientes que alcanzan la tasa de los 5 años es cercana al 100%. Si el paciente está en una etapa regional (propagación a áreas cercanas a la próstata) la tasa de sobrevivencia a los 5 años también es cercana al 100%. Por último, en una etapa distante (cuando existe propagación a huesos, linfonodos u otros órganos no vecinos) la probabilidad de alcanzar los 5 años de sobrevida disminuye a un 28% (Society, 2014).

#### **3.2 Próstata: Generalidades.**

En el adulto normal la próstata pesa aproximadamente 20 gramos, se trata de un órgano retroperitoneal que rodea la vejiga y la uretra. El parénquima prostático se divide en 4 zonas o regiones bien diferenciadas anatómicamente: zona periférica que es donde se originan los carcinomas, zona central, zona transicional que es donde surgen las hiperplasias y la región del estroma fibromuscular anterior (*Fig. 1*) (Kumar, 2010).

### Prostate zones



	Prostate zone		
	Peripheral	Transition	Central
Focal atrophy	High prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Acute inflammation	Low prevalence	None	None
Chronic inflammation	Medium-high prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Benign prostatic hyperplasia	None	High prevalence	Low prevalence
High-grade PIN	Medium-high prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Carcinoma	High prevalence	Medium-high prevalence	None

■ High prevalence      □ Low prevalence  
■ Medium-high prevalence      □ None

Nature Reviews | Cancer

**Figura 1. Zonas de la próstata y patologías de prevalencia.** Esquema que muestra las diferentes zonas de la próstata y su rango de prevalencia con respecto a diversas enfermedades, entre ellas el carcinoma prostático. (De Marzo et al., 2007)

A nivel histológico, la próstata está compuesta por glándulas revestidas por dos capas de células, una capa basal de epitelio cúbico bajo cubierta por una capa de células cilíndricas secretoras, las glándulas están separadas por abundante estroma fibromuscular. En la próstata maligna (adenocarcinoma) se observa un apilamiento de las glándulas y estas carecen de las ramificaciones papilares interiores, y como indicador de malignidad fundamental, la capa de células basales está ausente (Kumar, 2010).

### 3.3 Método de pesquisa y tratamientos.

Los principales métodos de diagnóstico temprano corresponden al tacto rectal y el examen de antígeno prostático específico (*APE*). La capacidad de diagnóstico aumenta considerablemente al usar estos dos métodos en conjunto. Otro método utilizado, pero que no se ha demostrado efectividad como método de diagnóstico es la ultrasonografía rectal (Ministerio de Salud, 2010).

En cuanto al tratamiento se utiliza la terapia de privación androgénica (*ADT*) la cual se logra suministrándole una droga que suprime la producción de andrógenos por parte del cuerpo, el resultado final de esta acción consiste en la muerte apoptótica del epitelio luminal que es sensible a andrógenos o de las células epiteliales en cáncer de próstata (*CaP*), el cual produce una disminución dramática de la sintomatología en pacientes con hiperplasia prostática benigna (*BHP*) o *CaP*. Sin embargo, la respuesta de la hiperplasia prostática benigna a *ADT*, y la extensión de la duración del efecto inducido, varía en cada paciente y de acuerdo a la modalidad de tratamiento. En *CaP* a pesar de que la *ADT* inicialmente induce una respuesta en la mayoría de los pacientes, la recurrencia de *CaP* ocurre en el 80% de los casos dentro de los 12 a 18 meses de tratamiento (A. Godoy et al., 2011). Otras terapias que se usan son la prostatectomía radical y la radioterapia pero la supervivencia específica a 10 años no difiere entre quienes son expuestos a prostatectomía radical y grupos pareados por edad a radioterapia (Ministerio de Salud, 2010).

Con respecto a la predisposición familiar, los varones con un familiar de primer grado afectado tienen un riesgo doble de presentar la enfermedad, que aumenta cuando hay más familiares directos implicados (hasta 5 veces) (Kumar, 2010). En relación a la dieta, un aumento en el consumo de grasas genera una influencia notable en la adquisición de la enfermedad. Contrariamente, se piensa que hay productos de la dieta como los licopenos, derivados de la soja, selenio y vitamina D que retrasan o previenen el desarrollo del cáncer de próstata (Kumar, 2010). El metabolismo hepático de la fructosa, sin embargo, podría favorecer la lipogénesis y

eso no es sorprendente ya que existen muchos estudios que han descrito cambios en los lípidos circulantes cuando sujetos han sido sometidos a dietas ricas en fructosa. Estudios en roedores, perros y primates que consumen dietas altas en fructosa o sucrosa muestran consistentemente hiperlipidemia (George A Bray, 2007), lo que apoya lo anteriormente descrito.

### **3.4 ¿Cuál es la relación entre consumo de fructosa y el desarrollo de cáncer?**

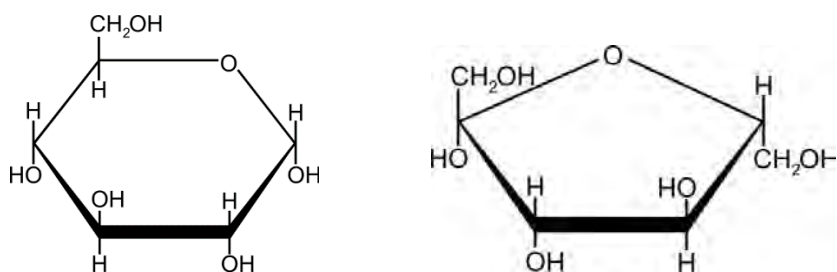
En promedio, el consumo de azúcar per cápita se ha incrementado significativamente, en los últimos 20 años, de un consumo promedio de 56g/día en 1986 a un consumo de 65g/día en 2007, siendo América y Oceanía los mayores consumidores, mientras que los menores consumidores corresponden a Asia y África (Tappy & Lê, 2010). Esto podría estar estrechamente relacionado con la incidencia de cáncer de próstata en ambas regiones. Actualmente, el aumento en la tasa de obesidad debido al consumo energético y la preponderancia en el sedentarismo contribuyen al 15% de las muertes por cáncer en Estados Unidos (Hedley et al., 2004). En los últimos años se ha establecido como hipótesis que el consumo aumentado de azúcares refinados y endulzantes por sí mismos son un factor de riesgo preponderante en muchos cánceres (Kaaks & Lukanova, 2002). El 80% de estos azúcares corresponde a endulzantes compuestos por sucrosa y jarabe de maíz alto en fructosa. Se ha establecido que los niveles de fructosa circulantes aumentan 2.5 veces en pacientes con cáncer de páncreas en comparación con pacientes sanos, en presencia de niveles dietéticos comunes a la "dieta occidental". Además en este tumor se ha determinado que la fructosa induce vías alternativas para la producción eficiente de ácidos nucleicos, por lo que esto apoya una marca neoplásica que corresponde al aumento de la maquinaria transcripcional de la célula cancerígena, lo que sugiere que la fructosa es un sustrato metabólico imperativo en la progresión de este tumor (Liu et al., 2010).

La incidencia del cáncer de próstata y su mortalidad en la mayoría de las poblaciones asiáticas han aumentado gradualmente, pero se encuentran en el tercio más bajo correspondiente a los cohortes Asiático-Americanos, los cuales son por sí mismos más bajos que las tasas observadas en otros cohortes americanos. Ciertos

factores genéticos y ambientales particularmente una dieta occidental, podrían explicar parcialmente estas diferencias (Ito, 2014). Estudios que han asociado directamente a la fructosa como un factor de riesgo en cáncer, tienen una correlación directa con lo anteriormente expuesto, ya que se ha visto una relación negativa entre la fructosa y el cáncer de colon en hombres (Michaud et al., 2005), así mismo el cáncer de colon en Asia tiene una menor incidencia que en América (Pourhoseingholi, 2012). Por otra parte, se ha observado que la fructosa podría ser un factor de riesgo en cáncer de páncreas que también es más prevalente en América que en Asia (Ferlay J, 2012)

### 3.5 Metabolismo de hexosas.

Las células animales como unidades morfo-funcionales requieren de energía para llevar a cabo sus funciones metabólicas básicas y complejas. Las hexosas son moléculas utilizadas ampliamente por las células como sustrato energético para la ejecución de la vasta mayoría de sus procesos metabólicos, las que pueden encontrarse en la dieta humana siendo las más comunes glucosa, galactosa y fructosa. La fructosa es un azúcar con la fórmula química similar a la glucosa debido a la presencia de un grupo cetona en posición 2 de su cadena carbonada, mientras que en la molécula de glucosa existe un grupo aldehído en posición 1 de su cadena carbonada (*Fig. 2*) (Tappy & Lê, 2010).



**Figura 2.** Estructura molecular en proyección de Haworth de las moléculas de Glucosa (izquierda) y Fructosa (derecha).

La fructosa y la glucosa son monosacáridos presentes en pequeñas cantidades en las frutas y en la miel, mientras que la sucrosa, un disacárido formado por una molécula

de glucosa unida a una molécula de fructosa a través de un enlace glicosídico  $\alpha$  1-4, se encuentra en cantidades sustanciales en la caña de azúcar y en la remolacha, debido a esto la fructosa cumple un papel fundamental en la dieta diaria de los seres humanos y por lo tanto sus consecuencias metabólicas son importantes.

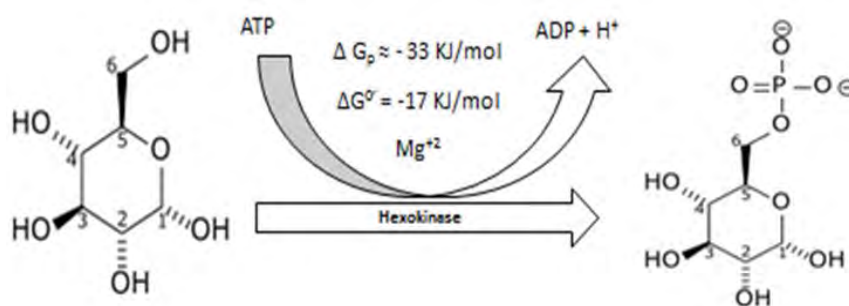
A pesar de que la glucosa es uno de los monosacáridos más ampliamente utilizados en los diversos tejidos, la entrada de la fructosa en el proceso de glicólisis es llamativamente importante, ya que aproximadamente el 50% del consumo de fructosa en la dieta está destinado en la producción misma de glucosa a través de su metabolismo en el hígado (Delarue et al., 1993), mientras que glucosa cuando es consumida por un individuo sano es metabolizada ampliamente en el hígado, pero a su vez es ingresada eficientemente por diversos tejidos a la sangre. Esto puede ser explicado por las bajas concentraciones de fructosa en el plasma sanguíneo luego de una ingestión directa de fructosa en la dieta que oscilan aproximadamente entre 50 y 500 $\mu$ M (Macdonald, 1966).

Muchos eventos en la glicólisis se encuentran regulados por productos metabólicos de ésta para poder mantener una homeostasis de energía en la célula y, por lo tanto, existen enzimas clave con estos aspectos regulatorios. Las enzimas de tipo quinasa catalizan la transferencia de un grupo fosfórico desde una molécula de ATP hacia una molécula aceptora, que en este caso, corresponde a una hexosa (glucosa o fructosa) (*Fig. 3*), por lo que una vez que ingresa a la célula es fosforilada utilizándose una molécula de ATP para cumplir dos objetivos fundamentales: 1) Impedir la difusión hacia el exterior de la célula gracias a la carga negativa del grupo fosfato adherido a la hexosa, de manera tal que la célula pueda mantener la cantidad suficiente de glucosa o fructosa dependiendo de sus demandas metabólicas y, 2) manejar y comprometer las vías en una dirección hacia enzimas posteriores en la glicólisis, dándole un carácter irreversible a la fosforilación de la molécula (Alex Mitchell, 2015).

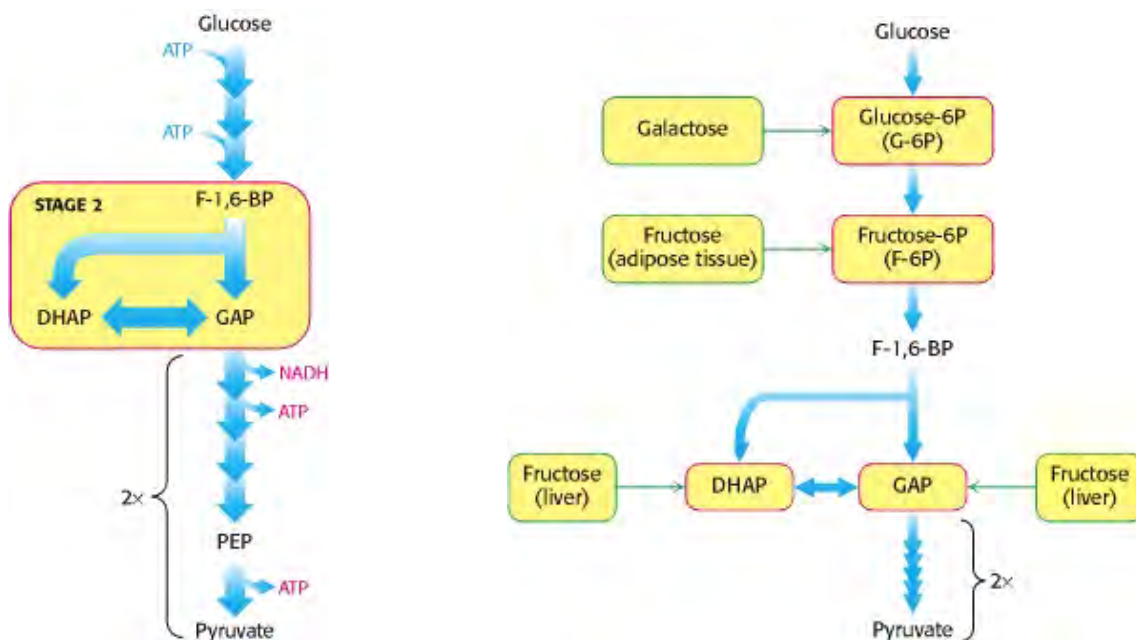
Las enzimas encargadas de fosforilar a las hexosas son fructoquinasa y hexoquinasa.

La enzima fructoquinasa posee dos isoformas importantes: Fructoquinasa A que se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos y Fructoquinasa C que se encuentra principalmente en hígado, intestino y riñón. Tiene una alta especificidad (debido a su baja constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 0.5Mm) por la fructosa y una capacidad de transporte promedio (con una  $V_{m\acute{a}x}$  aproximadamente de 3  $\mu\text{M}/\text{minuto}$  por gramo de hígado de rata o humano) (Adelman, 1967). Debido a esta característica se ha determinado además que fructoquinasa C produce un excesivo agotamiento transitorio de ATP en la célula, sumado a este efecto la ausencia de mecanismos regulatorios de retroalimentación negativa como ocurre en el caso de Hexoquinasa y sus isoformas (Hexoquinasa I, II, III y IV o Glucoquinasa) (Ishimoto et al., 2012).

En términos fisiológicos durante la vía de la glicólisis la fructosa está involucrada en la isomerización de *glucosa-6-fosfato* hacia *fructosa-6-fosfato* por medio de la enzima denominada *fosfogluco isomerasa* y, por lo tanto, la consecuente conversión de una aldosa a una cetosa.



**Figura 3. Reacción catalítica de la fosforilación de la molécula de glucosa. Se observa la utilización de una molécula de ATP y como cofactor  $\text{Mg}^{2+}$  (Alfarouk et al., 2014).**



**Figura 4. Rol de la molécula de fructosa en la vía glicolítica, productos e interconversiones.** A la izquierda se observa la molécula de fructosa en su forma de fructosa-1,6-bisfosfato en la segunda etapa de la glicólisis. A la derecha se observan las diversas entradas de la fructosa hacia la vía de la glicólisis (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2001).

En una etapa posterior ocurre una segunda fosforilación mediante la enzima *fosfofructoquinasa* para dar como producto *fructosa 1,6-bisfosfato (F-1,6-BP)* (Fig. 4), para que luego este producto sea escindido en dos sub productos de tres carbonos cada uno denominados *Dihidroxiacetona fosfato (DHAP)* (Fig. 4) y *Glicerinaldehído 3-fosfato (GAP)* respectivamente (Fig. 4), cuya reacción enzimática es ejecutada por la enzima *Aldolasa* (Berg et al., 2001).

Posteriormente se promueven una serie de reacciones e interconversiones cuyo producto energético culmina con la acción de la enzima *Fosfoenolpiruvato (PEP)* con lo que se obtienen dos moléculas de *piruvato*, dos de NADH y dos de ATP las cuales pueden ser posteriormente destinadas a otras vías metabólicas importantes, siendo el piruvato un mediador clave en los eventos posteriores.

El destino final de las moléculas de piruvato derivadas de una molécula de fructosa o glucosa es determinante para la producción de un normal y alto rendimiento de



ATP. La enzima PDH (*Piruvato deshidrogenasa*), que cataliza la conversión de piruvato a *Acetil-CoA* con el posterior ingreso al ciclo de Krebs, funciona como puerta de entrada a esta etapa clave en la biosíntesis masiva de energía (Koukourakis, Giatromanolaki, Sivridis, Gatter, & Harris, 2005). Finalmente, dentro de la mitocondria y durante el ciclo de Krebs, la enzima  $\alpha$ -KGD (*Alfa cetoglutarato deshidrogenasa*) que cataliza la conversión de *Alfa Cetoglutarato* a *Succinil-CoA* (Tretter & Adam-Vizi, 2005), es clave en la producción de especies reductoras como NADH para el correcto funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y la correcta liberación de grandes cantidades de ATP.

### **3.6 Metabolismo de hexosas en cáncer.**

Las células cancerígenas poseen diversas características que les permiten ser clasificadas como parte de un tejido neoplásico y cuyas modificaciones las habilitan para sobrevivir en ambientes adversos. Se ha determinado por muchas décadas que las células cancerígenas poseen un metabolismo energético alterado. En condiciones aeróbicas, las células normales procesan glucosa, primero a piruvato durante la glicólisis en el citosol y luego producen dióxido de carbono en la mitocondria; bajo condiciones anaeróbicas, se ve fuertemente favorecida la glicólisis y poco piruvato es enviado a la mitocondria (Warburg, 1956). Producto de esta baja eficiencia en la producción de energía neta de solo una molécula de hexosa, las células neoplásicas necesitan aumentar la cantidad de metabolitos energéticos sobre expresando ciertos mediadores glicolíticos (Zhao, Butler, & Tan, 2013), pero a su vez la mayor fuente de ingreso al citoplasma, que son los transportadores de estas moléculas (Jones & Thompson, 2009). Este efecto alterado en el metabolismo se puede observar acentuado en microambientes hipóxicos que se encuentran en el centro de las masas celulares de muchos tumores que han delimitado estructuralmente la angiogénesis exacerbada de estos tejidos, por lo tanto se ha demostrado que existen factores como HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) que inducen un aumento de la glicólisis de manera indirecta (DeBerardinis, Lum, Hatzivassiliou, & Thompson, 2008). Con respecto a esto, se ha observado una mayor expresión de transportadores de hexosas

únicamente en el centro de las porciones papilares en carcinoma prostático (Reinicke et al., 2012)

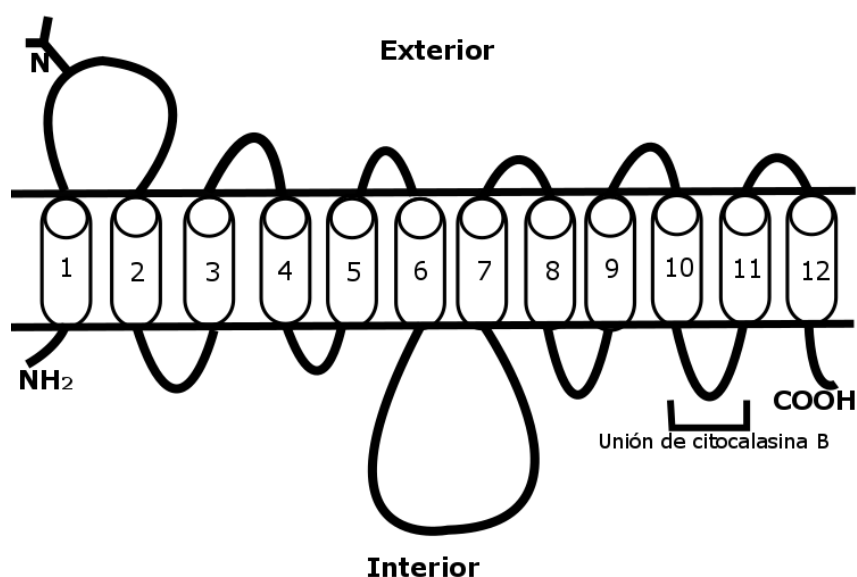
### **3.7 Transportadores de hexosas.**

Para la translocación de las hexosas, como por ejemplo fructosa a través del espacio intra y extra celular y debido a la naturaleza hidrofóbica de las membranas celulares, se requiere de proteínas transportadoras transmembrana específicas. Estas proteínas han sido clasificadas en dos grandes familias: SCL2 (GLUT) que utiliza el gradiente existente en la concentración de hexosa entre el lado interno y externo de la membrana plasmática y, por lo tanto, no consume energía, y SGLT, que transporta hexosas dentro de la célula contra su gradiente de concentración, cuyo proceso se encuentra acoplado al gradiente de  $\text{Na}^+$ , con el consecuente costo de energía (Calvo, Figueroa, Pulido, Campelo, & Aparicio, 2010).

### **3.8 Transportadores facilitativos SLC2 (GLUT).**

Existe una familia de genes denominados transportadores facilitativos de glucosa o GLUTs (por sus siglas en inglés) para distintas isoformas de transportadores, los cuales comparten una importante homología de secuencia, aunque cada una de estas isoformas presenta una afinidad específica por las distintas hexosas. Actualmente se han identificado catorce isoformas de estos transportadores agrupados en tres diferentes clases (familias I, II y III) que se clasifican de acuerdo a su secuencia estructural. Se ha propuesto además, un modelo estructural de secuencia aminoacídica que puede explicar el movimiento de ingreso de hexosas hacia el citoplasma (*Fig. 5*), como también la divergencia que existe entre la afinidad de los transportadores por sus sustratos. De acuerdo a este modelo, estos transportadores contienen 12 dominios  $\alpha$ -helicoidales hidrofóbicos, por lo tanto esta orientación sugiere que la cadena polipeptídica atraviesa 12 veces la membrana plasmática de la célula. Tanto el dominio  $\text{NH}_2$ - y  $\text{COOH}$ - terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma de la célula. La característica común entre los miembros de la familia I y

II de los transportadores GLUT es que poseen un loop extracelular entre los dominios de transmembrana 1 y 2 cuya particularidad es un sitio de N- glicosilación (Fig 5). Estudios previos han demostrado que en GLUT 1 la glicosilación en este sitio aumenta la eficiencia del transporte de glucosa posiblemente debido a la estructura específica de esta hexosa por esta región (Asano et al., 1991).



*Figura 5. Modelo estructural de transportador GLUT clase I y II. Secuencia aminoacídica que contiene 12 dominios. Ambos extremos terminales se encuentran en la cara interna de la célula. Se observa el dominio de interacción con el inhibidor glicolítico Citocalasina B. Modificado de (M. Mueckler et al., 1985).*

**Tabla 1. Transportadores GLUT, afinidad a sustrato y ubicación órgano-específica.**

Transportador	Sustrato		Tejidos					
	Glucosa	Fructosa	Hígado	Riñón	Páncreas	Cerebro	Intestino	Próstata
GLUT-1	X					X		X
GLUT-2	X		X	X	X		X	
GLUT-5		X					X	X
GLUT-7	X	X					X	
GLUT-9		X	X	X				
GLUT-11	X	X		X				

*Tabla 1.- Transportadores GLUT relacionados a este estudio.*

La clase I de los transportadores está formada por GLUT 1-4 y GLUT 14. GLUT 1 puede transportar principalmente glucosa ( $K_m = 3\text{mM}$ ), aunque también puede transportar galactosa, manosa y galactosamina con distinta eficiencia (Augustin, 2010). GLUT 1 es responsable de la captación de glucosa basal que se requiere para mantener la respiración en células, y su expresión está correlacionada usualmente con la tasa de respiración y metabolismo de la glucosa. La expresión de GLUT 1 es reprimida por p53, un importante supresor de tumores en cáncer. La alteración en la expresión de p53 puede explicar la sobre expresión observada en muchos tipos de cánceres, así como su aumento en el metabolismo de la glucosa y su alto consumo energético (Calvo et al., 2010).

Con respecto a GLUT 2, corresponde a un transportador de baja afinidad pero alta capacidad, transportando glucosa ( $K_m = 17\text{mM}$ ) y fructosa principalmente ( $K_m = 76\text{mM}$ ), aunque también es capaz de transportar galactosa, manosa y glucosamina, esta última con una alta afinidad (Uldry, Ibberson, Hosokawa, & Thorens). GLUT 2 es el mayor transportador de glucosa en hepatocitos, en los enterocitos intestinales (ubicación basolateral), células que forman los túbulos contorneados proximales en el riñón (ubicación basolateral), así como también en las células beta del páncreas (ubicación apical). En el hígado GLUT 2 es el principal encargado principal de la captación y liberación de glucosa en estados de alimentación y ayuno respectivamente (Mike Mueckler & Thorens, 2013).

La clase II de los transportadores incluye a GLUT 5, GLUT 7, GLUT 9 y GLUT 11. GLUT 5 en humanos solo puede transportar fructosa, con una  $K_m$  de 6mM. GLUT-5 no es inhibido por drogas comúnmente usadas como citocalasina B, floretina o florizina (Augustin, 2010). Juega un rol importante en el intestino delgado, donde se localiza en la membrana apical de los enterocitos, y es responsable del transporte de fructosa presente en la dieta. GLUT 7 está capacitado para transportar glucosa y fructosa y se caracteriza por tener una alta afinidad por ambos sustratos ( $K_m = 0.3\text{mM}$ ). No es capaz de transportar 2-deoxiglucosa (2-DG), un análogo usado en investigación que es utilizado como trazador capaz de ser incorporado a la célula pero no sigue la ruta de la glicolisis (Augustin, 2010). El mRNA de GLUT 7 está

principalmente expresado en el intestino delgado y colon y, en menor extensión en testículo y próstata. Con respecto a GLUT 9 hasta la fecha no se tiene mucha información sobre su actividad, aunque se ha sugerido que podría ser un transportador de fructosa. Sin embargo, GLUT 9 permite el transporte de uratos. En humanos y ratones se ha observado un splicing alternativo o el uso de distintos promotores para generar dos proteínas. GLUT 9a y GLUT 9b, que solo difieren en su región N-terminal y su ubicación. El primero se encuentra ampliamente distribuido mientras que el segundo principalmente está expresado en el riñón, la placenta y el hígado (Keembiyehetty et al., 2006). Finalmente, otro rol importante de este transportador parece ser el de la función de sensor de glucosa en las células beta del páncreas en colaboración con GLUT 2. GLUT 11 parece transportar glucosa y fructosa, pero no galactosa (Calvo et al., 2010). Al igual que GLUT 9 posee variantes, en este caso 3 (11a, 11b y 11c) que tienen una expresión diferencial en corazón, músculo esquelético, riñón, tejido adiposo y páncreas (Mike Mueckler & Thorens, 2013).

La clase III está formada por GLUT 6, GLUT 8, GLUT 10, GLUT 12 y HMIT ( $H^+$ /Mioinositol) (Mike Mueckler & Thorens, 2013). GLUT 6 es un transportador con una baja afinidad por la glucosa y se encuentra en cerebro, bazo y leucocitos, mientras que GLUT 8 se encuentra presente en testículo, cerebro y tejido adiposo. GLUT 10 ha sido reportado en los tejidos sensibles a la insulina como músculo esquelético y corazón, como también hígado y páncreas. GLUT 12 ha sido pobremente caracterizado pero se postula que se expresa en corazón, intestino delgado, próstata y tejidos sensibles a la insulina. Finalmente, perteneciente a la clase III se encuentra HMIT, un transportador de Mioinositol acoplado a  $H^+$  que se expresa predominantemente en cerebro (Wood & Trayhurn, 2003).

El azúcar más ampliamente metabolizado por células de tejidos humanos es la glucosa, cuyo transportador principal es la isoforma GLUT 1 (Calvo et al., 2010).

Se ha propuesto un modelo de orientación de los diferentes transportadores GLUT en la membrana plasmática que explica la alta o baja afinidad por cada tipo de hexosa presente en el medio extracelular, confiriéndole a estos transportadores la característica principal de ser tejido específicos y no presentar el mismo patrón de distribución tisular en todos los órganos.

En mama, por ejemplo, la expresión de GLUT 1 se encuentra en el tejido normal benigno, sin embargo, se sobre-expresa en cáncer, aumentando el consumo y la captación de glucosa. Sumado a este efecto, también se observa una mayor expresión de GLUT 5, y por lo tanto se sugiere un aumento del consumo de fructosa en este tipo tumoral (Alejandro Godoy et al., 2006). Las diferencias de captación y afinidad funcional de diversos tipos celulares en condiciones normales y patológicas pueden ser demostradas por dos técnicas que permiten hacer una medición y visualizar la captación de azúcares y otras moléculas en células cancerígenas, y corresponden a experimentos de captación con moléculas radiomarcadas: a) Ensayo de captación (“*Uptake Assay*”) y b) *FDG-PET* (*fluoro 2- deoxy-D-glucose/positron emission tomography*) (de Geus-Oei et al., 2006). El ensayo de captación hace relación con la capacidad de la célula de poder incorporar una molécula mediante el transporte de ésta a través de la membrana plasmática gracias a transportadores específicos (Mäger, Eiríksdóttir, Langel, El Andaloussi, & Langel, 2010). El *FDG-PET* es una herramienta o modalidad muy importante en oncología ya que combina disciplinas de imagenología *in-vivo* y biología molecular, además esta técnica permite visualizar funciones propias de la célula, como el metabolismo de azúcares, proliferación celular, metabolismo de la membrana celular o expresión de receptores (Avril et al., 2010), además, esta técnica funciona para neoplasias que poseen un alto ingreso de glucosa en su metabolismo tumoral.

En contra parte, la próstata tiene un comportamiento diferente ya que, en tejido prostático benigno se observa la expresión de GLUT 1 y GLUT 5, y a medida que la próstata presenta una transformación, como en la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (*HGPIN*) esta disminuye la expresión de GLUT 1, sin embargo, la

expresión de GLUT 5 se mantiene constante y en cáncer desaparece la expresión de este transportador (Reinicke et al., 2012).

En ensayos de *FDG-PET* utilizando glucosa radiomarcada no se ha observado que haya una incorporación de esta hexosa por parte de las células de cáncer prostático sugiriendo que, la glucosa no es un sustrato primordial en la mantención, sobrevivida y crecimiento de este tipo de neoplasias (Reinicke et al., 2012). De manera interesante, el hecho de que no se incorpore glucosa, sugiere que las células de cáncer prostático podrían utilizar sustratos distintos a la glucosa como fuente de energía metabólica.

Por lo tanto, el estudio de la expresión de los transportadores de hexosas, y principalmente los transportadores de fructosa permitirá elucidar ciertas variables aún no descritas que estén implicadas directamente con el comportamiento, naturaleza o biología de esta neoplasia maligna. A través de esta investigación, se podrá proporcionar información preliminar tendiente a validar la expresión de el/los transportador/es de fructosa como posible/s biomarcador/es en cáncer de próstata, los cuales podrían en un futuro ser utilizados como una herramienta de diagnóstico o como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer. .

## **4. Hipótesis**

“La carcinogénesis y/o progresión del cáncer prostático se asocia con un aumento de la expresión de transportadores de fructosa y/o la expresión de fructoquinasa”

## **5. Objetivo General**

Evaluar la expresión de transportadores de fructosa en modelos in vitro y muestras clínicas de cáncer prostático con distintos grados de agresividad tumoral.

### **5.1 Objetivos Específicos**

- 1.- Caracterizar el patrón de expresión génica de los transportadores de fructosa (GLUT 2, 5, 7, 9 y 11) en líneas celulares de: próstata humana benigna, cáncer de próstata estimulado por andrógenos y en cáncer de próstata resistente a la castración.
- 2.- Caracterizar la presencia y/o distribución tisular de los transportadores de fructosa (GLUT 2, 5, 7, 9 y 11) y de glucosa (GLUT 1) en tejidos prostáticos tumoral y no tumoral.
- 3.- Estudiar la expresión de enzimas glicolíticas hexoquinasa y fructoquinasa y, cuantificar masas mitocondriales en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la castración.



## **6. Metodología**

### **6.1 Tipo de estudio**

El tipo de estudio presentado en esta unidad de investigación es un estudio experimental analítico y tiene como función comprobar y cuantificar, mediante la aplicación de diferentes técnicas, la presencia o ausencia de transportadores de fructosa.

### **6.2 Lugar de realización**

El estudio se realizó en el laboratorio del Dr. Alejandro Godoy en el departamento de Fisiología ubicado en la Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340, Santiago, Región Metropolitana.

### **6.3 Variables a estudiar**

#### **6.3.1 Líneas celulares de próstata humana benigna:**

a) PWR-1E: Línea celular derivada de un gen supresor de tumores más células epiteliales de próstata humana. La línea proviene de una próstata normal con hiperplasia leve que fue inmortalizada con un adenovirus híbrido. El medio de cultivo contiene keratinocyte serum free (KSF) + Penicilina/streptomycin (P/S) (desde 500 $\mu$ L a 50mL) + L-Glutamina.

b) RWPE-1: Línea celular derivada de células epiteliales de la zona periférica de una próstata humana de adulto histológicamente normal pero que fue transducida con una copia del virus HPV-18. El medio de cultivo contiene keratinocyte serum free (KSF) + Penicilina/streptomycin (P/S) (desde 500 $\mu$ L a 50mL) + L-Glutamina.

### **6.3.2 Líneas celulares de cáncer prostático humanas sensibles a estimulación con andrógenos:**

c) VCaP: Esta línea fue establecida desde metástasis de hueso vertebral de una próstata cancerígena resistente a andrógenos, sin embargo, es una línea sensible a andrógenos. El medio de cultivo contiene Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM) + Fetal Bovine Serum (FBS) 10% + P/S (500 $\mu$ L a 50mL) + Dihidrotestosterona (DHT).

d) LNCaP: Esta línea deriva de una punción de aguja fina de un linfonodo supraclavicular izquierdo de un hombre caucásico de 50 años con un diagnóstico confirmado de carcinoma metastásico de próstata. Este tipo celular prolifera con un medio que contiene RPMI-1640 + 10% de FBS + P/S (500 $\mu$ L a 50mL) + Dihidrotestosterona (DHT) 1 mM.

### **6.3.3 Líneas celulares de próstata humana insensibles a la estimulación con andrógenos:**

e) C4-2: Esta línea posee las mismas condiciones que LNCaP, también proviene de carcinoma metastásico de próstata. Las células expresan receptor de andrógeno y de estrógeno. Este tipo celular prolifera con un medio que contiene RPMI-1640 + 10% de FBS + P/S + Dihidrotestosterona (DHT) 1 mM.

f) DU145: Es una línea celular derivada de metástasis de cerebro, no expresa antígeno prostático específico (PSA) y tiene un potencial metastásico moderado comparado con PC-3. Crece en un medio que contiene MEM + 10% FBS + P/S.

g) PC-3: Esta línea celular tiene un potencial metastásico muy elevado comparado con DU145. Fue establecida desde metástasis de hueso de un cáncer de próstata grado IV. El medio de cultivo contiene de F-12K + 10% de FBS + P/S.

## 6.4 Métodos y materiales.

### 6.4.1 Extracción de RNA de cultivos celulares:

Las líneas celulares ya descritas, en cantidad de  $10^6$  fueron tratadas con 1000 $\mu$ L de RNAzol® RT (*Sigma-Aldrich*) en placas Petri de 100 mm. El reactivo RNAzol® RT es un agente caotrópico compuesto por tiocianato de guanidina con fenol que efectivamente disuelve RNA, DNA y proteínas, por lo que brindó la facilidad de separar el RNA del DNA, proteínas y polisacáridos solubilizando la mezcla en un medio acuoso y realizando centrifugaciones breves, permitiendo en este caso precipitación final del contenido purificado de RNA (Chomczynski & Sacchi, 2006). Luego el contenido de la placa fue recolectado y homogeneizado. Esta mezcla se vertió en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, Se agregaron 400  $\mu$ L de agua nano pura y se sometió a vortex durante 15 segundos para luego ser incubado 15 minutos a T° ambiente. Luego se centrifugó cada tubo a 12.000 rcf por 15 minutos a T° ambiente donde se observó un pellet semisólido y un sobrenadante que contiene el RNA extraído, para que luego este pellet fuera extraído a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se agregó un volumen de alcohol isopropílico 100% (*Winkler*) igual al volumen de RNA extraído anteriormente, se incubó 10 minutos a T° ambiente y luego se centrifugó a 12.000 rcf por 10 minutos a la misma temperatura. Luego los pellet fueron lavados dos veces con 500  $\mu$ L de etanol 75% por 1 mL de sobrenadante utilizado para precipitación y luego el contenido fue centrifugado a 6.000 rcf por 3 minutos a T° ambiente. Finalmente, el pellet obtenido de RNA fue solubilizado entre 10 y 20  $\mu$ L de agua libre de RNAsas (*Winkler, Chile*) con pipeteos repetitivos. Finalizado este proceso, el material se encontró listo para: estudiar integridad de RNA, absorbancia mediante un espectrofotómetro (*Epoch, Bio-tek*), cuantificación del RNA y realización de técnica de qRT-PCR (*Applied Biosystems*).

#### **6.4.2 Síntesis de cDNA (ADN complementario):**

Una vez obtenida y analizada la integridad del RNA se realizó la síntesis de cDNA o DNA complementario a este con el objetivo de tener solamente el mRNA codificante de interés en una molécula mucho más estable en presencia de RNAsas no deseadas, lo que permitió una alta eficiencia en la amplificación exponencial del RNA en cuestión durante el ensayo de qRT-PCR (Okayama, 2012). Para la síntesis de cDNA se preparó una solución que contiene un volumen final de 10 $\mu$ L, de los cuales 8 $\mu$ L corresponden a la suma de la cantidad de RNA que se utilizó (2 $\mu$ g) y agua DePC, los 2 $\mu$ L restantes corresponden a una mezcla de DNAsa (*Promega*) y Buffer RQ1 (*Promega*) en partes iguales, la enzima se utilizó para eliminar cualquier remanente de DNA genómico que puede encontrarse en forma de traza en la solución obtenida de la extracción de RNA de las líneas celulares. La mezcla anterior fue incubada en un termociclador durante 1 hora a 37°C. Finalizado esto, se agregó a la solución anterior 1 $\mu$ L de *DNase Stop Solution* (EDTA) (*Promega*) para detener la acción de la DNAsa y se incubó durante 10 minutos a 65°C en un termociclador. Una vez terminada la incubación se le agregó a la solución una mezcla de 1 U de RNAsin (*Promega*) que es utilizado como un inhibidor de ribonucleasas y por lo tanto mantiene la pureza del RNA en estudio, buffer de reacción M-MLV 1x (*Promega*), Random Primers 0,04  $\mu$ g/mL (*Promega*) que permitieron altos rendimientos en la producción de cDNA al brindar diversos puntos de partida para la transcripción reversa (Ferlay et al., 2015), 2 mM de DNTps utilizados como monómeros para la polimerización de nuevos ácidos nucleicos en cada reacción y 10 U de Transcriptasa Reversa M-MLV (*Promega*) encargada de realizar la transcripción anti sentido de la hebra monocatenaria de RNA de interés. La solución se incubó 1 hora a 37°C en un termociclador y luego por 15 minutos a 70°C en el mismo para inactivar la enzima M-MLV.

### 6.4.3 qRT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction):

#### 6.4.3.1. Determinación de la eficiencia de partidores.

Para analizar esta eficiencia se realizó una curva de calibrado. Para esto se preparó un tubo madre con una concentración conocida de cDNA de interés de un tejido control y una línea celular (5µL de cDNA de cada tejido control + 2µL de cDNA de línea celular) y tres tubos A, B, C. En el tubo A se adicionaron 1µL de la solución del tubo madre y 4µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (H<sub>2</sub>O Dietilpirocarbonato o DePC), completando un volumen total de 5µL, una vez mezclado, de este tubo se extrajo 1µL de solución y se traspasó al tubo B, se agregaron 4µL de H<sub>2</sub>O DePC (*Winkler*) y finalmente del tubo anterior se extrajo 1µL de solución, se adicionaron 4µL de H<sub>2</sub>O DePC para completar un volumen de 5µL, por lo tanto esto se traduce en una dilución de razón 1:5. A partir de los parámetros obtenidos en el StepOne™ Software, se determinó la eficiencia de cada partidior a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia: } 10^{-(1/\text{pendiente de la curva})} - 1$$

Finalmente, se prepararon los tubos de reacción para qRT-PCR. A cada tubo se le agregaron 9µL del mix de corrida + 2 µL de cDNA de cada línea celular que se deseó estudiar y estos cDNA se obtuvieron de: tubo madre, tubo A, tubo B y tubo C y se concluyó el procedimiento ingresando los tubos al equipo StepOne™ Real-Time PCR para realizar análisis.

#### 6.4.3.2. Determinación de doble delta CT.

Para este modelo experimental se utilizaron tres variables, el gen de interés de la isoforma GLUT o gen de la enzima en estudio (Hexoquinasa o Fructoquinasa) respectiva en: línea celular en condiciones normales (Wild Type) que consistió en la línea celular benigna RWPE-1, línea celular en análisis, ya sea línea celular benigna, maligna resistente a la privación androgénica o maligna sensible a la privación androgénica y el gen para control endógeno o “Houskeeping gene” que consistió en

el gen  $\beta$ -2 Microglobulina. Este fue el gen de elección debido a que no tiene relación con el metabolismo y por lo tanto no sufre modificación alguna como es el caso de GAPDH (*Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*), otro “Housekeeping gene” ampliamente utilizado, por lo que se midió cada gen de la isoforma GLUT respectiva por triplicados en función de este control endógeno. La preparación de las muestras contuvo en cada reacción 10 $\mu$ L totales los cuales consisten en 5 $\mu$ L de SYBRGreen (*Applied Biosystems*®), 3 $\mu$ L de agua DePC (*Winkler*), 1 $\mu$ L de partidores y 1 $\mu$ L de cDNA de interés. En cada corrida el ciclo de temperatura comenzó con, una denaturación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de; 15 segundos de denaturación a 95°C, 15 segundos de hibridación a 60°C (o 56°C dependiendo del partididor) y 15 segundos de elongación. En cada una de las corridas de PCR en tiempo real, se realizó la curva de melting o de disociación la cual prosigue hasta el ciclo 40 y que consistió en 15 segundos a 95°C, y 5 segundos entre 55° y 95°C. Esta curva se realizó para asegurar la obtención de una señal limpia, libre de cualquier señal luminosa correspondiente a dímeros de partidores o uniones inespecíficas debido a DNA genómico residual. Al finalizar cada reacción de amplificación se verificó la formación de un producto único, por el análisis de la curva de melting o denaturación (Pryor & Wittwer, 2006). Finalmente, cada reacción de qRT-PCR se determinó por el valor  $C_T$  demostrado por el software que corresponde a la intersección de la curva de amplificación y la línea umbral y que representa la concentración de cada secuencia blanco en la reacción de PCR.

El análisis de expresión génica comparativa y normalizada con el control endógeno, se determinó con los siguientes algoritmos (Livak & Schmittgen, 2001):

1.  $\Delta C_t = C_t$  (gen interés) –  $C_t$  (control endógeno) En cada línea celular en análisis.
2.  $\Delta C_t = C_t$  (gen interés) –  $C_t$  (control endógeno). En la línea celular celular benigna RWPE-1 utilizada como control.
3. Normalización del gen en estudio respecto al control:  
 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  (Línea celular en estudio) –  $\Delta C_t$  (Línea celular control RWPE-1)
4. Finalmente, se obtiene la expresión génica relativa o fold change (cuántas veces está aumentada o disminuida la expresión génica respecto al control):

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 

=

Expresión

Normalizada

Gen		Secuencia (5' → 3')	Tamaño producto	Temperatura de denaturación (Melting temperature MT)
GLUT-1	Sentido	ATCGTGGCCATCTTTGGCTTTGTG	165 pb	60°C
	Antisentido	CTGGAAGCACATGCCACAATGAA		
GLUT-2	Sentido	TCCAGCTACCGACAGCCTATT	110 pb	60°C
	Antisentido	CCAGCCGTCTGAAAAATGCT		
GLUT-5	Sentido	TGGAGCAACAGGATCAGAGCATGA	87 pb	60°C
	Antisentido	AGGATGACCCAAAGGCAGCTATCA		
GLUT-7	Sentido	TCTGCCTCCTCACTGCGATTTACA	115 pb	60°C
	Antisentido	TCCTCTGGAAGCTTCACCCTGTT		
GLUT-9	Sentido	TTCTGGCCATCATCGCCTCTTTCT	119 pb	60°C
	Antisentido	GTTGACGGTGCCTGCAATGATGAA		
GLUT-11	Sentido	ATGAGAGCGCTCCGAAGACTGATT	133 pb	60°C
	Antisentido	ATTCCTGAATGTGCAAGGTCGG		
B2M	Sentido	TAGGAGGGCTGGCAACTTAG	64 pb	60°C
	Antisentido	CCAAGATGTTGATGTTGGATA		
Hexoquinasa	Sentido	AGTACATGGGCATGAAGGGC	93 pb	60°C
	Antisentido	AGGGTGCTGTTACCTCGTCC		
Fructoquinasa	Sentido	CTCAGAAGCTGGGAGTCCAC	137 pb	60°C
	Antisentido	AGTCAGCGGGAGGAGGTATT		

Tabla 2. – Secuencia de partidores para qRT-PCR.

#### **6.4.4 Extracción de proteínas totales**

Se utilizaron placas Petri de 100x15 mm para; dos líneas de próstata benigna (PWR-1E y RWPE-1), dos de cáncer de próstata sensible a la privación androgénica (VCaP y LnCaP), y dos líneas celulares insensibles a la estimulación con andrógenos (DU-145 y PC-3). Se extrajo el medio de cultivo de cada placa y se agregó 200  $\mu$ L de una solución compuesta de: buffer John's (Tris 20 mM pH 7,4, Triton 1%, glicerol 10%, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM) para realizar la lisis celular e inhibidor de proteasas para evitar la degradación proteica por acción enzimática (960  $\mu$ L de buffer John's + 40  $\mu$ L de inhibidor de proteasas). Se extrajo el contenido celular de cada placa a un tubo Eppendorf y luego fueron centrifugados a 13.500 rpm por 15 minutos. Finalizado el paso anterior, se obtuvo una fase acuosa y un pellet celular, de la cual se extrajo la fase acuosa que contiene el total de proteínas en un tubo Eppendorf nuevo previamente enfriado.

#### **6.4.5 Método de Lowry para cuantificación de proteínas.**

En una placa de 96 pocillos (*Thermo Scientific*) se agregó 25  $\mu$ L reactivo A\* (1mL de reactivo A (BioRad) + 20  $\mu$ L de reactivo S (BioRad)). Luego, a los pocillos de la curva estándar se les agregó 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12  $\mu$ L de BSA por duplicado omitiendo los pocillos de la muestra de interés. Una vez que se realizó este procedimiento se agregaron 2  $\mu$ L de Buffer John's o PBS (dependiendo de cuál fue el buffer utilizado para extraer las proteínas) a la curva estándar y 2  $\mu$ L de proteínas a los pocillos de la muestra. Luego se agregaron 18, 16, 14, 12, 10, 8 y 6  $\mu$ L de agua DePC (Winkler) a los pocillos de la curva estándar y 18  $\mu$ L a cada pocillo de la muestra. Finalmente, se adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo B (BioRad) a los pocillos de la curva estándar y a los de la muestra. Una vez realizado el mix se procedió a dejar en incubación durante 15-30 minutos y se cuantificó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 630 nm (*Epoch Biotek*).



### 6.4.6 Western Blot.

Este procedimiento se utilizó para la demostración cualitativa de proteínas mediante un inmunomarcaje post electroforesis en un gel de poliacrilamida (Kurien & Scofield, 2006). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% ya que permitieron una mayor porosidad acorde al rango del peso respectivo para cada proteína en estudio (PDH: 43 kDa,  $\alpha$ -KGD 48 kDa). La preparación de cada gel de poliacrilamida consistió en los siguientes componentes:

<b>H<sub>2</sub>O Destilada</b>	<b>2,6 ml</b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamida (<i>Bio Rad</i>)</b>	<b>3 ml</b>
<b>Tris 1.5 M pH 8.8 (<i>Winkler</i>)</b>	<b>3,38 ml</b>
<b>SDS 10% (<i>Bio Rad</i>)</b>	<b>90 <math>\mu</math>L</b>
<b>Persulfato de Amonio 10% (<i>Winkler</i>)</b>	<b>90 <math>\mu</math>L</b>
<b>TEMED (<i>Winkler</i>)</b>	<b>9 <math>\mu</math>L</b>

*Tabla 3. Volúmenes y componentes de un gel de corrida de Poliacrilamida 10%. Las cantidades se encuentran estandarizadas para pesos de proteínas entre 20 - 150 kDa.*

La mezcla se realizó en un tubo Falcon de 50 ml, con lo que los dos últimos componentes de la mezcla fueron Persulfato de Amonio cuya función fue realizar la gelificación y luego TEMED que consistió en el catalizador de la reacción. Luego se realizó la preparación de un gel concentrador con los mismos componentes (excepto buffer Tris 0,5 M pH 6.8) lo que permitió el cargado de proteínas con buffer de carga 10X y la penetración de éstas al inicio del gel. Este buffer facilitó la precipitación de las proteínas en la base de cada carril (Manolescu, Witkowska, et al., 2007).

<b>H<sub>2</sub>O Destilada</b>	<b>4,39 ml</b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamida (Bio Rad)</b>	<b>778 µL</b>
<b>Tris 0,5 M pH 6,8 (Winkler)</b>	<b>750 µL</b>
<b>SDS 10% (Bio Rad)</b>	<b>60 µL</b>
<b>Persulfato de Amonio 10% (Winkler)</b>	<b>60 µL</b>
<b>TEMED (Winkler)</b>	<b>10 µL</b>

**Tabla 4. Volúmenes y componentes de un gel concentrador de poliacrilamida 10%. Las cantidades se encuentran estandarizadas para pesos de proteínas entre 20 - 150 kDa.**

Finalizado el proceso anterior, se realizó la incubación de las proteínas durante 5 minutos en un termociclador (50 µg) con buffer de carga 10x y luego se ejecutó la corrida del gel en buffer de corrida TG-SDS 1X a 0,03 Å para evitar bandas difusas (Manolescu, Witkowska, et al., 2007), aproximadamente 1 hora hasta que el frente se visualizara cruzando el gel concentrador. Luego se aumentó el amperaje a 0,06 Å y una vez que el frente llegó a la base de la cámara, la corrida fue detenida. Posteriormente se ensambló el sistema de transferencia en una membrana de nitrocelulosa. Esta transferencia se realizó para lograr el traspaso del contenido proteico del gel de corrida hacia la membrana de nitrocelulosa en virtud de la migración de las proteínas proporcionadas anteriormente según su peso molecular (Mahmood & Yang, 2012). Luego se ejecutó la transferencia propiamente tal a 0,3 A por 1 hora en frío. Una vez que concluyó la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se desambló el sistema y se dejaron las membranas de nitrocelulosa en una solución de leche 5% en buffer TTBS 1X en agitación durante 1 hora a T° ambiente, para permitir el bloqueo de proteínas inespecíficas y evitar fondo (Kothari & Mathews, 2015). Luego se realizaron las incubaciones del anticuerpo primario en volúmenes necesarios para cubrir la membrana de nitrocelulosa. Para anti  $\alpha$ -KGD (*Santa Cruz*) 1:1000 en buffer TTBS 1X y anti PDH (*Abcam*) 1:2000 en buffer TTBS 1X. Esta incubación se realizó 12 horas en agitación a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer TTBS 1X durante 10 minutos cada uno, aplicando agitación constante. Luego se realizó la incubación del anticuerpo secundario (*Dako*) un anticuerpo anti-IgG (contra la

especie del primer anticuerpo) a una concentración de 1:1000 en TTBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con buffer TTBS 1X. Finalmente se llevó a cabo el revelado de las membranas de nitrocelulosa, utilizando una solución de luminiscencia Wester Nova (*Cyanagen*).

#### **6.4.7 Inmunohistoquímica.**

Las muestras de tejido histopatológicamente afectadas fueron obtenidas del biorepositorio y banco de información de Roswell Park Cancer Institute en Buffalo, NT, USA (*Data Bank and BioRepository*). Antes de comenzar con el ensayo de inmunohistoquímica los cortes de tejido fueron desparafinados con tres cambios de Xilol (*Winkler*) (Xilol I, II y III) durante 10 minutos cada uno y luego comenzó la rehidratación con una batería descendiente de etanoles (*Winkler*) que consiste en primer lugar en 3 baños en etanol absoluto durante 5 minutos cada uno, 3 baños de Etanol 95% durante 5 minutos cada uno, luego 2 baños de Etanol 70% durante 5 minutos cada uno y finalmente se sumergieron las muestras en Buffer Tris HCl 1X pH 7.8 (*Winkler*) durante 5 minutos con agitación continua. Luego se realizó el proceso de recuperación antigénica que consistió en someter los tejidos a una solución de Buffer Citrato de Sodio 0,01 M pH 6.0 (*Winkler*) utilizando un sistema de olla a presión durante 30 minutos. Finalizado el proceso anterior, se dejaron los cortes de tejido en reposo en la misma solución de recuperación antigénica para permitir su enfriamiento paulatino y luego se sumergieron en tres cambios de agua destilada durante 2 minutos cada uno, finalmente se realizó un lavado de los cortes durante 3 minutos con Buffer Tris HCl 1X pH 7.8. Una vez finalizada la etapa de desparafinado y recuperación antigénica se procedió a ejecutar el procedimiento de inmunohistoquímica comenzando con la realización del bloqueo de peroxidasa endógena de los cortes de tejido utilizando peróxido de hidrógeno al 3% (*Winkler*) en metanol absoluto (*Winkler*) durante 10 minutos a T° ambiente y luego se lavaron los cortes 2 veces con Buffer Tris HCl 1X pH 7.8 durante 3 minutos cada uno. Luego se realizó el bloqueo de proteínas tisulares durante 20 minutos utilizando BSA (*Albúmina de suero de bovino*) a una concentración de 2% en Buffer Tris HCl

1X pH 7.8. Una vez realizado el bloqueo de proteínas y sin someter los cortes a lavados se procedió a la incubación con el anticuerpo primario respectivo (anti GLUT 2, 5, 7, 9 y 11, *Alpha Diagnostic International Inc*) a concentraciones en un rango de 1:100 – 1:1000 según recomendaciones del fabricante durante 12 horas en una cámara húmeda a T° ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados de los cortes con Buffer Tris HCl pH 7.8 en tiempos ascendentes; el primer lavado fue de 3 minutos, el segundo de 5 minutos y el último de 7 minutos. Luego se realizó la incubación del anticuerpo secundario conjugado con HRP (Peroxidasa rábano picante) (*Dako*) en una dilución de 1:100 por un tiempo de una hora a T° ambiente en una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de los cortes con Buffer Tris HCl 1X pH 7.8; el primero de 3 minutos, el segundo de 5 minutos y el tercero de 7 minutos y finalmente se realizó el revelado con DAB (3,3-Diaminobencidina) (*Dako*) por un tiempo de 3 minutos visualizando en el microscopio óptico. Se realizó el contraste nuclear con Hematoxilina de Harris (*Cell Marque*) durante 2 minutos por cada tejido con el consecuente azulamiento de tinción utilizando un baño agua corriente durante 10 minutos y finalmente se deshidrataron las muestras en una batería que consistió en tres baños de etanoles crecientes; primero 5 minutos en etanol 95° y luego 10 minutos en dos baños de etanol absoluto. Se concluyó el procedimiento realizando el aclaramiento con dos baños de Xilol durante 10 minutos cada uno y se montaron los portaobjetos con resina sintética en medio hidrofóbico.

Se utilizaron los siguientes tejidos control para la validación de la técnica de inmunotinción:

<b>Marcador</b>	<b>Tejido control (+)</b>	<b>Dilución</b>
<b>GLUT-1</b>	<b>Carcinoma renal de células claras</b>	<b>1:100</b>
<b>GLUT-2</b>	<b>Riñón</b>	<b>1:100</b>
<b>GLUT-5</b>	<b>Riñón</b>	<b>1:1000</b>
<b>GLUT-7</b>	<b>Riñón</b>	<b>1:100</b>
<b>GLUT-9</b>	<b>Riñón</b>	<b>1:200</b>
<b>GLUT-11</b>	<b>Riñón</b>	<b>1:100</b>

*Tabla 5. Tejidos control para técnica inmunohistoquímica.*

#### **6.4.8 Citometría de Flujo: Ensayo de NaO (10-N -nonyl acridine orange).**

El colorante fluorescente NAO interaccionó con los componentes de Cardiolipina de la membrana mitocondrial interna, la cual es una estructura clave en la producción de ATP durante la cadena transportadora de electrones (Petit et al., 1994), dando cuenta de la integridad de esta membrana en el conteo de células teñidas y no teñidas con NAO, a través de citometría de flujo, lo que brindó información sobre el número de masas mitcondriales e integridad de estas mismas (Jacobson, Duchon, & Heales, 2002).

En una placa Petri de 100 mm se sembraron  $10^6$  células. Luego se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X y se tripsinizaron las células. Posteriormente se preparó una solución de trabajo compuesta de NAO 100 nM a partir de un Stock de 1mM en PBS 1X frío, manteniéndola siempre en oscuridad. Luego se resuspendieron las células en un tubo Eppendorf de 1.5 mL en 500  $\mu$ L de solución de trabajo y 500  $\mu$ L de PBS para la condición control, posteriormente se incubó por 20 minutos a 37°C en oscuridad. Finalmente se centrifugó a 3.000 rpm para retirar la solución de trabajo y se resuspendió el contenido en PBS 1X frío. En este paso, el contenido final se protegió de la luz y se adquirió en el citómetro de flujo FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) DiVa II BD. Los datos fueron analizados en el programa FCS express 4.

#### **6.4.9 Análisis estadístico**

El análisis de cuantificación relativa de western blot se realizó con el software ImageJ, El análisis estadístico de qRT-PCR, eficiencia de partidores y ensayo de transporte se realizó mediante el software Graphpad Prism 5 utilizando la prueba One Way Anova y post corrección Bonferroni. Para esto, se trabajó con la media aritmética de datos independientes en los experimentos, determinando el error estándar medio (SEM). Los valores fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor  $p < 0,005$ .

## 7. Resultados.

*1.- Caracterizar el patrón de expresión génica de los transportadores de fructosa (GLUT 2, 5, 7, 9 y 11) en líneas celulares de: próstata humana benigna, cáncer de próstata estimulado por andrógenos y en cáncer de próstata resistente a la castración.*

### **7.1 Eficiencia de partidores para qRT-PCR:**

Mediante una curva estándar utilizada en qRT-PCR se midió la eficiencia de los partidores de cada uno de los transportadores GLUT de interés (1, 2, 5, 7, 9 y 11) además de un “Housekeeping gene” de control endógeno  $\beta$ -2-microglobulina (B2M), obteniendo así el ciclo umbral ( $C_T$ ) de cada gen para cada transportador. Esto se realizó por diluciones seriadas a partir de una concentración de cDNA conocida (dilución 1:5), por lo que cada valor  $C_T$  en la gráfica corresponde al doble del valor  $C_T$  que le precede. Finalmente, como resultado se obtuvo una pendiente, la cual permitió calcular la eficiencia. Los partidores de: Glut-1 con una eficiencia de 92.7% (Fig 6a), Glut-2 con un 100.5% de eficiencia (Fig 6b), Glut-5 con un 118% de eficiencia (Fig 6c), Glut-7 con una eficiencia de 116% (Fig 6d), Glut-9 con una eficiencia de 97.35% (Fig 6e), Glut-11 con un 102.9% de eficiencia (Fig 6f) y el gen B2M el cual presentó una eficiencia de 92.5% (no mostrado), para poder realizar la validación de la eficiencia en la reacción de qPCR posterior. Todos los valores se encuentran dentro de los rangos aceptables (entre 90%-120%) (Livak & Schmittgen, 2001), por lo que se valida la eficiencia de cada partidador en la reacción de qPCR. Cabe destacar además que cada reacción de qRT-PCR para cada gen de interés culminó con el análisis de la curva de Melting o curva de temperatura de disociación de los partidores, para demostrar que la detección de fluorescencia fue específica para el gen de interés y que no corresponde a fluorescencia debida a dímeros de partidores o DNA genómico residual. Una vez realizado este procedimiento, se llevó a cabo el análisis de expresión relativa de los genes GLUT en estudio y también análisis de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

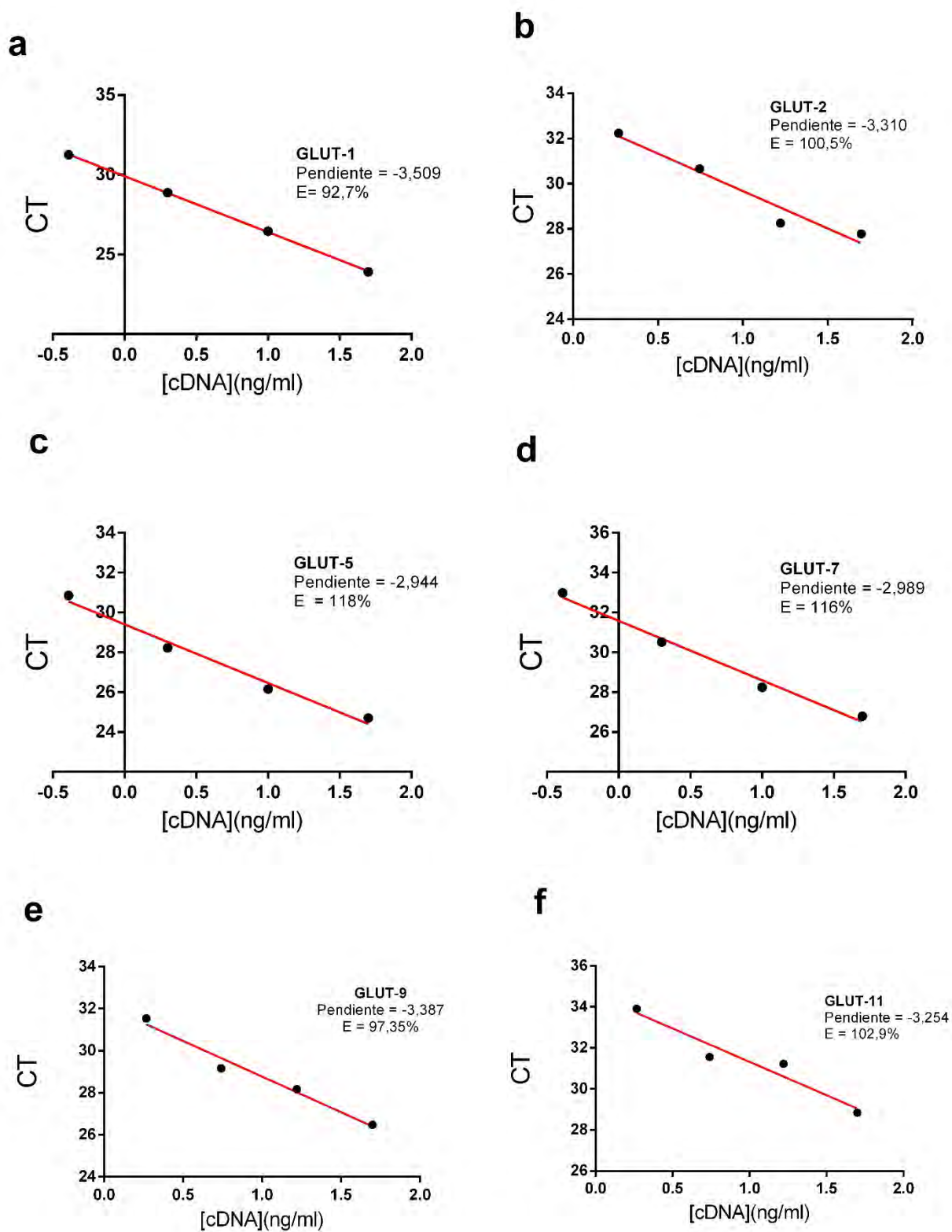


Figura 6. Eficiencia (E) de los partidores. Glut-1 (a), Glut-2 (b), Glut-5 (c), Glut-7 (d), Glut-9 (e) y Glut-11 (f).



## **7.2 Expresión de mRNA en líneas celulares.**

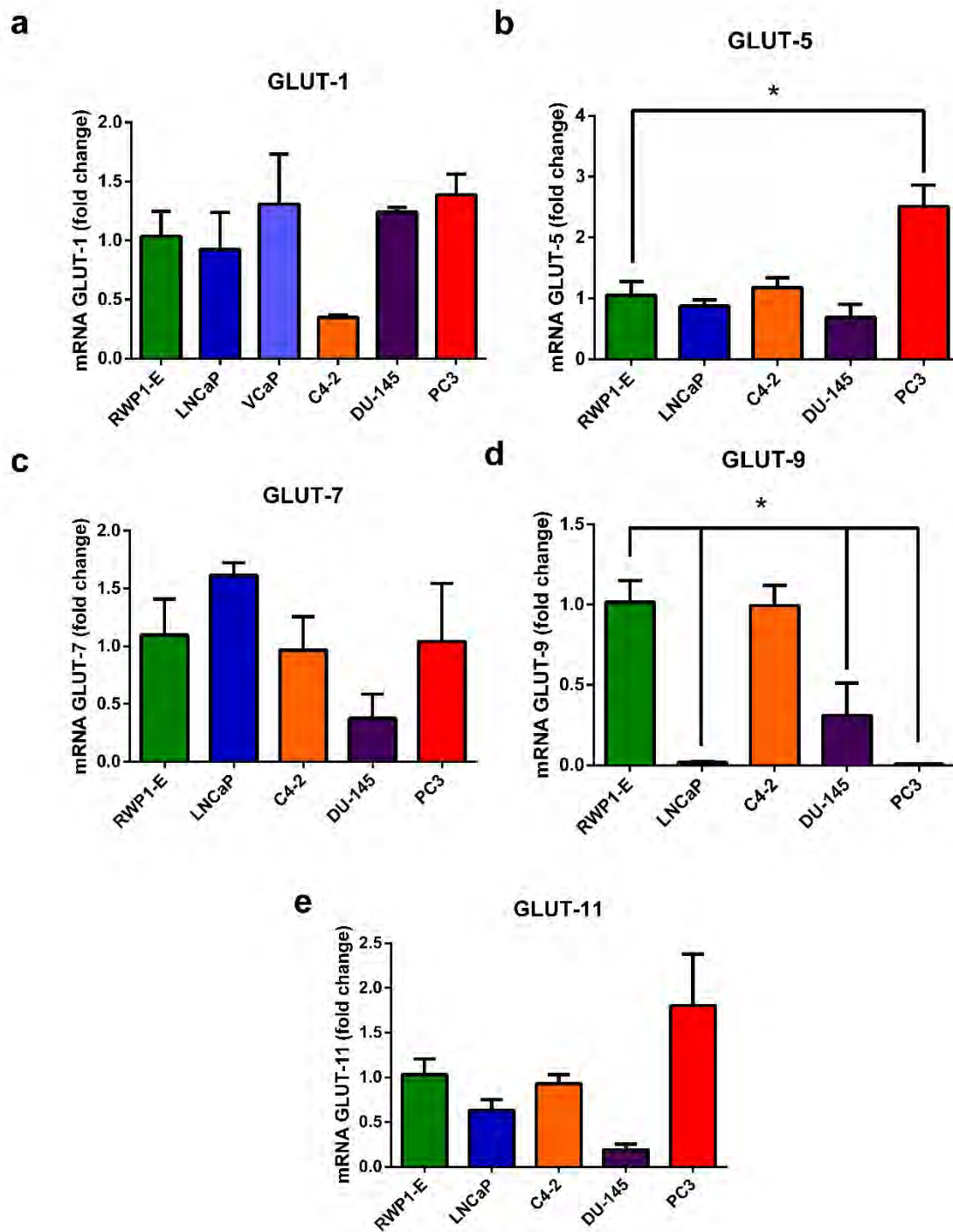
Una vez realizada la eficiencia de los partidores, se llevó a cabo el análisis de expresión relativa de los genes de transportadores GLUT en estudio y también el análisis del algoritmo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para observar cambios en la expresión a nivel de mRNA de los transportadores a través de las líneas celulares en función de la normalización por un control endógeno. Todas las muestras fueron analizadas por *StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Se estableció que la línea celular RWPE-1 corresponde a la línea “wild type” (WT) o línea control y que en base a ésta, se determinaron los cálculos para evidenciar la expresión relativa de mRNA de los distintos transportadores GLUT (La omisión de GLUT-2 se debió a que su expresión no se encuentra en próstata) (Alejandro Godoy et al., 2006).

Del análisis se observa un aumento de la expresión de transportadores GLUT de fructosa, que corresponden a la Clase II (5, 7, 9 y 11) en las líneas celulares que presentan algún grado de malignidad o progresión tumoral con respecto a las líneas celulares de próstata benigna. En la línea celular de cáncer de próstata metastásico resistente a la privación androgénica PC3 (*Fig 7b*) se observa un aumento muy significativo de GLUT-5, que es un transportador eficiente y exclusivo de fructosa no así su contraparte benigna RWPE-1 la cual expresa significativamente menores niveles de mRNA de GLUT-5. Con respecto a GLUT-7, un transportador que acorde a la literatura posee una alta afinidad por glucosa y fructosa y cuyo mRNA se expresa en bajas cantidades (Calvo et al., 2010) se observa que la mayor expresión se encuentra en LNCaP (*Fig 7c*). Cabe destacar además que LNCaP es una línea celular con menor grado de agresividad que PC3, sin embargo se clasifica como maligna y posee capacidad metastásica al igual que ésta (Thalman et al., 1994).

A través de todas las líneas celulares se observa una expresión constante de mRNA pero en distintas proporciones de GLUT-1 (*Fig 7a*) lo que ya ha sido reportado en la literatura (Effert, Beniers, Tamimi, Handt, & Jakse, 2004) en lo que corresponde a las líneas celulares DU-145, PC3 y LNCaP. En lo que respecta a GLUT-9 se observa una expresión muy baja en las líneas celulares LNCaP y PC3 (*Fig 7d*). Con respecto

a GLUT-11 (*Fig 7 e*) la expresión relativa de mRNA muestra que existe una gran expresión en la línea celular PC3 y que posee una gran significancia con respecto a DU-145.

En resumen, la mayor expresión significativa entre las líneas celulares corresponde a GLUT-5 en la línea celular de cáncer de próstata metastásico resistente a la privación androgénica PC3, GLUT-9 presenta una baja expresión a lo largo de la progresión tumoral representada por los diversos grados de malignidad de cada línea celular en estudio. GLUT-11 presenta un patrón similar a la expresión de GLUT-5 en términos de que los mayores niveles de mRNA corresponden también a la línea celular de cáncer prostático metastásico resistente a la castración; PC3. Con este estudio se concreta la presencia del transportador exclusivo de fructosa GLUT-5 en preponderancia en modelos celulares altamente malignos, siguiendo un patrón muy similar los transportadores con alta afinidad por glucosa y fructosa; GLUT 7 y GLUT 11 a nivel de mRNA.



**Figura 7. Expresión relativa (fold change) de mRNA de GLUT-1 (a), GLUT-5 (b), GLUT-7 (c), GLUT-9 (d) y GLUT-11 (e).** Se observa la expresión a nivel de RNA mensajero por parte de las líneas celulares mediante qRT-PCR y análisis de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  con un N=3. Significancia estadística (\*) se fijó por  $P < 0.05$  mediante análisis ANOVA de una vía.

2.- Caracterizar la presencia y/o distribución tisular de los transportadores de fructosa (GLUT 2, 5, 7, 9 y 11) y de glucosa (GLUT 1) en tejidos prostáticos tumoral y no tumoral.

### **7.3 Ubicación y expresión tisular de transportadores clase I (GLUT-1 y 2) y clase II (GLUT 5, 7, 9 y 11) mediante Inmunohistoquímica.**

Se obtuvieron muestras de 5 pacientes (P1, P2, P3, P4 y P5) y para cada uno de ellos se obtuvo una muestra no tumoral (NT) y una tumoral (T) con un grado de progresión neoplásica desconocida.

Se analizaron las glándulas bien conservadas en la muestra NT, se definió como criterio general una glándula bien conservada a la estructura histológica que mantenga su epitelio de origen con una base de células basales y un epitelio cúbico/columnar simple en el lumen de la glándula. En cuanto a la muestra T se analizaron todas las glándulas con especial mención a aquellas que hayan perdido su orden lógico y existan distintos grados de atipia nuclear (Humphrey, 2007).

En cuanto a la muestra no tumoral (NT) correspondiente al paciente 1 (P1) se observa una tinción negativa para el transportador GLUT 1 en la glándula apreciada en la imagen (*Fig. 8*), también se observa un estroma limpio, sin un fondo inespecífico de tinción de manera que no existe una marca concreta en esta zona. En la muestra tumoral (T) se observa una tinción negativa, tanto en epitelio como estroma, cabe destacar la alta cantidad de glándulas y la alta anisocariosis que se observa en este corte histológico que corresponden a características de malignidad.

Del paciente 2 (P2) en su muestra NT se pudo observar una inmunorreactividad positiva para GLUT-1 en la región estromal correspondiente a un nervio periférico (punta de flecha), lo cual ha sido previamente descrito en otro tipo de tejidos (Salla et al., 2008), sin embargo este hallazgo de inmunotinción no ha sido reportado en tejido prostático. Por otra parte dentro de un vaso sanguíneo se observan glóbulos rojos (punta de flecha) que detallan un marcaje de membrana, denotándose este patrón como un control positivo interno para la inmunotinción (Reinicke et al., 2012) (*Fig. 8*). También observamos un epitelio adyacente al estroma anteriormente

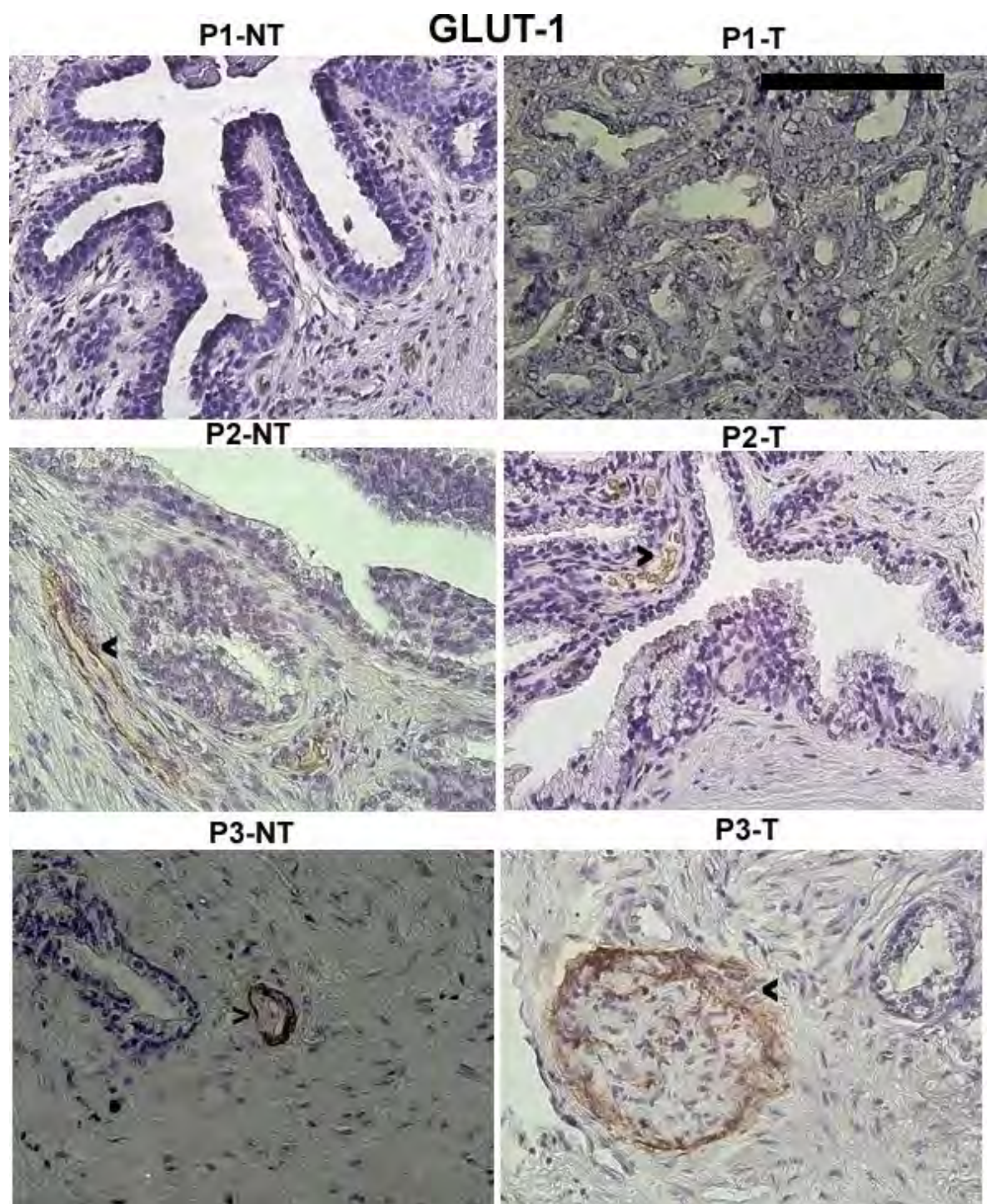
mencionado, que se encuentra bien conservado con una capa de células basales en orden y una capa de células cubicas hacia el lumen de la glándula y tinción negativa para GLUT-1. En su contraparte tumoral observamos, nuevamente, presencia de inmunotinción para GLUT-1 en glóbulos rojos (*Fig. 8*) (punta de flecha) y un epitelio menos conservado en la zona inferior de la imagen con una glándula que pierde su orden. Se observa además una superposición de núcleos lo que denota un cierto grado de malignidad en esta muestra y a su vez existe una ausencia de inmunotinción para GLUT-1 en el epitelio prostático, lo que concuerda con lo descrito previamente (Reinicke et al., 2012).

En la muestra NT del paciente 3 (P3) se observa nuevamente un nervio periférico positivo para GLUT-1 (punta de flecha), por otra parte, adyacente a esta estructura se distingue una glándula de pequeño tamaño donde se observan las características anteriormente mencionadas. En la zona estromal se ve una tinción limpia sin fondo ni precipitado inespecífico (punta de flecha). En la muestra T de este paciente, observamos una imagen similar aunque más heterogénea, donde existe una reacción positiva para GLUT-1 localizada en el recubrimiento del nervio periférico, pero ausencia de tinción epitelial. En la esquina superior izquierda de la imagen (*Fig. 8*) se observa una glándula que posee una zona bien conservada y que luego se visualiza una porción donde se desarrolla una transición hacia una mala conservación, invadiendo al estroma y perdiendo su orden lógico, siendo esta característica un criterio histopatológico primario en cáncer de próstata (Humphrey, 2007).

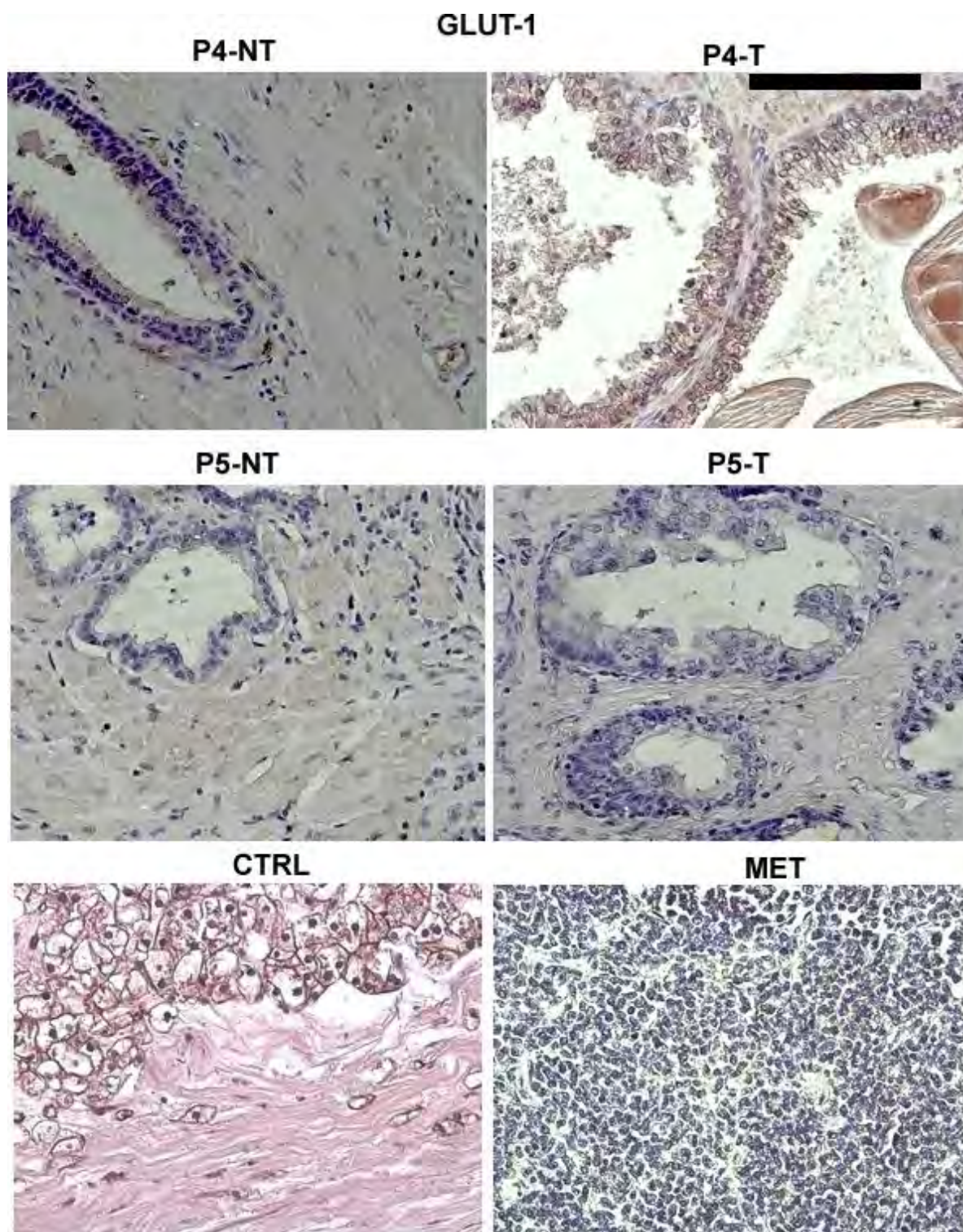
En relación al paciente 4 (P4) la muestra NT revela que no existe tinción en la glándula ni en el estroma prostático, pero si en los glóbulos rojos presentes en el tejido. Si se observa la muestra T de este paciente se visualizan glándulas con características de malignidad que no conservan un orden.

Con respecto al paciente 5 (P5), se pueden analizar las dos muestras (NT y T) debido a su limpieza tanto en estroma como en las glándulas. Por otra parte, en ambas muestras se observa la diferencia denotada anteriormente donde las glándulas tumorales son mucho más celulares que las que se aprecian en la muestra NT.

Al analizar el control positivo en un carcinoma renal de células claras se observa claramente el delineamiento de la membrana plasmática por parte de las células cancerígenas que, a pesar de su desdiferenciación, conservan la expresión de este transportador (*Fig. 8*). No se observa inmunotinción a nivel de citoplasma de las células neoplásicas (*Fig. 8*). En la muestra de metástasis en ganglio (*Fig. 8*), donde la alta celularidad no muestra un patrón de tinción claro de ninguna célula presente en el tejido.







**Figura 8. Inmunohistoquímica de GLUT-1.** Se observa la marcación en las muestras no tumorales (NT) y tumorales (T) de los 5 pacientes, su control (CTRL) y la muestra metastásica (MET). Scale

Bar 9 $\mu$ m.



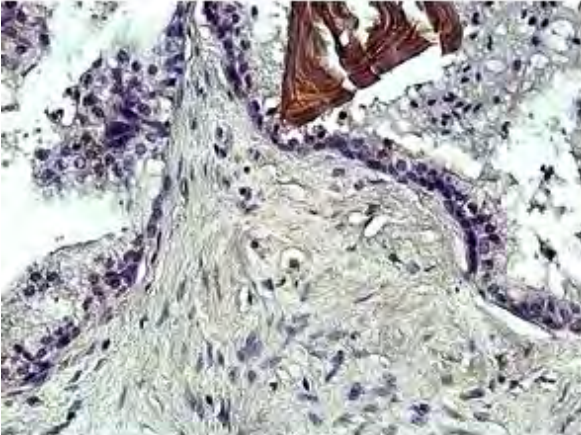
Al analizar la tinción de GLUT-2 (*Fig. 9*) se observa que, en las muestras NT de todos los pacientes (P1, P2, P3, P4 y P5) las glándulas se observan sin tinción positiva para este transportador mixto de hexosas. Sin embargo en la muestra de P4 se observa una leve tinción con un patrón citoplasmático y de membrana.

Con respecto a lo que observado en las muestras T correspondientes a los 5 pacientes, se encuentran todas las características que definen una glándula maligna, pérdida de la diferenciación morfológica normal por la formación de un mayor número de pequeñas glándulas, las distintas aberraciones nucleares como aumento del tamaño del mismo y un nucléolo prominente (P1), la pseudo estratificación de un epitelio que originalmente es un epitelio simple (P2), la obliteración de los lúmenes glandulares por parte de las células (P3) y la fusión de glándulas (P4) debido a las prolongaciones de estas mismas.

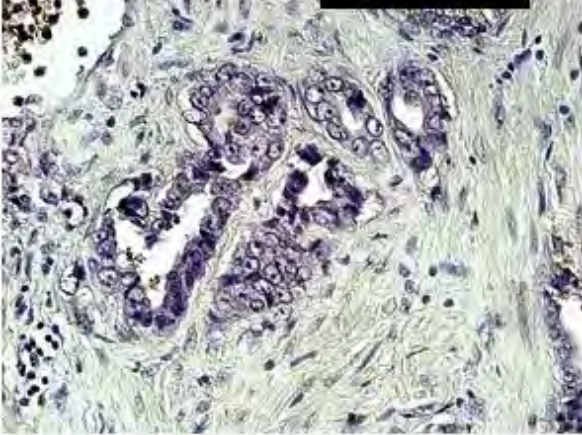
Para poder determinar la marcación del transportador y validación de la técnica, se utilizó el control positivo que corresponde a una muestra de riñón normal. La imagen revela la presencia del transportador en la zona baso lateral de la célula en los túbulos renales siendo positiva para GLUT-2. Sin embargo, la muestra metastásica no posee una marcación de estas características, siendo negativa para la presencia de GLUT-2.

# GLUT-2

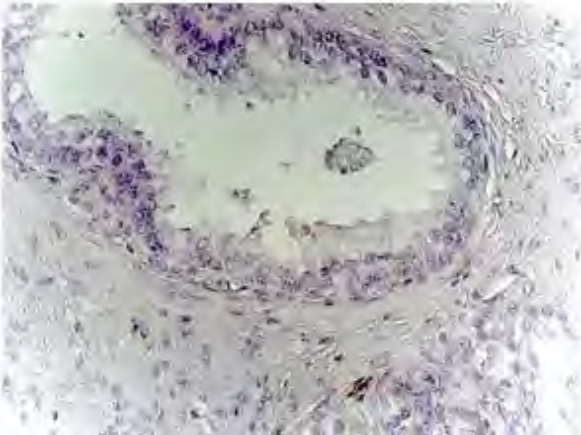
P1-NT



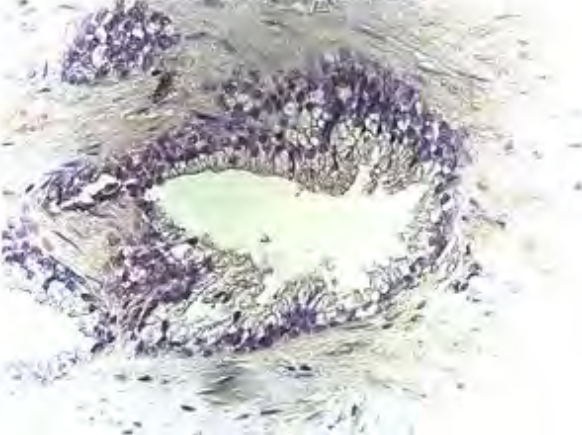
P1-T



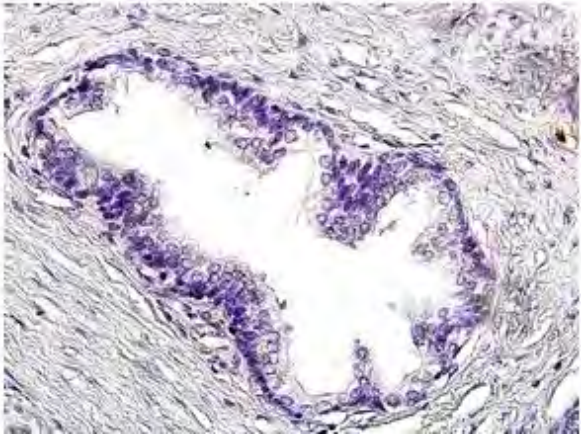
P2-NT



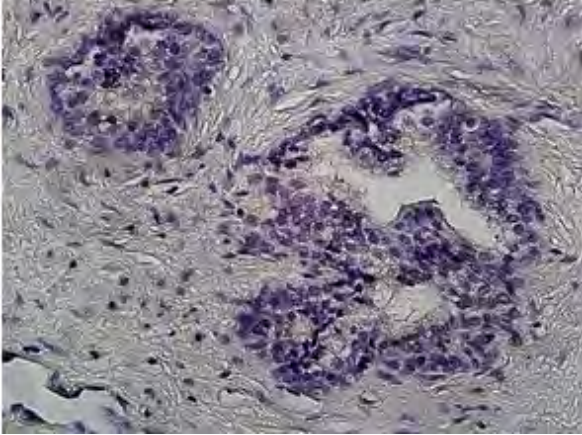
P2-T



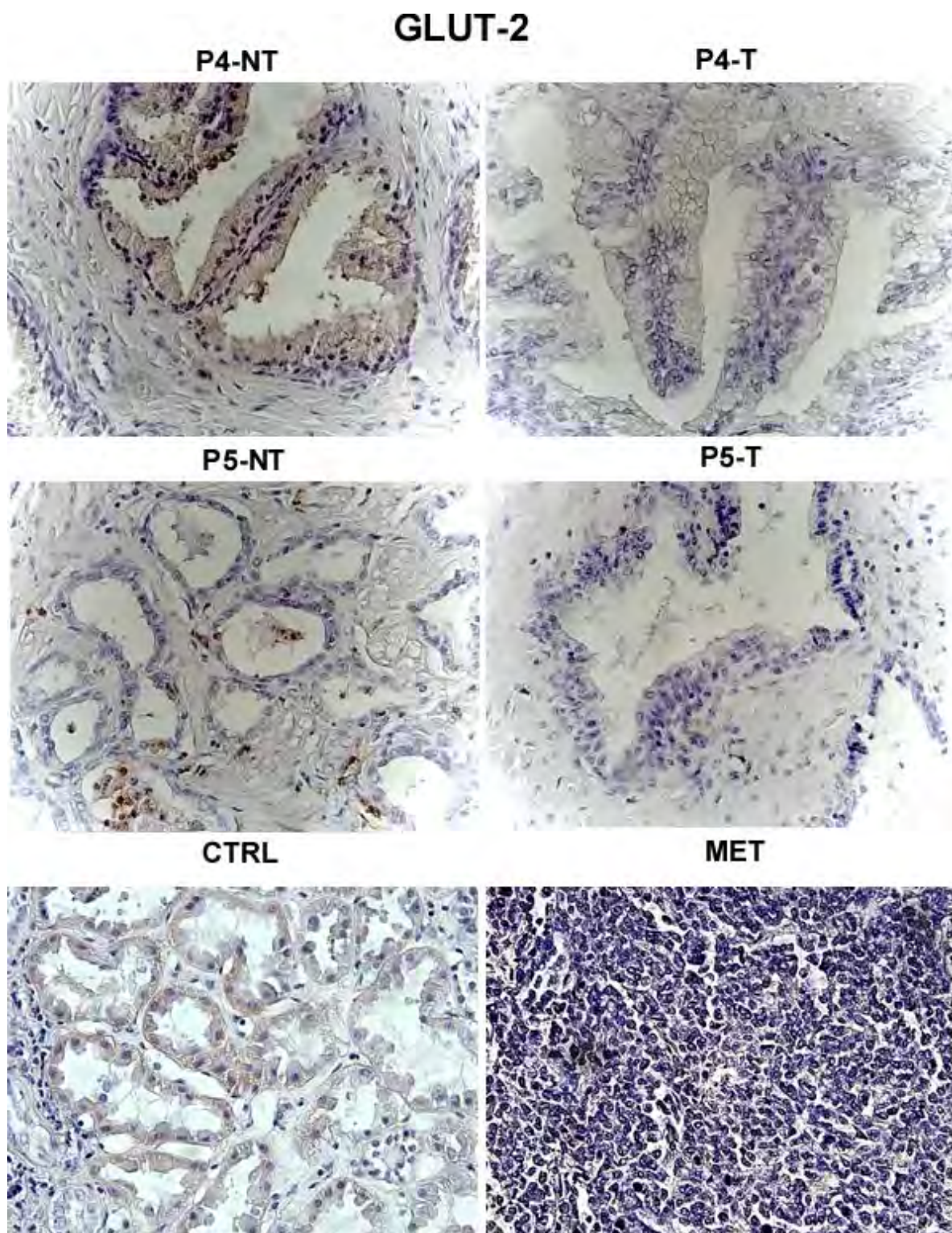
P3-NT



P3-T







**Figura 9. Inmunohistoquímica de GLUT-2.** Se observa la marcación en las muestras no tumorales (NT) y tumorales (T) de los 5 pacientes, su control (CTRL) y la muestra metastásica (MET). Scale Bar 9 $\mu$ m.

Otro transportador en estudio de inmunomarcaje es GLUT-5 (*Fig.10*) que ofrece, por su diversidad en cuanto a la intensidad de marcación, una oportunidad más amplia de analizar las muestras estudiadas.

En cuanto a las muestras NT de los pacientes (P1, P2, P3, P4 y P5) se puede observar que en P1 y P2 se encuentra una reacción positiva tanto en citoplasma como en membrana, sin embargo en P3 la marcación de este transportador se encuentra en la zona apical de la célula glandular y no en su citoplasma. En el P4 se observa un delineamiento a través de la membrana sin encontrar algún tipo de reacción en citoplasma o en una zona concreta de la membrana plasmática, por otra parte, P5 muestra un delineamiento leve de la membrana apical del epitelio que compone la glándula (*Fig. 10*) y muestra también un control positivo interno al demostrarse el inmunomarcaje de membrana en los eritrocitos que muestran una marcación positiva, tanto para GLUT-1, como para GLUT-5 (Concha et al., 1997).

Por otra parte, las muestras T sometidas a la técnica de Inmunohistoquímica para revelar la presencia o ausencia de GLUT-5 muestran la misma variedad de marcación que su contraparte NT. Como se observa en P1, se muestra una marcación citoplasmática y de membrana, sin embargo P2 y P4 sólo delinea la membrana de las células glandulares, mientras que en P5 sólo se observa una reacción positiva para el transportador en la zona apical de la membrana plasmática.

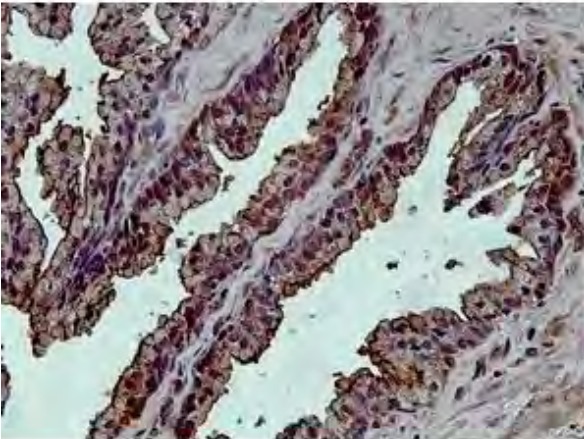
A diferencia del resto de los tejidos, la muestra tumoral T correspondiente al paciente P3 demuestra la mayor marcación para este transportador, una marcación netamente mixta (membrana y citoplasma), a diferencia de su contraparte no tumoral (NT) que demuestra solo una marcación de membrana.

En cuanto al control positivo (*Fig. 10*), una muestra de riñón benigno, se observa una marcación tanto citoplasmática como de membrana, sin embargo, la marcación de membrana se observa en la zona apical de esta y no en la zona baso lateral como se observa en GLUT-2.

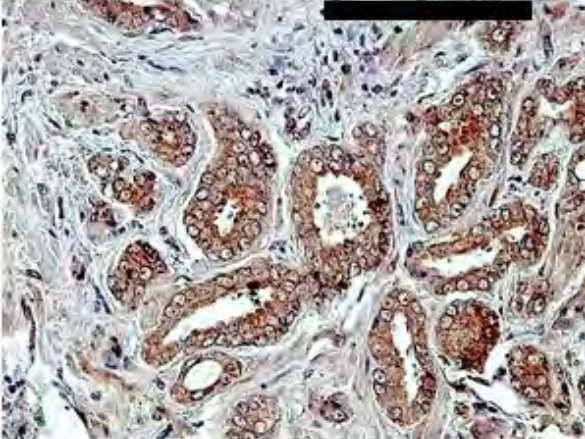


GLUT-5

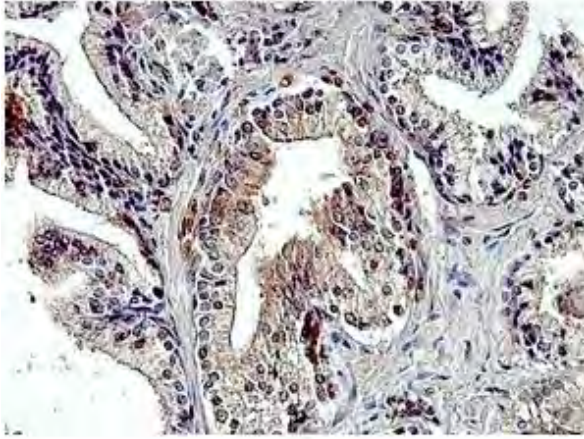
P1-NT



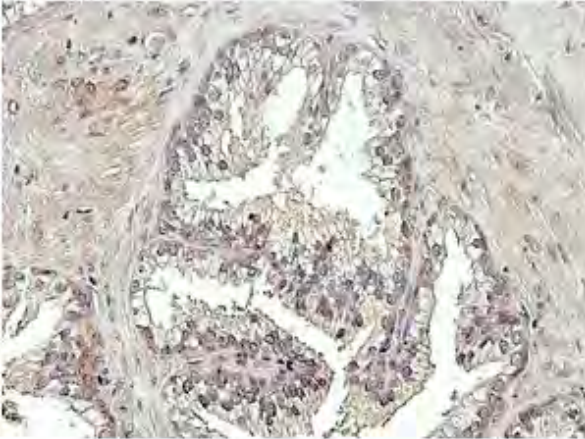
P1-T



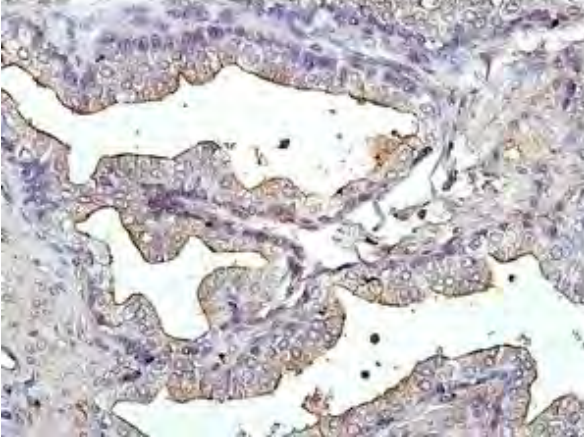
P2-NT



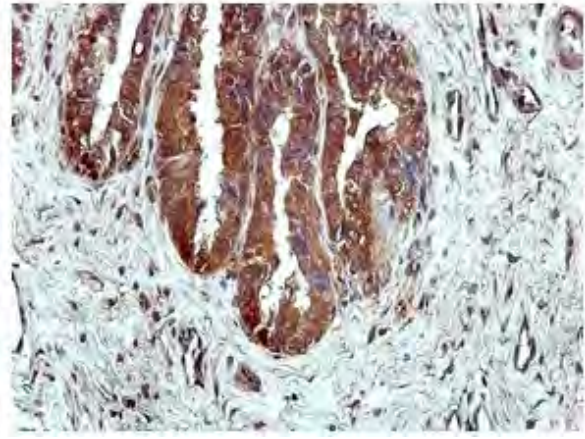
P2-T



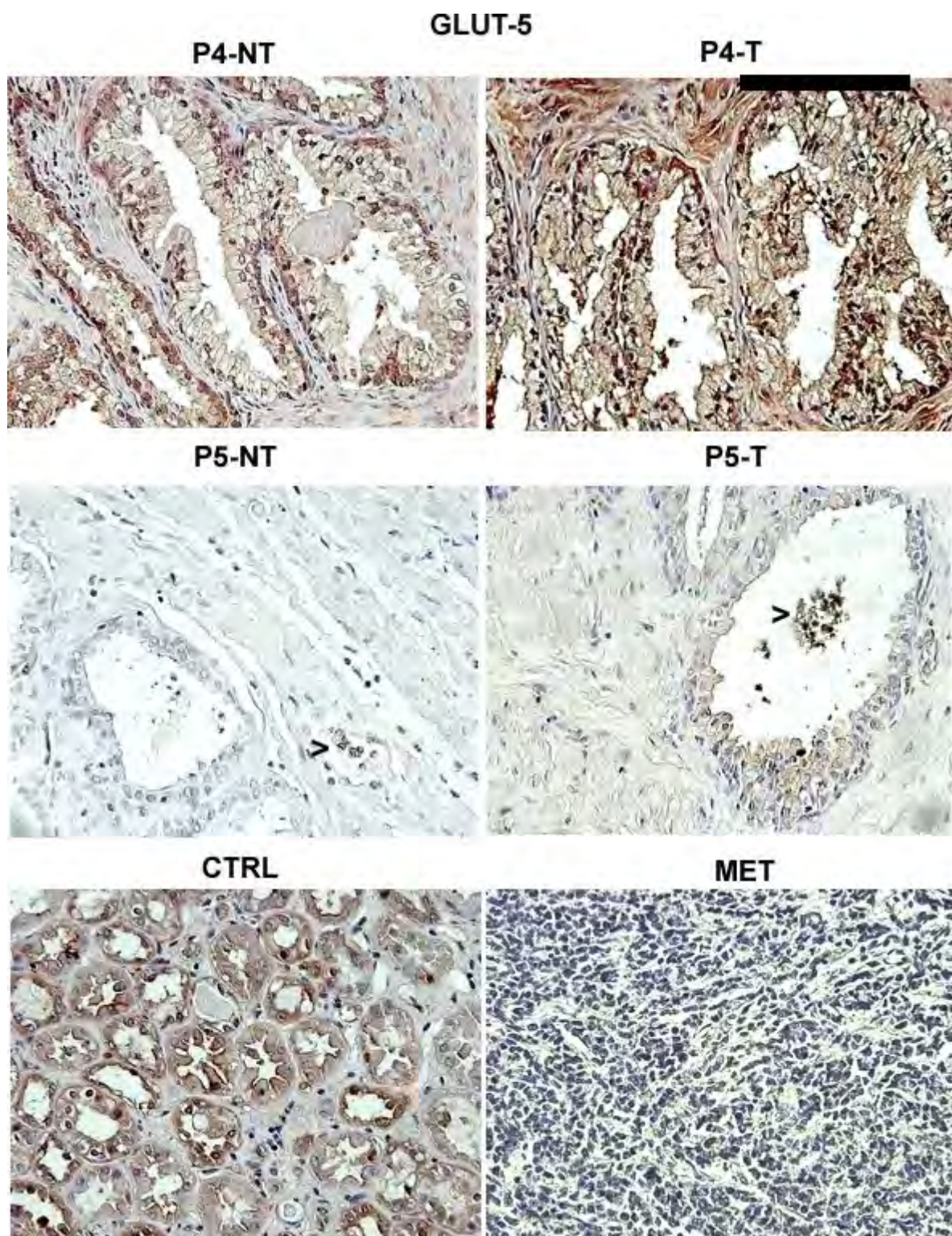
P3-NT



P3-T





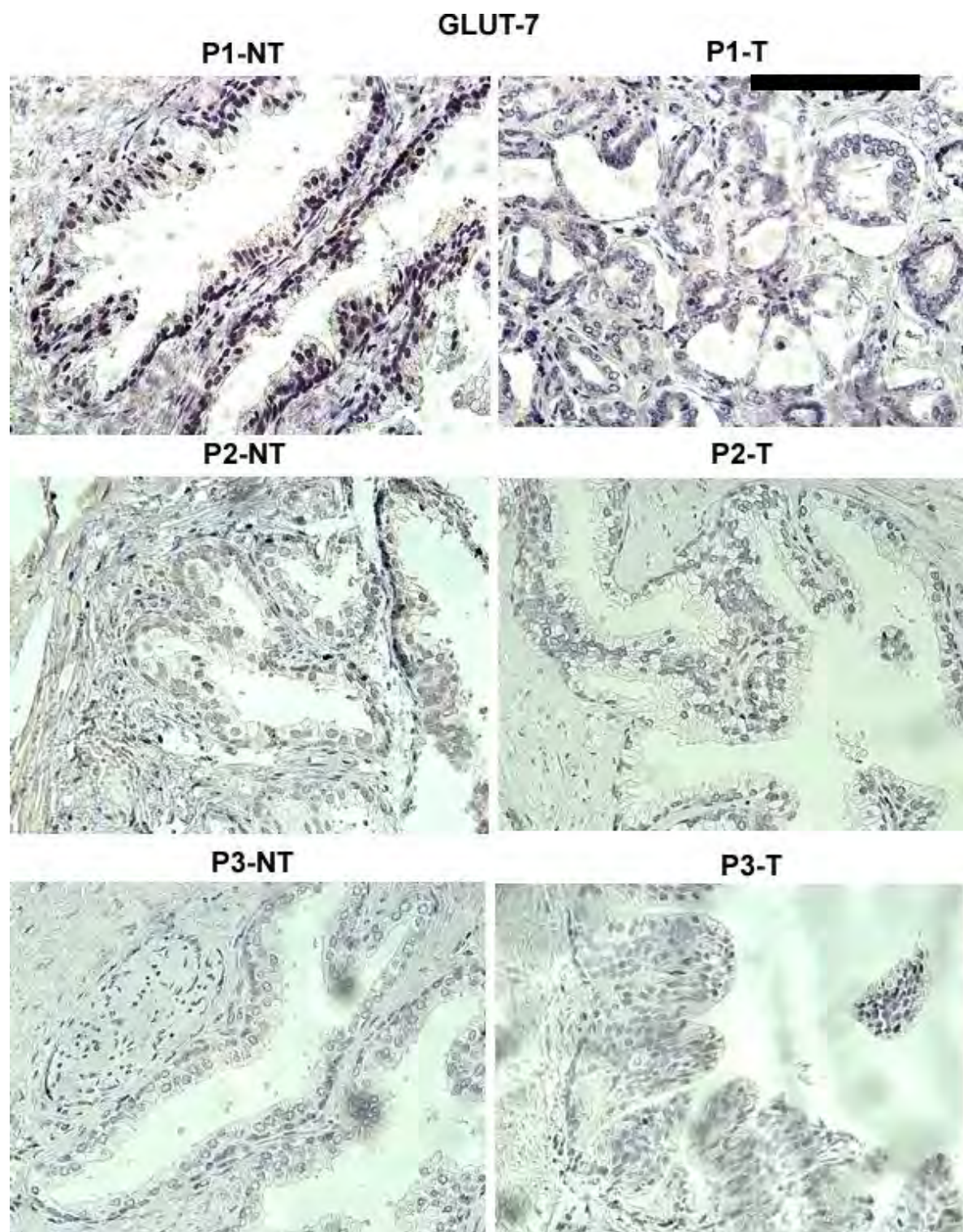


**Figura 10. Inmunohistoquímica de GLUT-5.** Se observa la marcación en las muestras no tumorales (NT) y tumorales (T) de los 5 pacientes, su control (CTRL) y la muestra metastásica (MET). Scale Bar 9 $\mu$ m.

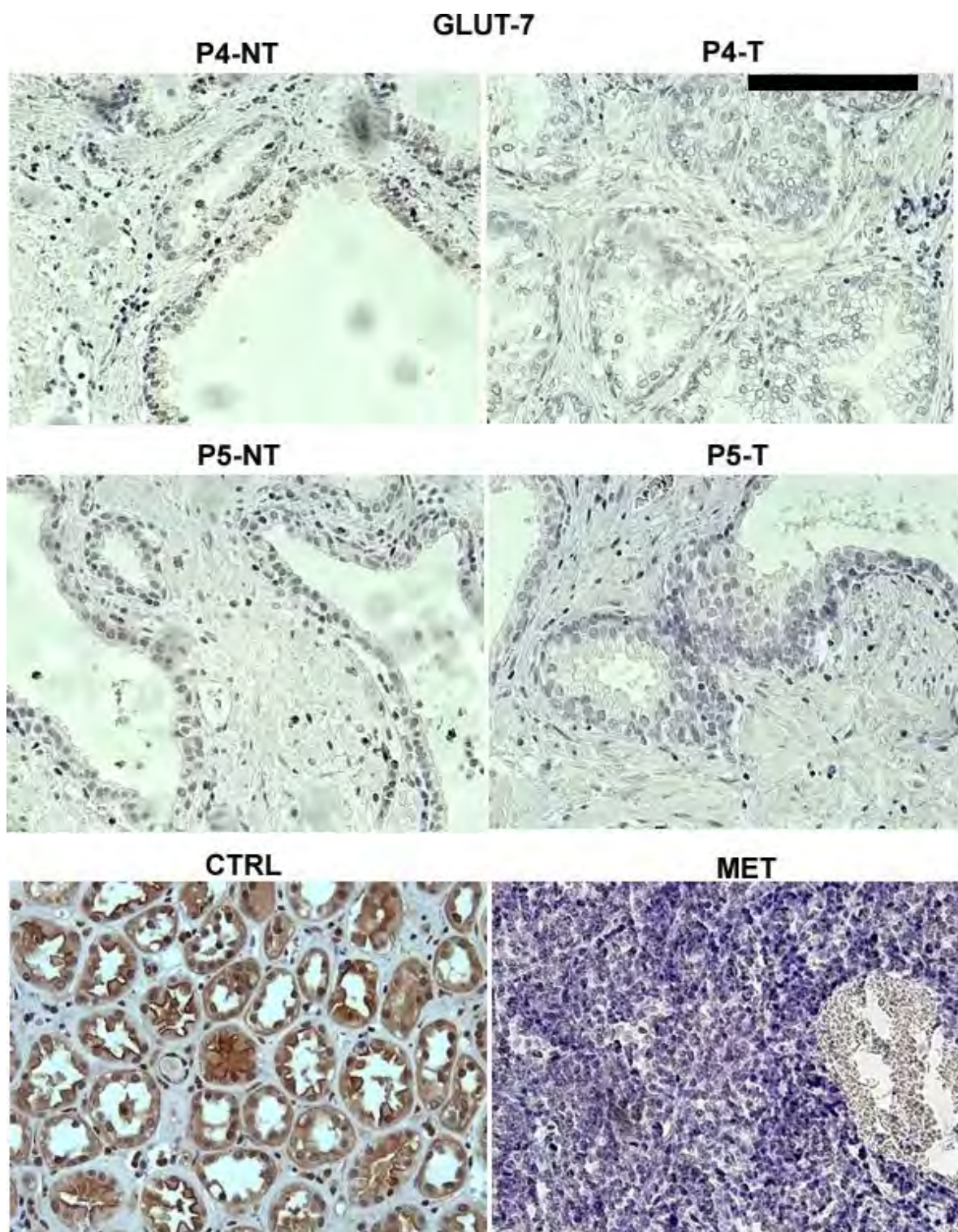
Con respecto a otro transportador de interés GLUT-7 (*Fig. 11*) perteneciente a la clase II (transportadores de fructosa) se puede destacar la reacción negativa en todas las muestras no tumorales (NT) de los 5 pacientes, tanto en las glándulas analizadas como también en el estroma circundante. Hasta el momento, no existen reportes en inmunotinción en próstata de un control positivo interno de GLUT-7 (*Fig.11*), como existe en otros transportadores donde estructuras tisulares pueden ser positivas para GLUT-1 y 5. En cuanto a las muestras tumorales (T), a las cuales se les realizó la técnica, ninguno de los cortes histológicos demostró positividad para la reacción deseada tanto en epitelio como en estroma.

El control positivo para este marcador donde se utilizó una muestra de riñón benigno (*Fig. 11*), se observa una marcación mixta de membrana plasmática, principalmente en la zona apical de la membrana y de citoplasma.









**Figura 11. Inmunohistoquímica de GLUT-7.** Se observa la marcación en las muestras no tumorales (NT) y tumorales (T) de los 5 pacientes, su control (CTRL) y la muestra metastásica (MET). Scale

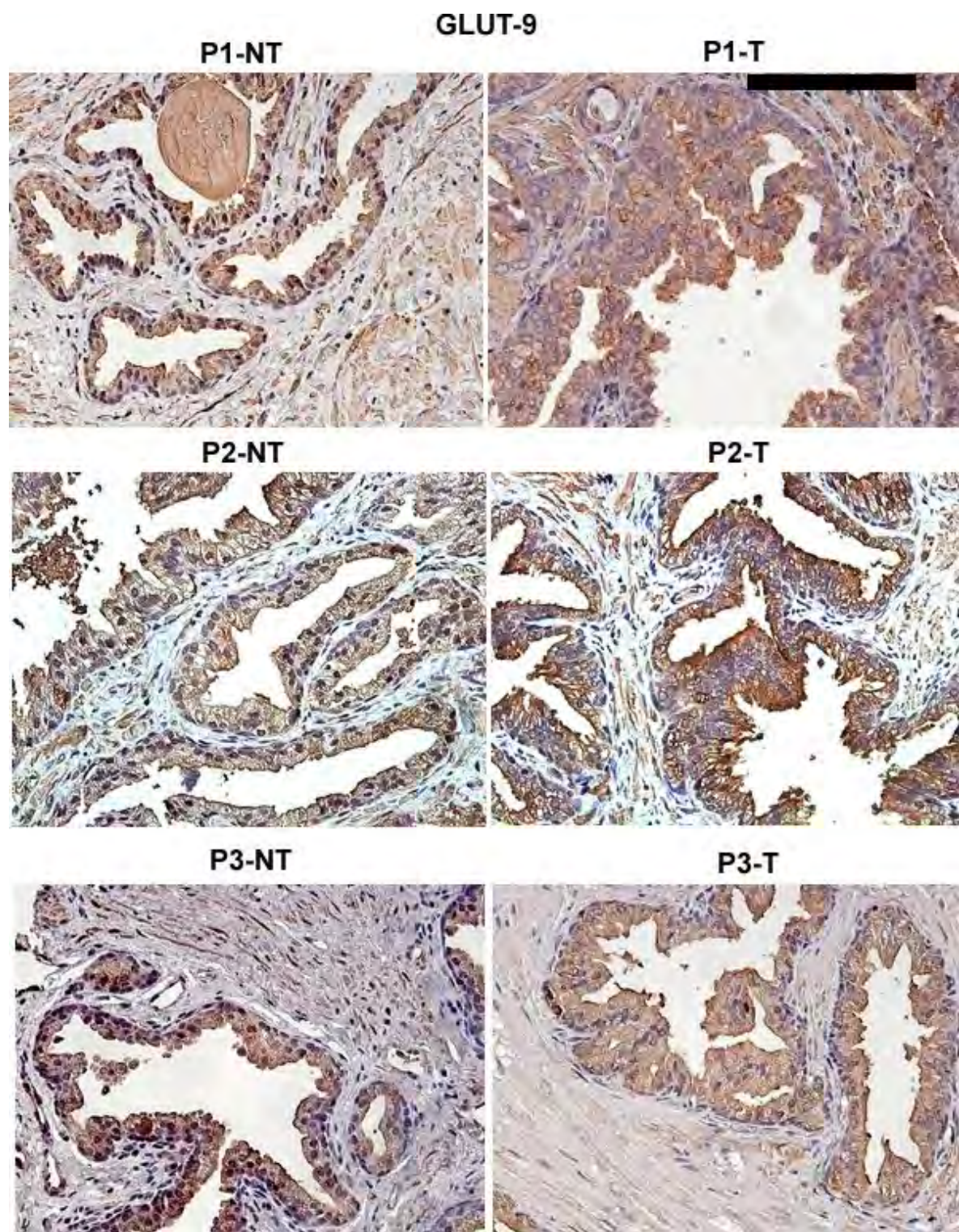
Bar 9 $\mu$ m.

Finalmente, en GLUT-9 (*Fig. 12*) de muestras no tumorales (NT) de todos los pacientes se observa una marcación de membrana/citoplasma. En P1 y P5 se denota mayormente la reacción citoplasmática, sin embargo, en P2 vemos una marcación de membrana plasmática donde esta se delinea con la reacción de DAB (Diaminobencidina) evidenciando la presencia del antígeno en esta estructura de la célula. En P3 está presente la marcación mixta aunque se observa una tinción más intensa hacia la zona apical de la célula. Es importante destacar la existencia de un patrón de marcación compacto, correspondiente a la morfología de haces fibrilares transversales y longitudinales y que corresponde posiblemente a una marcación de células musculares lisas en el estroma (*Fig.12*), lo que se corresponde con lo reportado previamente de este transportador mediante Inmunocitoquímica (*Fig. XX*, punta de flecha) (Pyla, Poulouse, Jun, & Segar, 2013).

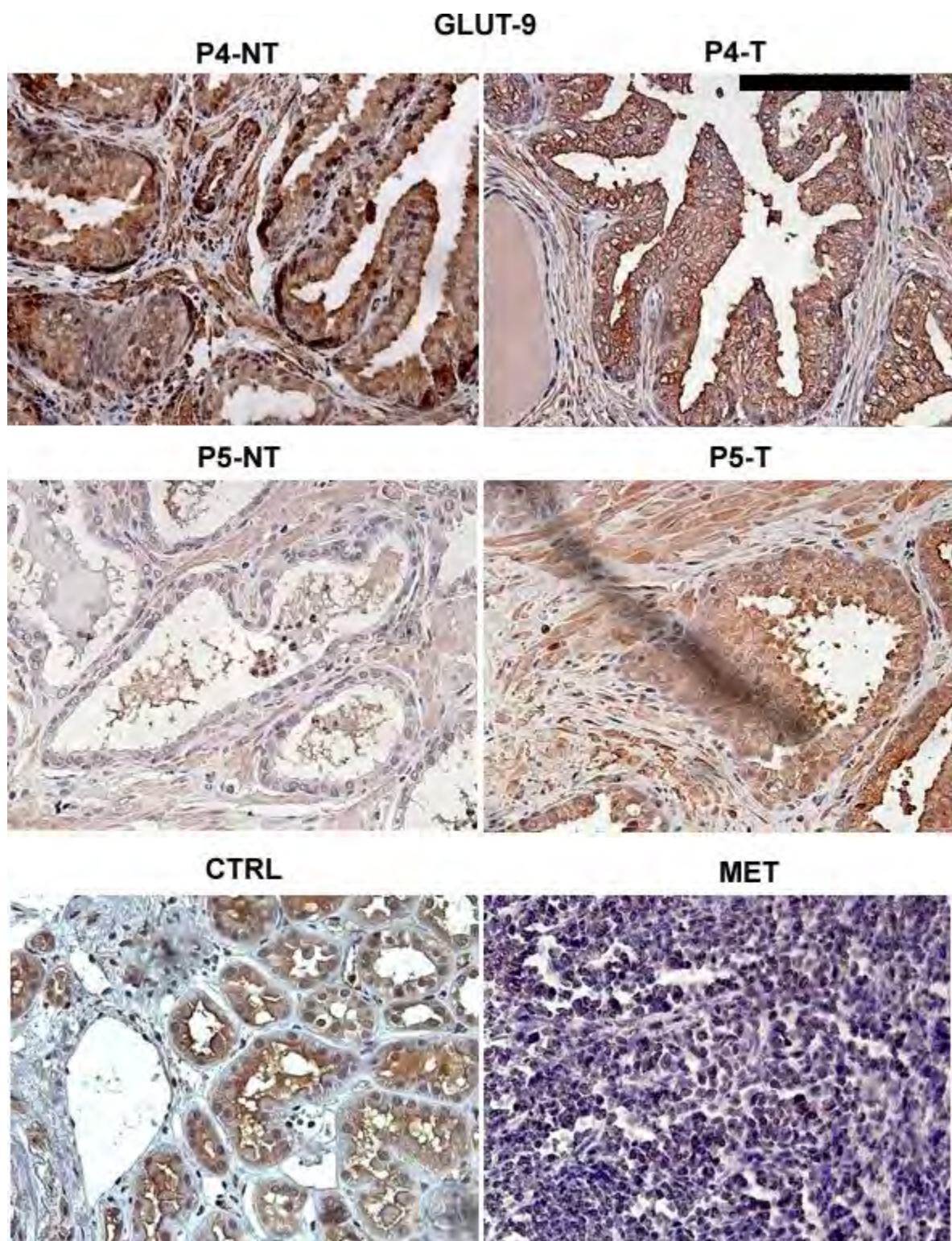
En las muestras tumorales (T) podemos observar en la mayoría de los pacientes (P2, P3, P4 y P5) una reacción citoplasmática intensa pero una mayor intensidad de reacción en la zona apical de las células glandulares. En P1 se observa un patrón de marcación citoplasmático, sin embargo, no se denota una mayor reacción en la zona apical de las células.

En el control positivo de la reacción cabe destacar que al igual que en GLUT-2, 5 y 7 fue utilizada una muestra de riñón benigno (*Fig. 12*), donde se evidencia la misma reacción tisular que en P2, P3, P4 y P5.









**Figura 12. Inmunohistoquímica de GLUT-9.** Se observa la marcación en las muestras no tumorales (NT) y tumorales (T) de los 5 pacientes, su control (CTRL) y la muestra metastásica (MET). Scale Bar 9 $\mu$ m.

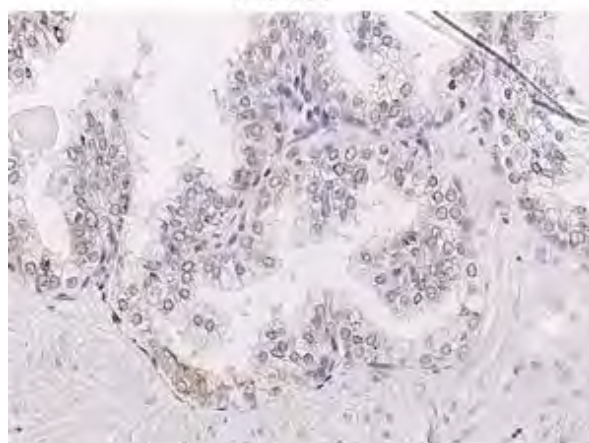
Con respecto a la marcación de GLUT-11, se puede observar en P1 en su muestra no tumoral que existe un marcaje citoplasmático difuso (*Fig. 13*), sin embargo este patrón se acentúa hacia la región perinuclear en algunas células aisladas en su contraparte tumoral (*Fig. 13*). En P2 se muestra que existe una ausencia de tinción tanto en su muestra no tumoral, como en su contraparte tumoral. Con respecto a P3 en su muestra no tumoral, existe un patrón de marcación predominantemente citoplasmático en el epitelio prostático que puede identificarse más cercanamente al núcleo, sin embargo el patrón de tinción que se observa en su contraparte tumoral muestra una mayor intensidad como también una tinción citoplasmática (*Fig. 13*). Además, en esta muestra tumoral puede apreciarse la tinción con un patrón perinuclear mayormente en células únicas o de forma aislada (*Fig. 13*). En P4 se observa una marcación intensa alrededor del núcleo en sus muestras no tumorales (*Fig. 13*), además esta tinción corresponde a epitelio que posee características de desdiferenciación, como pérdida de células basales en la morfología, sin embargo en su contraparte tumoral existe una tinción mayormente citoplasmática en porciones aisladas del epitelio prostático (*Fig. 13*). Finalmente en P5 en su muestra no tumoral, observamos nuevamente un patrón citoplasmático pero con una mayor intensidad alrededor del núcleo en algunas muestras no tumorales, sin embargo en su contraparte tumoral se observa un patrón de tinción citoplasmático, pero acentuado mayormente hacia alrededor del núcleo en algunas células aisladas. Finalmente, en el tejido de riñón utilizado como control positivo, se observa satisfactoriamente un patrón de marcaje citoplasmático, por lo que este marcador se ha validado en la técnica.

Todas las muestras metastásicas para GLUT-1, 2, 5, 7, 9 y 11 no presentaron ningún tipo de marcación y, tampoco presentaron controles internos que evidenciaran la especificidad del anticuerpo y la validación de la técnica.

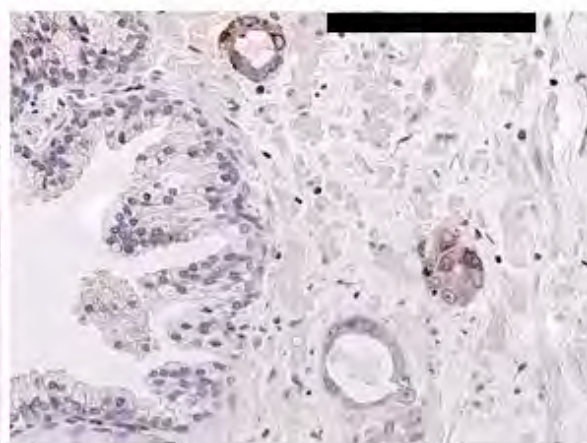


## GLUT-11

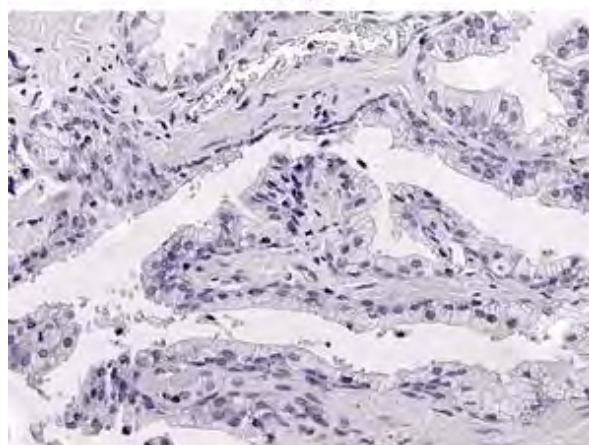
P1-NT



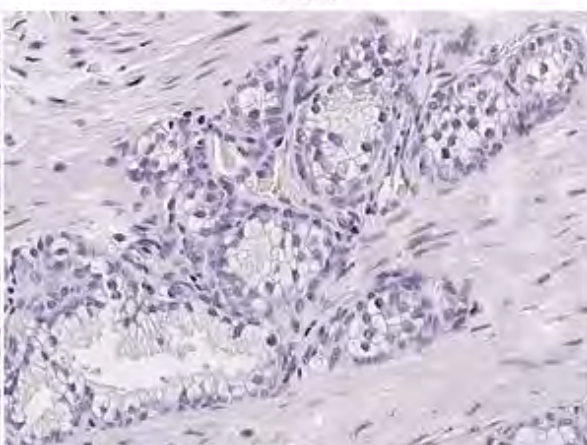
P1-T



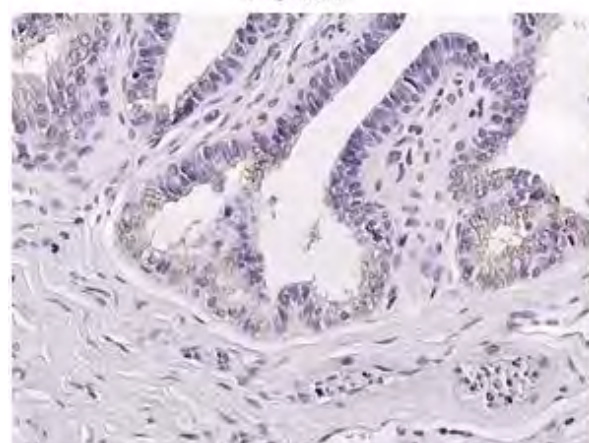
P2-NT



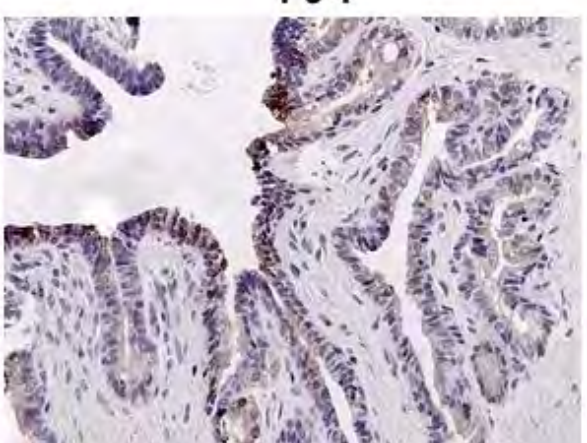
P2-T



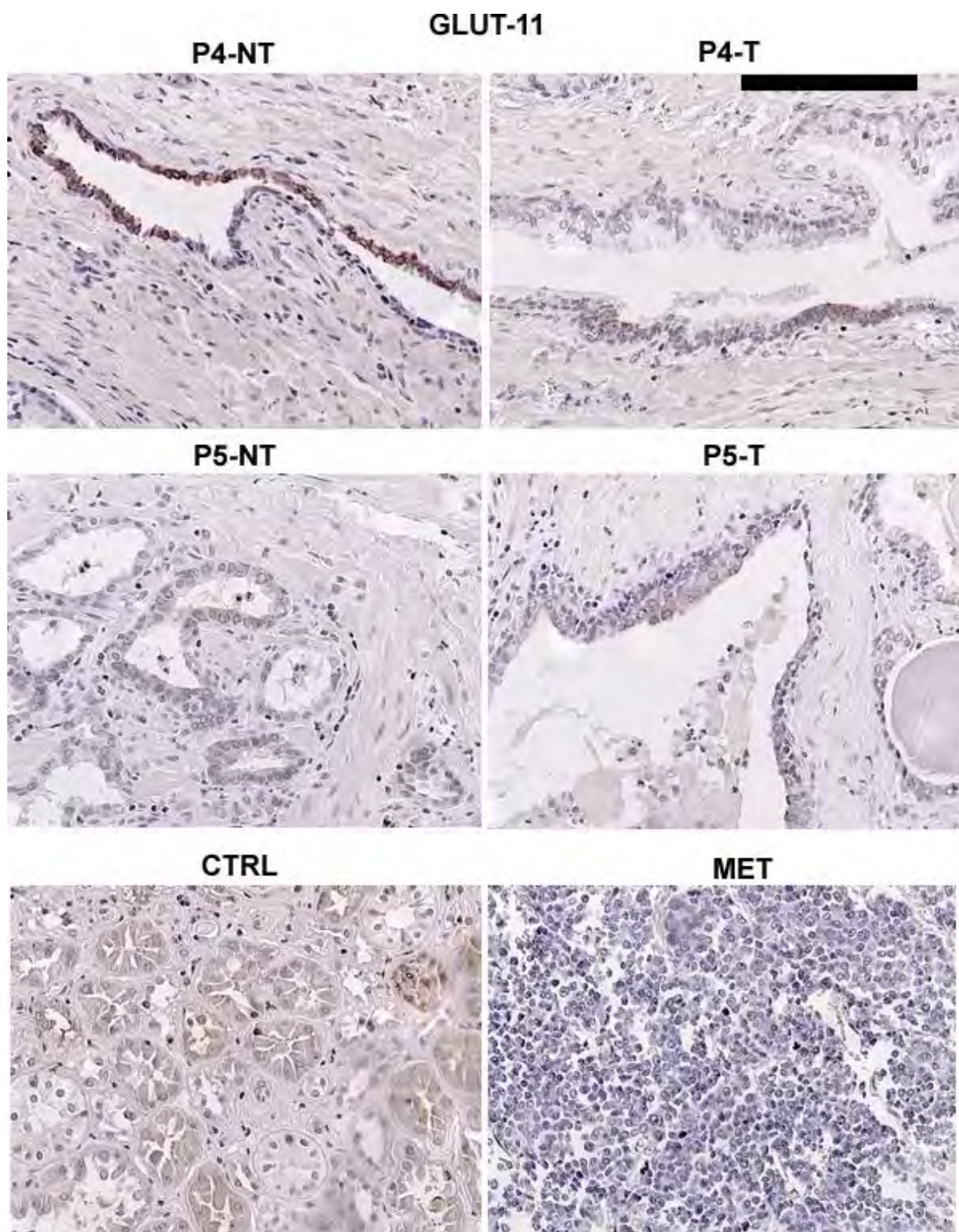
P3-NT



P3-T







**Figura 13. Inmunohistoquímica de GLUT-11.** Se observa la marcación en las muestras no tumorales (NT) y tumorales (T) de los 5 pacientes, su control (CTRL) y la muestra metastásica (MET). Scale Bar 9 $\mu$ m.

3.- *Estudiar la expresión de enzimas glicolíticas hexoquinasa y fructoquinasa y, cuantificar masas mitocondriales en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la castración.*

#### **7.4 Expresión de $\alpha$ -KGD y PDH en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica.**

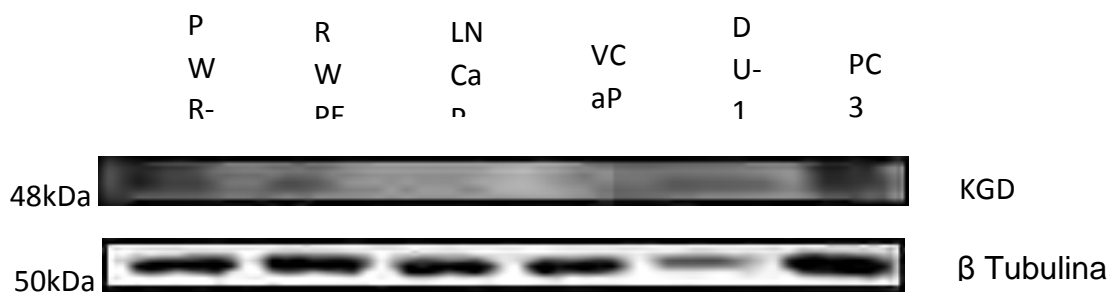
En una primera instancia se estudiaron dos enzimas clave en la respiración celular y el destino metabólico de los productos finales del ingreso de hexosas en las células respectivamente;  $\alpha$ -KGD (Tretter & Adam-Vizi, 2005) que se encuentra involucrada en el balance redox durante la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato a Succinil-CoA con el acoplamiento generador de especies reductoras como NADH durante el ciclo del ácido cítrico dentro de la mitocondria, y PDH (Brown, Otero, LeGris, & Brown, 1994) cuya función y estabilidad es clave en el metabolismo de conversión de piruvato proveniente de hexosas a Acetil-CoA en la mitocondria, para estimar la actividad mitocondrial funcional y cuál vía podría estar utilizándose en preponderancia para obtener ATP en la célula. Para esto se realizó la técnica de western blot que evidencia la mayor o menor expresión de estas enzimas de forma cualitativa.

##### **7.4.1 Expresión cualitativa de $\alpha$ -KGD en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica.**

La expresión proteica mediante inmunodetección se controló utilizando  $\beta$ -tubulina, reportado como un control de carga para proteínas que pueden encontrarse en bajos niveles (Eaton et al., 2013) y que evidenció que las concentraciones de proteína en la muestra fueron equivalentes. La inmunodetección de la proteína de interés se realizó con el anticuerpo primario anti  $\alpha$ -KGD (*Santa Cruz*) a una dilución 1:1000 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y posterior detección con anticuerpo secundario IgG policlonal conjugado con HRP anti conejo. Los resultados de expresión proteica en la línea celular de próstata benigna PWR-1E en forma independiente muestran que existe una alta



expresión de esta enzima que se traduce en una alta intensidad de banda lo que concuerda con los valores de densitometría cercanos a 1,5 (Fig. 15). Sin embargo, en la línea celular de próstata benigna RWPE-1 la intensidad de banda que se refleja es menor, lo que se traduce a su vez en un menor valor determinado por densitometría, cercano a 0,5 (Fig. 15). Los resultados que muestran las intensidades de las bandas de las líneas celulares LNCaP y VCaP demuestran los niveles de expresión más bajos de esta enzima, a su vez esto concuerda con los bajos valores asignados por la densitometría correspondientes a 0,5 y menos de 0,5 aproximadamente. DU145 demostró niveles de intensidad superiores a las tres líneas celulares ya descritas, sin embargo los niveles más altos de expresión cualitativa de esta enzima a nivel de intensidad de bandas como en valor asignado a esta intensidad mediante densitometría corresponden a PC3, alcanzando un valor cercano de 2,0.



**Figura 14. Expresión proteica para la enzima  $\alpha$ -KGD en líneas celulares de próstata benigna (PWR-E1 y RWPE-1), cáncer de próstata sensible a la deprivación androgénica (LNCaP y VCaP) y cáncer de próstata resistente a la deprivación androgénica (DU-145 y PC3). La dilución del anticuerpo  $\alpha$ -KGD se realizó 1:1000, como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti conejo conjugado con HRP. Se utilizó  $\beta$ -Tubulina como control de carga.**

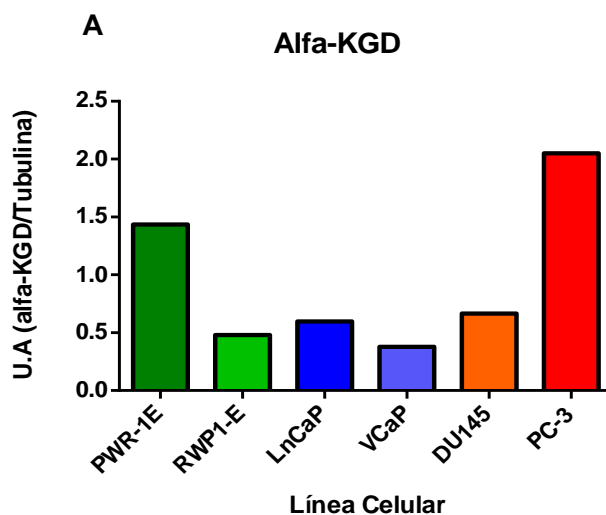
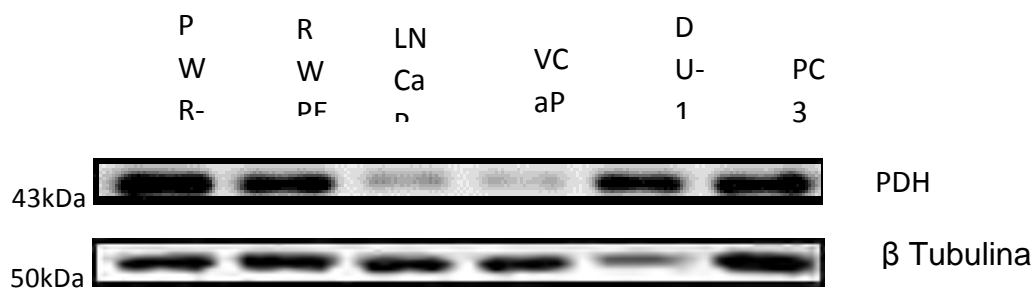


Figura 15. Cuantificación relativa de la expresión proteica de  $\alpha$ -KGD mediante densitometria utilizando ImageJ. U.A: Unidades arbitrarias.

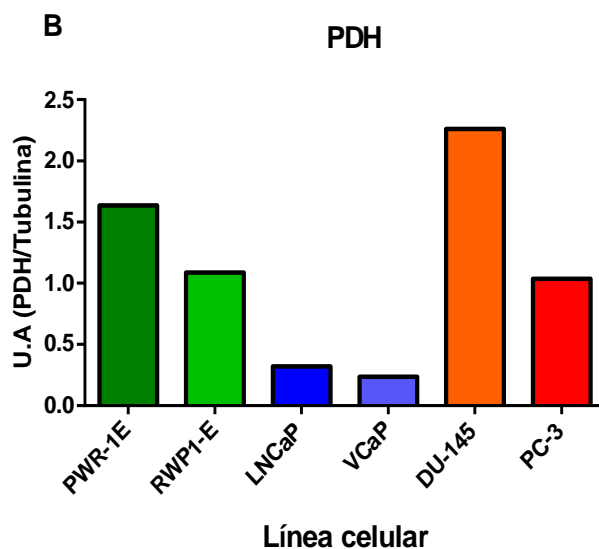
#### **7.4.2 Expresión cualitativa de PDH en líneas celulares de próstata benigna, cáncer de próstata sensible a la privación androgénica y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica.**

La expresión proteica mediante inmunodetección se controló utilizando  $\beta$ -tubulina al igual que  $\alpha$ -KGD, lo que validó la concentración de proteína en cantidades equivalentes en la carga del gel para la posterior electroforesis y a su vez los valores de inmunodetección realizados por densitometría. Para esto, se realizó la inmunodetección de la proteína de interés PDH utilizando el anticuerpo primario anti PDH (*Abcam*) a una dilución 1:2000, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y posterior detección con anticuerpo secundario IgG policlonal conjugado con HRP anti conejo (*Dako*). Los resultados que muestra la técnica de western blot a través de la detección proteica de PDH evidencian que existe una alta expresión en la línea celular de próstata benigna PWR-1E reflejada en una mayor intensidad de banda (*Fig. 16*), lo que a su vez el valor concuerda con el asignado en la cuantificación de esta intensidad, que es superior a 1,5 (*Fig. 17*). La línea celular de próstata benigna RWPE-1 a su vez demuestra una menor intensidad de banda (*Fig. 16*) en relación a la línea celular anteriormente descrita y que concuerda también con un valor menor en la cuantificación correspondiente a 1,0 (*Fig. 17*). Sin embargo, las intensidades

reflejadas en la banda de las líneas celulares de cáncer de próstata sensible a la privación androgénica LNCaP y VCaP demuestran los menores niveles (*Fig. 16*), lo que a su vez concuerda con los valores de cuantificación que corresponden a menos de 0,5 aproximadamente (*Fig. 17*). En contra parte, la línea celular de cáncer de próstata resistente a la privación androgénica DU145 refleja una intensidad de banda mucho mayor (*Fig. 16*), lo que se traduce correctamente en el valor más alto asignado a la cuantificación en comparación al resto de las líneas celulares antes descritas, con una cifra superior a 2,0 (*Fig. 17*). Finalmente, la expresión de esta enzima presenta una alta intensidad de banda en la línea celular de cáncer de próstata resistente a la privación androgénica PC3 (*Fig. 16*), pero reflejado en un menor valor por cuantificación cercano a 1,0 (*Fig. 17*).



**Figura 16. Expresión proteica para la enzima PDH en líneas celulares de próstata benigna (PWR-E1 y RWPE-1), cáncer de próstata sensible a la privación androgénica (LNCaP y VCaP) y cáncer de próstata resistente a la privación androgénica (DU-145 y PC3).** La dilución del anticuerpo PDH se realizó 1:2000, como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti conejo conjugado con HRP. Se utilizó  $\beta$ -Tubulina como control de carga.



*Figura 17. Cuantificación relativa de la expresión proteica de PDH mediante densitometria utilizando ImageJ. U.A: Unidades arbitrarias.*

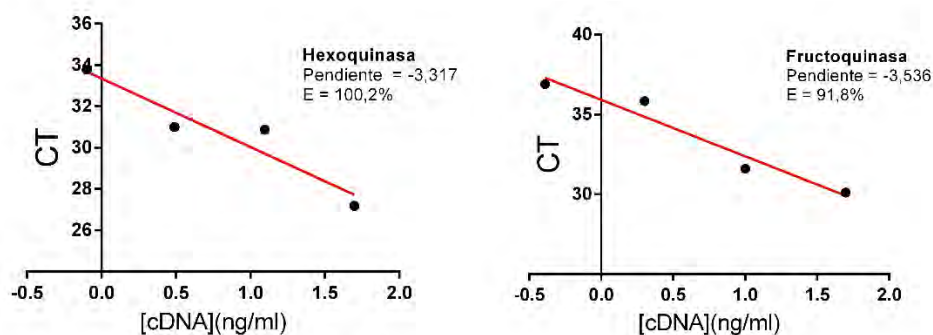
En resumen, se observó una menor intensidad de banda y una menor cuantificación de estas en las enzimas  $\alpha$ -KGD y PDH correspondiente a las líneas celulares LNCaP y VCaP, lo que finalmente se traduce en una menor expresión de estas enzimas, además ambas líneas celulares son sensibles a la privación androgénica. Sin embargo se encontraron niveles mayores de expresión en las líneas celulares prostáticas benignas PWR-1E y RWP1-E, como también los niveles de expresión re establecidos en las líneas celulares de cáncer prostático metastásicas DU-145 y PC3.

## 7.5 Expresión de mRNA de enzimas que participan en el metabolismo de hexosas por medio de qRT-PCR.

Por medio de qRT-PCR se estudiaron las enzimas glicolíticas clave reportadas en la literatura en el metabolismo aumentado de células cancerígenas y síndrome metabólico; Hexoquinasa (Feliciano, 2013) y Fructoquinasa (Ishimoto et al., 2012) a nivel de mRNA.

### 7.5.1 Eficiencia de partidores para las enzimas Hexoquinasa y Fructoquinasa.

Mediante una curva estándar utilizada en qRT-PCR se midió la eficiencia de los partidores de cada uno de los cDNA de las enzimas Hexoquinasa y Fructoquinasa, obteniendo así el ciclo umbral ( $C_T$ ) de cada gen para cada enzima. Esta curva se realizó por diluciones seriadas a partir de una concentración de cDNA conocida (dilución 1:5), por lo que cada valor  $C_T$  en la gráfica correspondió al doble del valor  $C_T$  que le precede. Estos valores se graficaron obteniéndose una pendiente, la cual permitió calcular la eficiencia según el algoritmo anteriormente descrito, obteniéndose una eficiencia de los partidores para la enzima hexoquinasa de un 100.2% y para la enzima fructoquinasa una eficiencia igual a 91.8% (Fig 18).



**Figura 18.** Eficiencia de los partidores de hexoquinasa y fructoquinasa. Se observa la eficiencia ( $E$ ) de cada partidor y su pendiente ( $m$ ).

### 7.5.2 Expresión de mRNA de las enzimas Hexoquinasa y Fructoquinasa.

En el análisis realizado a las líneas celulares para cuantificar la expresión relativa de mRNA de las enzimas fructoquinasa y hexoquinasa, se observa un incremento significativo de la enzima fructoquinasa en la línea celular PC3 con respecto a su contraparte benigna RWP-E1 (Fig. 19a). Por otra parte, otras líneas celulares malignas (LNCaP, C4-2 y DU-145) no presentan un aumento en la expresión, sino más bien una disminución no significativa del mRNA de esta enzima cuando se compara con las líneas celulares benignas (RWP-E1 y PWR1-E) (Fig. 19a).

En relación a la enzima hexoquinasa, se observa una mayor expresión por parte de ésta en las líneas celulares RWPE-1 y PWR-1E (Fig. 19b) por parte de las líneas celulares de próstata con distintos grados de desdiferenciación, además se aprecia una expresión relativa significativamente menor, sin embargo no disminuye de forma proporcional de acuerdo a la agresividad de la línea celular (Fig. 19b).

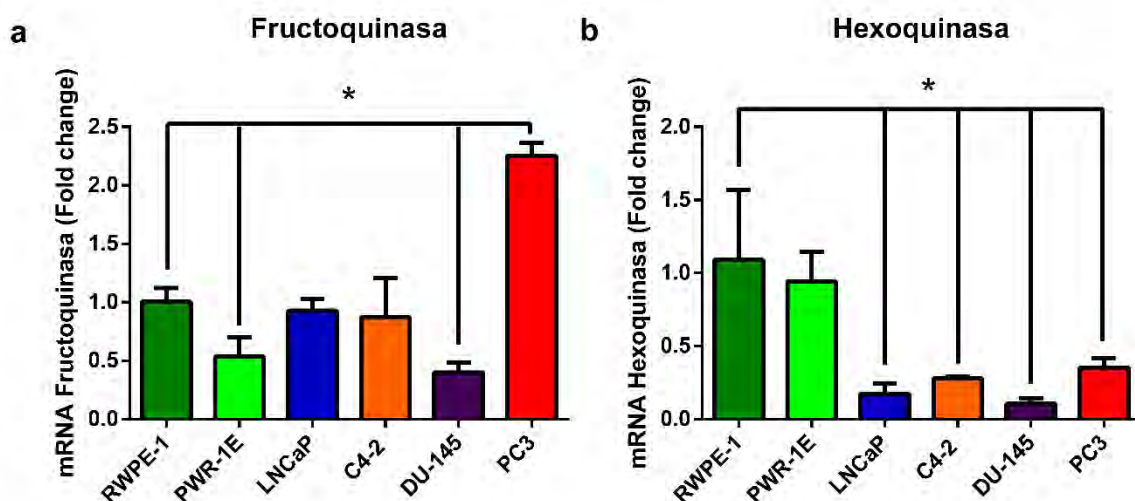
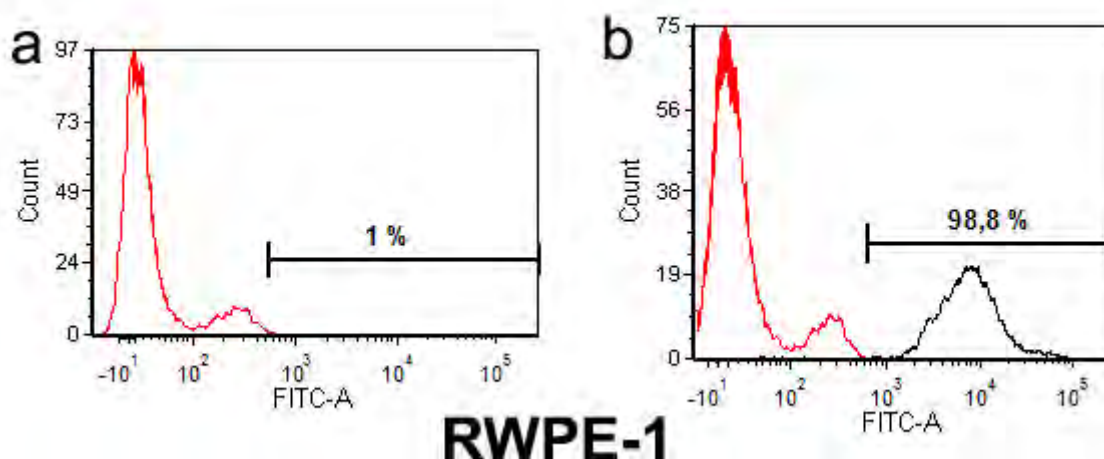


Figura 19. Expresión relativa (fold change) de mRNA de Fructokinasa (a) y Hexokinasa (b). Se observa la expresión a nivel de RNA mensajero por parte de las líneas celulares mediante qRT-PCR y análisis de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  con un N=3. Significancia estadística (\*) se fijó por  $P < 0.05$  mediante análisis ANOVA de una vía.

En resumen, la enzima Fructoquinasa, una enzima que tiene una alta especificidad por fructosa, presentó niveles de expresión notablemente mayores en líneas celulares de cáncer de próstata metastásico (PC3) contrariamente a la expresión de la enzima Hexoquinasa, que tiene alta especificidad por glucosa, la que mostró niveles de expresión notablemente disminuidos.

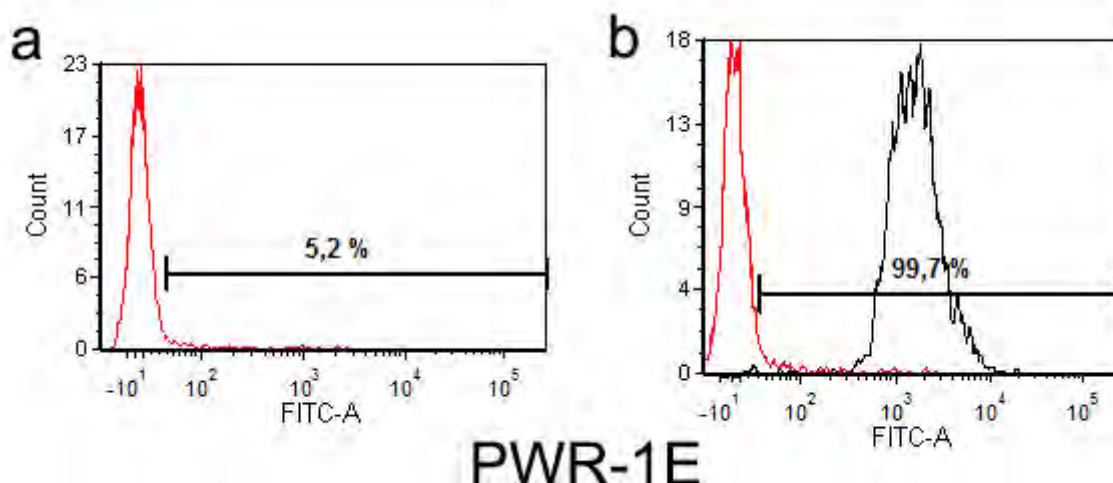
### **7.6 Citometría de Flujo.**

En cuanto a los datos que arrojó la citometría de flujo se observa que en la línea celular RWPE-1 el fondo de la muestra corresponde al 1% de la medición (*Fig. 20a*) lo cual se hizo para cada una de las líneas celulares (*Fig. 21a, 22a, 23a, 24a, 25a*) de modo que se asegure que la medición de la fluorescencia sea realmente a la célula que esté marcada positivamente con la molécula fluorescente. Por otra parte, se observa que el 98.8% de la población celular analizada presenta el marcador de interés (*Fig. 20b*).



*Figura 20. Citometría de flujo de NaO para RWPE-1. En la imagen (a) se observa el porcentaje de fondo (en rojo), en la imagen (b) se observa una superposición de el fondo (en rojo) y el porcentaje de células que ha sido clasificada como positivas para la reacción (en negro).*

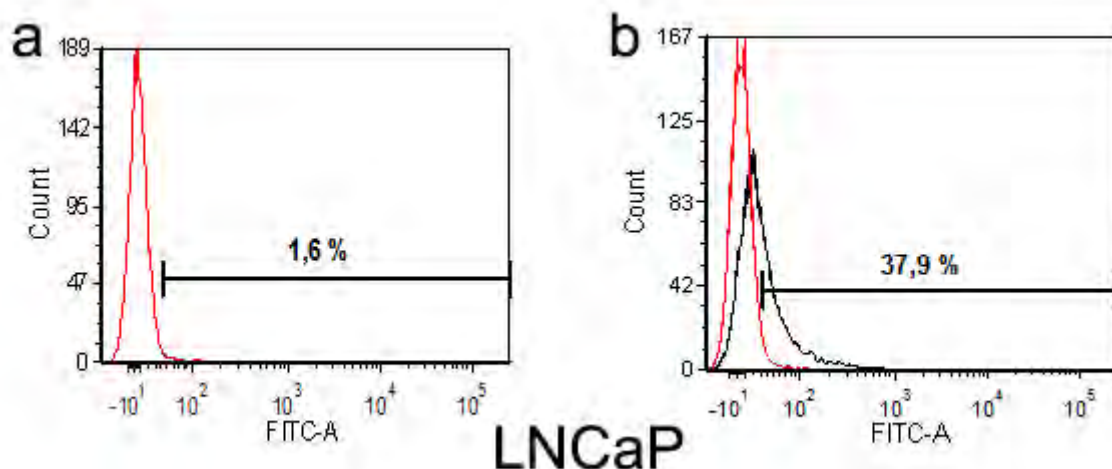
La línea celular PWR-1E presenta un fondo mayor 5.2% (Fig. 21a) con respecto a RWPE-1, sin embargo, la población que es positiva para la marcación es también superior con un 99.7% (Fig. 21b).



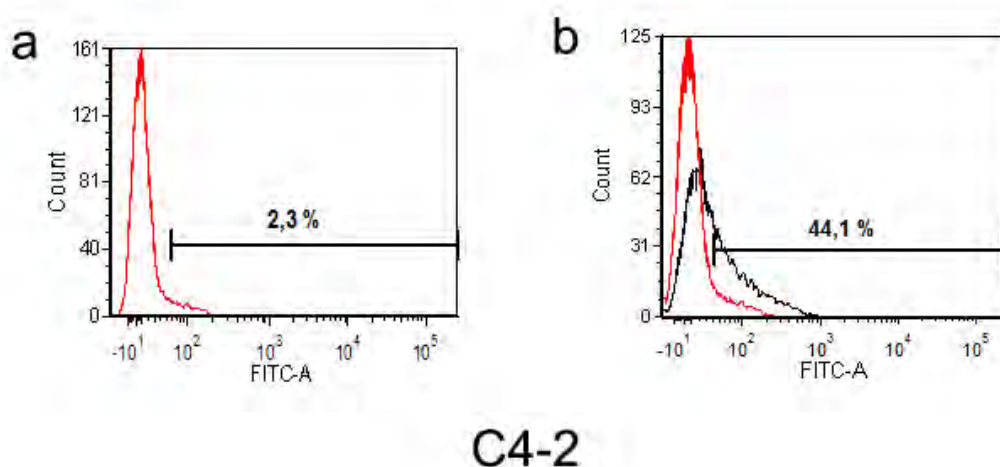
**Figura 21. Citometría de flujo de NaO para PWR-1E.** En la imagen (a) se observa el porcentaje de fondo (en rojo), en la imagen (b) se observa una superposición de el fondo (en rojo) y el porcentaje de células que ha sido clasificada como positivas para la reacción (en negro).

Por parte de la línea celular LNCaP, la población que se ha marcado positivamente disminuye con respecto a las líneas analizadas anteriormente con un 37.9% (Fig. 22b). Se observa una relación similar con la línea C4-2 donde existe un 44,1% de la población celular positiva para la reacción entre NaO y la membrana mitocondrial interna. (Fig. 23b).



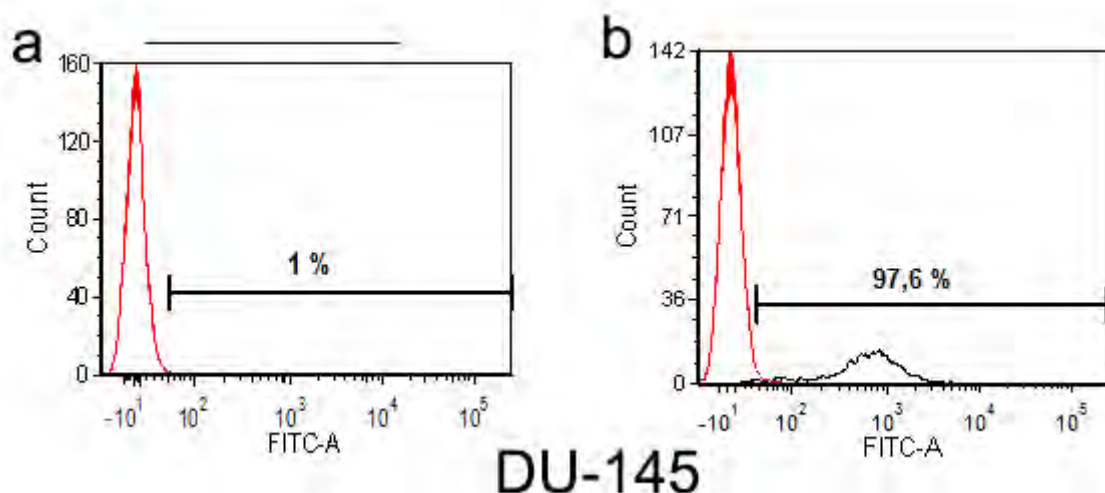


**Figura 22. Citometría de flujo de NaO para LNCaP.** En la imagen (a) se observa el porcentaje de fondo (en rojo), en la imagen (b) se observa una superposición de el fondo (en rojo) y el porcentaje de células que ha sido clasificada como positivas para la reacción (en negro).

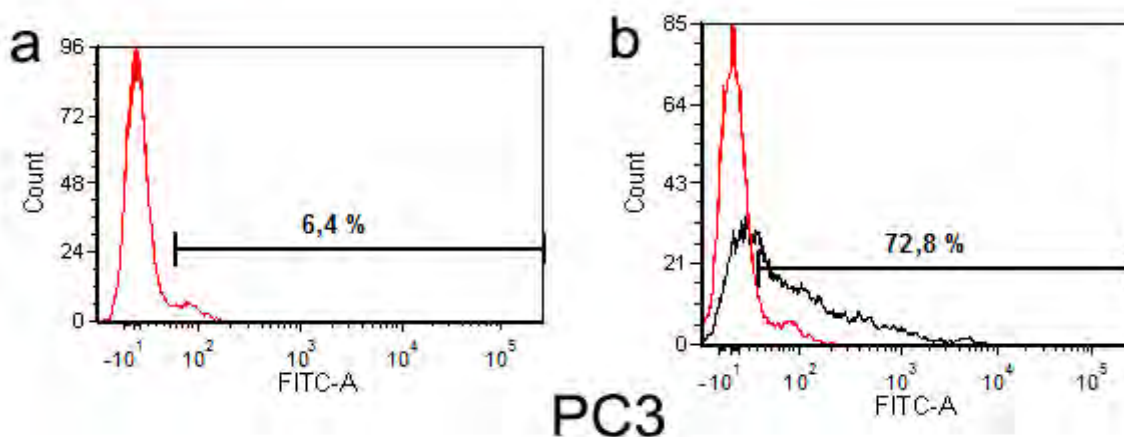


**Figura 23. Citometría de flujo de NaO para C4-2.** En la imagen (a) se observa el porcentaje de fondo (en rojo), en la imagen (b) se observa una superposición de el fondo (en rojo) y el porcentaje de células que ha sido clasificada como positivas para la reacción (en negro).

Con respecto a las líneas más agresivas podemos observar que la línea DU-145 presenta una marcación mucho mayor que las líneas LNCaP y C4-2, con una población positiva que representa el 97.6% (Fig. 24b). Por otra parte en la línea celular PC3 se observa una disminución de la población positiva con respecto a DU-145, pero sigue siendo alta con respecto a LNCaP y C4-2, con un 72.8% (Fig. 25b).



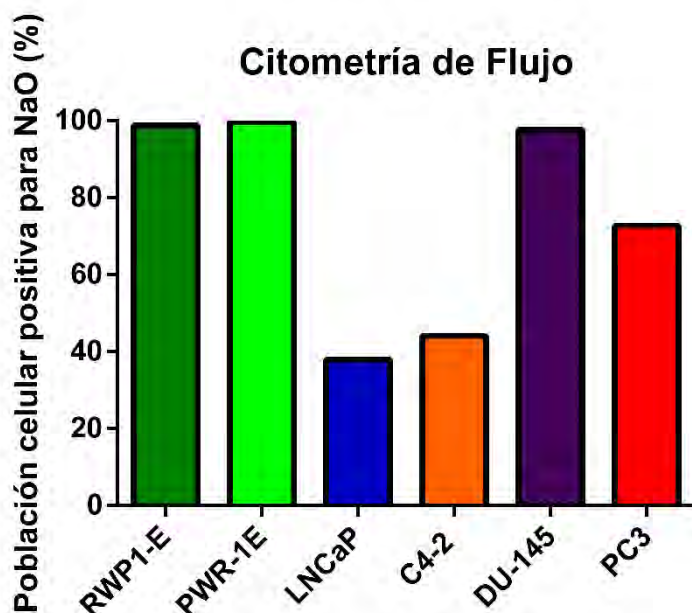
**Figura 24. Citometría de flujo de NaO para DU-145.** En la imagen (a) se observa el porcentaje de fondo (en rojo), en la imagen (b) se observa una superposición de el fondo (en rojo) y el porcentaje de células que ha sido clasificada como positivas para la reacción (en negro).



**Figura 25. Citometría de flujo de NaO para PC3.** En la imagen (a) se observa el porcentaje de fondo (en rojo), en la imagen (b) se observa una superposición de el fondo (en rojo) y el porcentaje de células que ha sido clasificada como positivas para la reacción (en negro).

En resumen, al analizar las líneas celulares en términos de progresión tumoral (desde las líneas benignas hasta las malignas) se observó que las líneas LNCaP y C4-2 captan menormente el colorante NaO, sin embargo las líneas DU-145 y PC3 (resistente a la privación androgénica y metastásica) adquieren un re establecimiento en la captación del colorante, lo que muestra que vuelven a obtener un mayor maya mitocondrial.

Finalmente, para poder apreciar mejor estas diferencias se realizó un gráfico que agrupa todas las líneas celulares y sus porcentajes de población celular que ha podido ser identificada como positiva, es decir, que hayan incorporado el colorante fluorescente.



*Figura 26. Porcentaje de la población de las líneas que ha marcado positivo para NaO. En el eje X se observan las líneas celulares, en el eje Y se aprecia la cantidad en porcentaje de la población positiva.*

## **8. Discusión.**

### **8.1 La progresión tumoral en cáncer de próstata se relaciona positivamente con la expresión de mRNA de isoformas GLUT clase II.**

La expresión de mRNA en las diferentes líneas celulares expresa niveles variables que reflejan ciertos grados de progresión tumoral en base a lo anteriormente mostrado. De manera interesante, la isoforma GLUT 5 que transporta exclusivamente fructosa presenta patrones elevados de expresión a nivel de mRNA en la línea celular de cáncer de próstata metastásico PC3, lo que sugiere que los niveles incrementados de mRNA de esta isoforma pueden contribuir metabólicamente a la supervivencia de este tipo celular de manera significativa, perdiendo la diferenciación, aumentando la transcripción de estos genes como también alterando finalmente el fenotipo propio de la célula. Sin embargo la tumorigénesis en las neoplasias está sujeta a un gran número de determinantes multifactoriales, de las cuales una de las principales es la alteración de la estructura y transcripción del DNA (Laird & Jaenisch, 1996; Stepanenko et al., 2015). Para la certeza de un hallazgo sólido es necesario realizar técnicas para poder evidenciar la traducción de estos productos transcripcionales en un nivel estructural de la célula como inmunocitoquímica en los propios cultivos celulares, donde se visualiza la presencia o no del transcripto del transportador pero traducido a proteína a un nivel subcelular. Sin embargo, la reproducibilidad de este tipo de muestras en esta técnica puede presentar una limitante en particular, que corresponde a la dificultad que presenta el almacenamiento de los cultivos celulares para ser estudiados a largo plazo, por lo que este problema puede ser superado con la realización de la técnica de inmunocitoquímica en un bloque celular (Li et al., 2005) que permite una fijación por tiempo indefinido de la muestra, un almacenamiento adecuado y además un contexto sólido de matriz extracelular en el cual se pueden obtener láminas que son analizadas con facilidad en términos de técnica. Por otra parte, la expresión proteica de estos transportadores puede ser analizada a nivel de inmunodetección de la migración de los péptidos de interés en función de su peso molecular utilizando la técnica de Western Blot. Además de la información crucial que nos brindan las

técnicas anteriormente descritas, la funcionalidad del transportador transmembrana es esencial para definir el flujo real de fructosa hacia o desde el interior de la célula, como lo demuestran los ensayos de captación de hexosas dependiendo de su estado fisiológico (Xie, 2008). Estos estudios basados en la captación de hexosas han sido caracterizados y modelados en base a algoritmos cinéticos que definen la afinidad de cada transportador por su sustrato, denominado constante de Michaelis ( $K_m$ ) (Berg et al., 2001).

Por otra parte, existe evidencia de estudios sobre tratamientos en las líneas celulares en contexto de hormonas o drogas para observar la transcripción de los transportadores (Medina et al., 2003). Esto ha demostrado cierta relación entre los modelos utilizados y la expresión aumentada o disminuida de los transportadores en líneas celulares, lo que sería de valor al complementar este estudio con la observación de la expresión de mRNA de los transportadores y su modificación cuando las células son tratadas con distintas concentraciones de fructosa. De esta forma, se podría observar si estos tratamientos conducen a una expresión mayor de los transportadores y entregarnos información acerca del estímulo de la célula y su transcripción génica por parte de las líneas celulares para aumentar el flujo de fructosa que ingresa a la misma, pero en un contexto dosis-respuesta, como se ha observado en estudios anteriores con GLUT-5 en intestino (C. Patel, Douard, Yu, Gao, & Ferraris, 2015).

Cabe destacar además, en comparación con las otras líneas celulares que solo el fenotipo más agresivo (PC3) de cáncer prostático presenta aproximadamente dos veces el nivel de expresión de GLUT 5, por lo que podemos respaldar lo anteriormente descrito. En contraste con GLUT-1, una isoforma de clase I encargada del transporte basal únicamente de glucosa y asociada a muchas neoplasias (Airley et al., 2001; Hussein et al., 2011; Young et al., 2011), como también en próstata pero sólo a nivel de mRNA (Stewart et al., 2008), presenta diferentes niveles de expresión notables en los modelos experimentales de líneas celulares de cáncer de próstata pero en magnitudes menores que GLUT-5, lo que sugiere que los niveles de mRNA de ambas isoformas se ven asociados a un

fenotipo maligno, siendo el producto transcripcional de GLUT-5 más influenciado en un fenotipo más agresivo (PC3). En contraste con otras neoplasias malignas de prevalencia como cáncer de mama, a través de qRT-PCR se ha evidenciado que GLUT-5 no representa niveles de progresión tumoral al mostrar que las cantidades de mRNA de este transportador se encuentran en bajos niveles en este tipo de tejidos (Gowrishankar et al., 2011), lo que sugiere que el consumo de fructosa como un sustrato aumentado en neoplasias malignas evidenciado por análisis limitados a mRNA podría ser tejido específico y por lo tanto más estudios se necesitan para complementar de forma global esta idea. Hallazgos a nivel de mRNA de GLUT-7 y GLUT-9 en próstata (Reinicke et al., 2012), han evidenciado que estos niveles son variables, ya que GLUT-7 se expresa menormente en cáncer de próstata que en su contraparte benigna y GLUT-9 mostró una expresión aumentada en solo un espécimen de cáncer prostático. GLUT-11 sin embargo, evidenció niveles de expresión aumentados en cáncer de próstata, lo que sugirió que esta isoforma podría ser importante en la utilización de fructosa en el tumor. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan, al menos en parte, con la expresión de mRNA de GLUT-9 ya que existe una disminución muy significativa en todas las líneas celulares de cáncer prostático (excepto en C4-2) y más aún en la línea celular más agresiva de esta neoplasia; PC3. GLUT-7 en nuestro estudio es poco concluyente en comparación al estudio recientemente descrito (Reinicke et al., 2012), ya que se observó un mayor aumento en la línea celular de cáncer prostático sensible a la privación androgénica LNCaP pero no fue significativo en relación al resto de las líneas celulares, sin embargo, de manera interesante, los niveles de GLUT-11 se observaron aumentados en la línea celular más agresiva de cáncer prostático PC3, lo que concuerda con el estudio discutido recientemente (Reinicke et al., 2012). Es importante destacar además, que la muestra o procedencia del sistema biológico en el estudio anteriormente descrito es notablemente diferente, lo que incluye un gran número de variables que pueden influenciar a la eficiencia de la técnica realizada, entre los que podemos destacar: a) la utilización de distintos genes de control endógeno para la normalización de la expresión de los genes en estudio, debido a que no todos estos genes estándares de normalización son reproducibles a través de

diferentes muestras biológicas y requieren de validación para cada condición experimental (Gilsbach, Kouta, Bonisch, & Bruss, 2006), b) la sensibilidad y exactitud de la técnica realizada, ya que qRT-PCR en nuestro estudio determinó a través de algoritmos matemáticos los datos procesados por un software, una característica que RT-PCR convencional en el estudio recientemente citado tiene como limitante y c) lógicamente los factores que determinan estas diferencias en el mismo sistema proveniente de un tejido o de un cultivo celular.

Previo al estudio de mRNA mediante qRT-PCR, se realizaron análisis de eficiencia de los partidores utilizados para encontrar de manera específica la secuencia génica de cada transportador o enzima en cuestión. Las eficiencias correspondientes a la mayoría de los partidores muestran un valor cercano al 100% (ideal), sin embargo a pesar de que las eficiencias de GLUT-5, GLUT-2 y GLUT-7 se encuentran dentro de los rangos aceptables, los valores difieren ampliamente del valor ideal teórico. Estos alcances pueden ser consecuencia de elementos indeseados que afectan el proceso de medición de fluorescencia en la reacción como el alto contenido de G-C en la secuencia del gen que está siendo amplificado en los ciclos de PCR, como también la estructura secundaria de la secuencia amplificada, ya que en este caso el paso de la enzima DNA polimerasa en la polimerización de estas secuencias durante cada ciclo de reacción puede estar obstruido por esta estructura secundaria de la secuencia amplificada, lo que se refleja en un valor de eficiencia menor a 100% (LifeTechnologies, 2014).

Además, es importante destacar que los efectos del colorante fluorescente SYBRGreen I utilizado comúnmente en el desarrollo de este y otros estudios a través de qRT-PCR tiene ciertos efectos negativos reportados en la literatura que alteran la eficiencia de cada reacción en comparación con otro tipo de colorantes o reporteros de la amplificación de genes de interés cuando es utilizado a mayores concentraciones (Gudnason, Dufva, Bang, & Wolff, 2007), como también afectando al evento final de Curva de Melting o Curva de Disociación de los partidores que demuestra la especificidad del éxito de la reacción de qPCR.

En resumen, existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de los mRNA, que codifican para la mayoría transportadores de fructosa en cada línea celular y su grado de malignidad. Los hallazgos de este trabajo confirman que, al menos, en cuanto a expresión génica las células epiteliales neoplásicas de próstata transcriben mayoritariamente estos transportadores, lo cual sugiere que fructosa pudiese ser un metabolito primordial para la generación de energía y macromoléculas y, con esto la mantención de la homeostasis en el tumor.

## **8.2 La localización subcelular del inmunomarcaje de los transportadores Clase II (GLUT 5, 7, 9 y 11) presenta un patrón heterogéneo y puede relacionarse directamente con el fenotipo tumoral en cáncer de próstata.**

En este estudio, la realización del inmunomarcaje en tejidos tumorales y no tumorales mostró que los mayores niveles de tinción corresponden a los transportadores GLUT 5, 9 y 11, presentando patrones heterogéneos en la localización subcelular ya sea en patrones de membrana, citoplasma o perinucleares. La tinción de la isoforma de clase I GLUT-1 mostró una ausencia de tinción en los distintos compartimentos estructurales, lo que sugiere que la glucosa no es una hexosa transversalmente imperativa tanto en próstata benigna como en próstata maligna y que la carcinogénesis al menos en expresión proteica y tisular no se traduce en sobreexpresión de esta isoforma. En contraste con nuestros resultados, otros autores muestran que GLUT-1 se expresa mayormente en tumores con un fenotipo más agresivo o con un mal pronóstico en muchos órganos como cuello uterino, mama, tiroides y en la carcinogénesis de cáncer de páncreas (Airley et al., 2001; Carvalho et al., 2011; Pizzi et al., 2009), pero en tejido prostático se ha evidenciado la presencia de esta isoforma en tejido de hiperplasia prostática benigna pero su ausencia en carcinoma prostático (Chandler, Williams, Slavin, Best, & Rogers, 2003; Reinicke et al., 2012), con esto puede respaldarse el hecho de que



GLUT-1 en tejido prostático maligno no es una isoforma que cumpla un rol primordial y que a su vez la glucosa no es un sustrato esencial para este tipo tumoral. GLUT-2, una isoforma de clase I que transporta glucosa y fructosa presentó ausencia de tinción en todas las muestras no tumorales a excepción de una, la cual presentó un patrón citoplasmático y de membrana. Este patrón de tinción puede sugerir que al menos en este tejido en estudio existe un tráfico de la molécula entre el citosol y la membrana celular, pero esto no puede ser comprobado debido al bajo número de muestras no tumorales positivas para este marcador (1 de 12 muestras) y además, no existe evidencia en literatura de que este transportador migre hacia la membrana, al menos en próstata. La ausencia de tinción para GLUT-2 en muestras tumorales sugiere que esta isoforma no cumple un rol preponderante en la mantención del metabolismo aumentado de las células epiteliales de próstata maligna. A diferencia de los marcadores anteriormente discutidos, GLUT-5, un transportador exclusivamente de fructosa, presentó niveles de marcación muy altos tanto en muestras no tumorales, como también en tumorales, lo que sugiere que efectivamente la fructosa es una hexosa altamente utilizada por el epitelio prostático benigno, pero a su vez altamente utilizada en epitelio tumoral. Esta aseveración se refuerza por la intensidad en la membrana citoplasmática en el epitelio prostático de muchas muestras tumorales. La magnitud de tinción de GLUT-5 mostró patrones muy intensos y heterogéneos en los compartimentos subcelulares como citoplasma y membrana citoplasmática, esto podría ser explicado porque las células epiteliales prostáticas podrían necesitar un alto influjo de fructosa, lo que a su vez desencadena la sobre regulación de moléculas que reclutan la expresión de este transportador desde citoplasma hasta la membrana como el complejo GTPasa Rab11a que es requerido para el tráfico y la sobre expresión de GLUT-5 (Chirag Patel, Douard, Tharabenjasin, Topaktas, & Ferraris, 2014), sin embargo, existe evidencia de que GLUT-5 si bien posee expresión tisular en próstata benigna, en próstata maligna su expresión se encontró ausente en todas las muestras de carcinoma prostático analizadas (Alejandro Godoy et al., 2006). En contraste con los niveles elevados de tinción tanto en tejido prostático benigno, como en tejido prostático neoplásico, el atlas de proteína humana, una herramienta de base de datos útil para

inmunohistoquímica, postula que la mayoría de las malignidades muestra una tinción negativa o débil en algunas células para GLUT-5 (Pontén, Jirström, & Uhlen, 2008), lo que se relaciona contrariamente con nuestro hallazgo. GLUT-7, un transportador que transporta fructosa y glucosa, pero que tiene una mayor afinidad por fructosa, mostró una tinción absolutamente ausente tanto en muestras tumorales como en no tumorales, lo que sugiere que la expresión tisular de esta isoforma no contribuye al metabolismo de este tejido tanto en condiciones benignas como patológicas. GLUT-9, que está involucrado en el transporte principalmente de urato, como de fructosa (Manolescu, Augustin, Moley, & Cheeseman, 2007), mostró patrones de tinción e intensidad similares a GLUT-5, lo cual podría sugerir que fructosa puede tener una relación directa con la entrada de urato al epitelio prostático durante la carcinogénesis, o bien que fructosa pueda relacionarse con urato durante el metabolismo de ambos en las células prostáticas malignizadas. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios al respecto. Un hallazgo altamente llamativo, es el que se encontró en las muestras sometidas a la marcación de GLUT-11 debido a que en la mayoría de las muestras no tumorales se observó una marcación de célula única con un patrón perinuclear, destacando además que esta célula reviste una estructura glandular y esta a su vez está compuesta por un conjunto de células. De manera interesante, GLUT-11 mostró niveles superiores de marcación mayormente en muestras tumorales que en muestras no tumorales únicamente en estructuras epiteliales. A su vez, el patrón de marcación en estas células tumorales corresponde a un patrón citoplasmático pero mayormente perinuclear, siendo este patrón único de esta isoforma en comparación con las demás en este estudio. Esto sugiere que GLUT-11 puede ser una isoforma cuya influencia en el tráfico intracelular de fructosa durante la progresión tumoral es importante. Esta visión única en la topografía subcelular sugiere que la traducción de este transportador puede realizarse de manera temprana y/o que además el tráfico y reclutamiento de esta isoforma puede depender altamente de otros mecanismos de translocación ya sea a través de proteínas que componen el citoesqueleto u otros factores migratorios.

Se debe destacar que todas las muestras no tumorales presentaron un patrón glandular difuso en la mayoría de los campos observados en los cortes histológicos, ya que existen epitelios con una buena conservación en su arquitectura tisular, como también otros que presentaron epitelios atípicos emulando una hiperplasia. Es posible confirmar esto, ya que la biopsia se extrajo por un motivo de sospecha clínica, razón por la cual estas muestras provienen de un biorepositorio de tumores.

Es importante destacar además, que la naturaleza del cáncer de próstata desde un punto de vista histopatológico produce ciertas limitantes al estudiar este tumor desde una perspectiva no solo tisular, sino que también en un nivel molecular al observarse alteraciones muy variables y poco estandarizadas en la citogenética, ya que esta neoplasia se caracteriza principalmente por ser una enfermedad multifocal y heterogénea (Ware, 1994). Es importante destacar la relevancia de haber ejecutado la utilización de tinciones de rutina que puedan evidenciar todos los parámetros arquitecturales que se basan en la histología propia del cáncer de próstata y además caracterizar otros cambios estructurales en una amplia variedad de tumores y que corresponde a la tinción de hematoxilina y eosina (Fischer, Jacobson, Rose, & Zeller, 2008). Esto es un paso fundamental, al menos en clínica, para guiar el diagnóstico ya que sitúa al clínico en un contexto morfológico complementario a la inmunotinción. Los criterios histopatológicos utilizados en este estudio corresponden a alteraciones arquitecturales donde se visualizan un gran número de pequeñas glándulas que tienen características de infiltración, o bien, glándulas con patrones cribiformes que pueden representar una neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN), como también aumento del tamaño nuclear y nucléolo excéntrico (Algaba et al., 1996). La invasión perineural fue un parámetro importante en este estudio ya que logró ser caracterizado mediante la inmunotinción de GLUT-1 reportado en la literatura en otros tejidos (Salla et al., 2008), pero que además coincide con la morfología que muestra la estructura teñida. Este hallazgo nos brindó información relevante acerca de dos puntos que confluyen; el primero hace relación con un parámetro de malignidad tumoral y el segundo nos brinda un control interno positivo de la técnica. Debido a esta heterogeneidad tumoral, la utilización de marcadores que caracterizaran topográficamente la malignidad en este estudio

habrían sido elementos clave en la definición de cada muestra tumoral o no tumoral, por ejemplo el valor diagnóstico que presenta la utilización de marcadores como AMACR o su clon monoclonal p504S que nos evidencia de la sobre expresión de la enzima  $\alpha$ -Metilacil-CoA Racemasa en las células prostáticas de adenocarcinoma y la completa ausencia de reacción en células benignas (Jiang et al., 2001), la utilización de anticuerpos para la marcación de citoqueratinas de alto peso molecular (34 $\beta$ E12) que han sido útiles en la identificación de células basales, cuya tinción positiva refleja la benignidad del epitelio prostático en cuestión y presencia de diferenciación del tejido, lo que ayudaría a contrastar a las porciones epiteliales benignas o malignas que a su vez sean positivas o negativas para la inmunotinción de los transportadores GLUT utilizados en este estudio, sin embargo la utilización de este marcador requiere de un análisis paralelo y un conocimiento de la arquitectura tisular, ya que se ha evidenciado una inmunoreactividad muy relativa en glándulas de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN) y además existe pérdida de este antígeno con la fijación prolongada de formalina (Varma, Linden, & Amin, 1999). La utilización de marcadores como p63, que presenta un patrón nuclear de marcación, podría brindar otro valor pronóstico cuya ausencia de tinción determinaría a las células epiteliales de adenocarcinoma (Parsons, Gage, Nelson, & De Marzo, 2001). Otros aspectos de la técnica como el tipo de fijación podrían afectar a la inmunoreactividad subsecuente en el procedimiento de inmunohistoquímica llevado a cabo en este estudio. La fijación de los tejidos en este estudio fueron realizados con el preservante más ampliamente utilizado en histopatología, formalina al 10%, sin embargo existen fijadores como Bouin que han presentado una mejor preservación de antígenos de membrana de transportadores de hexosas (Reinicke et al., 2012), como también un mejor detalle nuclear (Ananthanarayanan, Pins, Meyer, & Gann, 2005) que a su vez es clave en el análisis histopatológico nuclear de las muestras tisulares analizadas en este estudio.

Finalmente, una realización de puntaje o score sería mayormente útil en este estudio, ya que permitiría cuantificar los resultados mediante un análisis estadístico, que a su vez puede ser correlacionado matemáticamente con otros análisis basados en la expresión relativa de un gen, lo cual determinaría con una precisión numérica

y no cualitativa la expresión de mRNA en conjunto con la expresión tisular del gen estudiado. Sin embargo, este sistema de puntaje para cuantificar la inmunotinción puede estar sujeto a un cierto grado a subjetividad intra observador e inter observador.

En resumen, los inmunomarcajes de GLUT-5, GLUT-9 y GLUT-11 fueron los que obtuvieron el mayor número de campos e intensidades de tinción. GLUT-5 obtuvo un marcaje mixto pero mayormente de membrana citoplasmática y esto sugiere que la fructosa posee un rol superior en el tráfico intra y extra celular. GLUT-9, siendo un transportador de urato y fructosa, mostró patrones intensos y mixtos de marcación tanto de membrana citoplasmática como en citoplasma, lo que sugiere fuertemente que existe una relación entre ambas moléculas ya sea en el tráfico intra y extracelular, o también en el metabolismo de la célula maligna. GLUT-11 de manera interesante mostró mayor tinción en epitelios de próstata maligna que en benigna, lo que sugiere que este transportador cumple un rol fundamental en la mantención del metabolismo de fructosa en CaP, además de que ha sido el único marcador que evidenció un patrón perinuclear en células aisladas, sugiriendo que existen factores únicos de traducción a proteína, a diferencia de otros transportadores estudiados. Analizando estas tres caracterizaciones tisulares, se concluye que la fructosa es una molécula altamente utilizada por próstata benigna, pero más aún, por próstata en estados iniciales de carcinogénesis como también en adenocarcinoma prostático. Sin embargo, a pesar de los parámetros histopatológicos usados en este estudio, la utilización de marcadores inmunohistoquímicos que caractericen topográficamente estados de benignidad, malignidad o transición de ambos, habrían sido de un gran valor en la definición concreta de CaP en las muestras estudiadas.

### **8.3 La utilización de la fructosa se ve reflejada por una mayor expresión de Fructoquinasa en el fenotipo prostático maligno y podría desencadenar una adaptación en la respiración celular.**

En este estudio, con el objetivo de reforzar el análisis de la expresión de los transportadores de clase II en cáncer de próstata, se evaluaron las consecuencias metabólicas que podría producir teóricamente la fructosa dentro de la célula y cuál sería el comportamiento metabólico en las distintas líneas celulares determinando como un sustrato primordial en este caso a esta hexosa en análisis.

Los resultados de la expresión a nivel de mRNA de las enzimas clave en el metabolismo de fructosa y glucosa; Fructoquinasa y Hexoquinasa respectivamente, de manera interesante mostraron resultados concordantes con la hipótesis establecida en este estudio. Se observó que la enzima Hexoquinasa presenta niveles elevados de mRNA en las líneas celulares de próstata benigna RPW-E1 y PWR1-E, sin embargo su expresión en las líneas celulares de cáncer de próstata sensible a la privación androgénica e insensible a la privación androgénica presentan una disminución notable, lo que se refleja además por una alta significancia. Esto sugiere fuertemente que la glucosa en próstata benigna una vez que ha ingresado a las células epiteliales es fosforilada para obtener un compromiso hacia las vías posteriores en la glicólisis, sin embargo este efecto se vería disminuido en próstata con un fenotipo tumoral mayor, lo que se puede evidenciar en líneas celulares de próstata sensibles a la privación androgénica o bien en líneas celulares resistentes a la privación androgénica, las cuales representan un fenotipo más agresivo de malignidad. En contraste con esta enzima, Fructoquinasa de manera interesante mostró niveles de expresión relativa de mRNA muy similares tanto en líneas celulares de próstata benigna, como también en líneas celulares de cáncer de próstata sensibles a la privación androgénica, sin embargo la expresión en la línea celular de cáncer prostático metastásico resistente a la privación androgénica (PC3) presentó niveles notablemente superiores de mRNA en comparación a las demás líneas celulares tumorales, lo que sugiere ampliamente que la fructosa una vez que es ingresada por los transportadores específicos o mixtos de esta hexosa podría ser

fosforilada con una alta eficiencia para poder comprometerse a vías posteriores en la glicólisis. Fructoquinasa además posee una gran ausencia de mecanismos regulatorios de retroalimentación negativa a diferencia de Hexoquinasa, por lo que produce un agotamiento excesivo de ATP de forma transitoria en la célula (Johnson et al., 2013; Port, Ruth, & Istfan, 2012), y por lo tanto esta aseveración apoya la idea de que la fructosa es un sustrato menormente regulado que puede ingresar a una célula epitelial prostática en cáncer y suplir las demandas excesivas de energía dentro de ella. Sin embargo este hallazgo se ha limitado solo a la expresión de mRNA de las enzimas, por lo que debe considerarse la expresión proteica y además la funcionalidad de estas. Un efecto subsecuente del agotamiento transitorio de ATP es el aumento de las concentraciones de ADP con la tasa de ADP/ATP llevando a un quiebre de los ácidos nucleicos puricos para formar ácido úrico y restaurar el balance (Port et al., 2012), lo que puede explicar la relación directa con la intensidad elevada de la inmunomarcación de GLUT-9 en las muestras de tejidos tumorales estudiadas previamente, ya que este transportador está involucrado principalmente en el transporte de urato, una sal derivada directamente del ácido úrico. Sugiriendo un mayor influjo o eflujo de este metabolito en las células epiteliales prostáticas malignas.

En cuanto a los resultados obtenidos en Western Blot de la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KGD) se observa en la línea celular PC3 una mayor expresión, mientras que en la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) la banda más intensa se observa en la línea celular DU-145. Ambas líneas celulares son malignas, sin embargo presentan distinto grado de agresividad, siendo PC3 la que posee mayor capacidad metastásica frente a DU-145.

El aumento de estas enzimas ( $\alpha$ -KGD y PDH) por parte de las líneas celulares anteriormente nombradas se correlaciona con la literatura y se relaciona a un aumento de la expresión de estas moléculas con una ganancia en el metabolismo de glucosa y un crecimiento por parte del tumor (Bonnet et al., 2007).

En primer lugar se ha estudiado ampliamente la acción de estas enzimas en el ciclo de Krebs, sin embargo, en el microambiente prostático presentan un

comportamiento distinto. Esto se debe a que en la próstata se desarrolla de manera basal una respiración celular menor que en otros órganos (L. C. Costello, Guan, Kukoyi, Feng, & Franklin, 2004). Esta característica es producto de una regulación que ejerce el Zinc en el ciclo de Krebs promoviendo la acumulación de citrato. De esta manera la próstata pierde aproximadamente el 65% del ATP por una oxidación incompleta (Leslie C. Costello & Franklin, 2006). Este fenómeno se vuelve relevante ya que estos autores sugirieron que a medida que la célula se maligniza ésta pierde la capacidad de retener zinc y por lo tanto, también la capacidad de acumular citrato, permitiendo una proliferación de la célula debido a un incremento de su metabolismo, debido a que se produce una oxidación completa por parte de la mitocondria y por consecuente una mayor actividad de  $\alpha$ -KGD y PDH que se ve reflejada en las líneas celulares anteriormente mencionadas (DU-145 y PC3) lo que apoyaría nuestro hallazgo.

Otro punto a considerar es la gran producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de estas dos enzimas ( $\alpha$ -KGD y PDH), ya que se ha observado en diversos estudios que aportan una gran cantidad de radicales oxidantes que son tóxicos y nocivos para la célula, y más aún para la mitocondria, afectando al balance redox durante la producción de agentes reductores (Lin & Beal, 2006; Starkov et al., 2004), esto se relaciona directamente con los datos obtenidos en este estudio, debido a que se observa que en células con menos capacidad invasiva la expresión de estas enzimas es menor y que durante el aumento de la malignidad de las líneas celulares la expresión es directamente proporcional al grado de malignidad superior, lo que sugiere que a pesar de que ocurre un re establecimiento de la expresión de estas enzimas, eventualmente pueden encontrarse disfuncionales para que finalmente la célula utilice otros mecanismos de supervivencia. Sumado a esto, se observa una similitud en los resultados expresados por parte de la citometría de flujo, al determinar las poblaciones celulares cuyas mitocondrias se encuentran con una estructura mitocondrial que presenta anomalías en su integridad, lo que puede explicar los bajos niveles de fosforilación oxidativa en LNCaP y VCaP.

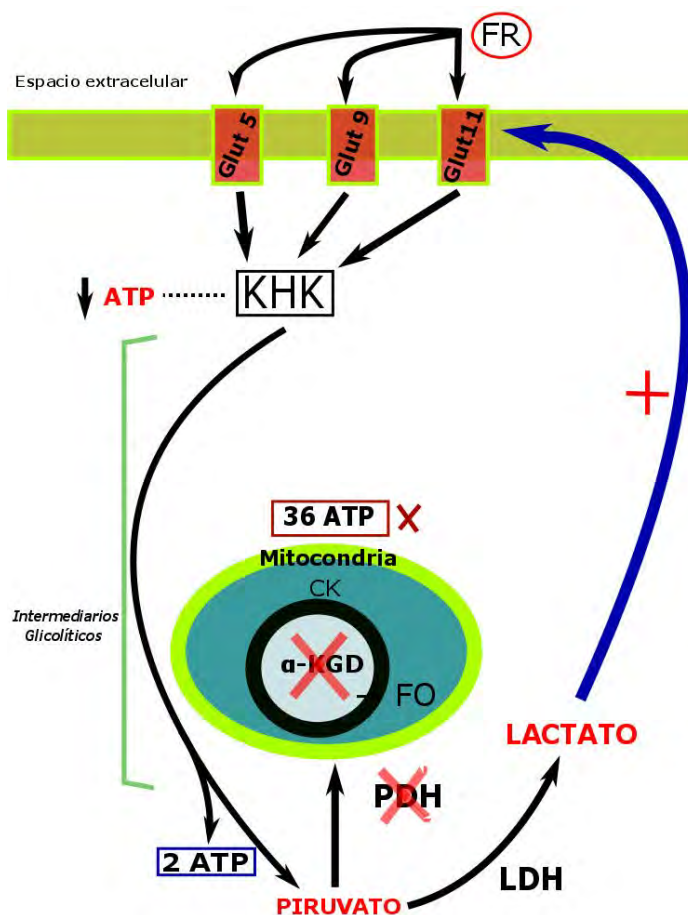


Cabe mencionar que en los resultados obtenidos anteriormente se observa una notable disminución en cuanto a la cantidad de mitocondrias íntegras o funcionales en las líneas celulares LNCaP y C4-2, de manera que en base a este análisis puede sugerirse que estas células estén ejecutando una menor respiración y por lo tanto la producción de energía también sea menor en relación a otras líneas celulares en estudio. De manera que se vea afectada directamente la proliferación de estas células a pesar de que el receptor de andrógeno sea un actor principal en la transcripción de genes y la proliferación celular sobre todo en cáncer de próstata (Carver, 2014). Sin embargo, esta relación negativa entre producción de energía y proliferación celular se ve contrarrestada por la posibilidad del receptor de andrógeno, mediante la enzima glicógeno sintasa quinasa  $3\beta$  y/o una serie de mecanismos, estimular el metabolismo de la célula de manera tal que aumente la entrada de hexosas para así generar un ingreso mayor de piruvato, ya sea a la mitocondria disfuncional o a las pocas mitocondrias que se encuentren disponibles en estas líneas celulares y generar la mayor cantidad de ATP posible en la célula, sin embargo este alcance no puede ser concretado, ya que en este estudio no se realizaron ensayos de proliferación celular. Otro efecto que desencadena el aumento de entrada de hexosas es la capacidad de generar, por medio de productos glicolíticos, la biosíntesis precursora de macromoléculas tales como aminoácidos, ácidos grasos, etc. Evidenciando una tendencia por parte de estas células al anabolismo mediado por el receptor de andrógenos (Massie et al., 2011).

Finalmente, para otorgar una mayor consistencia a los resultados obtenidos y a la vez reforzar la hipótesis anteriormente expuesta, serían de un gran valor informativo, los ensayos de medición de ATP (Burgos, Gulab, Cassera, & Schramm, 2012; Khan, van Brummelen, Parkinson, & Hoppe, 2012), siendo usado un tratamiento con y sin Testosterona (T), con y sin Dehidroepiandrosterona (DHEA) y con ambos (T+DHEA). Estos hallazgos a su vez podrían ser concretados al estudiar de manera directa la cadena transportadora de electrones para cuantificar y evaluar la función mitocondrial, utilizando ensayos como OXPHOS, un ensayo

que estudia la relación del consumo de oxígeno y un análisis de las enzimas que componen la cadena respiratoria (Barrientos, Fontanesi, & Díaz, 2009).

Es importante destacar además que se ha observado que el receptor de andrógenos es un potente estimulante de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pinthus et al., 2007; Whelan et al., 2010), lo que llevaría a un daño a la mitocondria y apoyaría el resultado obtenido.



*Figura 27. El aumento de la expresión de los transportadores de fructosa suple los requerimientos energéticos de la célula neoplásica prostática. Se observa que las bajas cantidades de ATP logran ser suplidas consecuentemente por una mayor entrada de fructosa a la célula. FR: Fructosa, KHK: Fructoquinasa, CK: Ciclo de Krebs, FO: Fosforilación oxidativa*

## 9. Conclusión

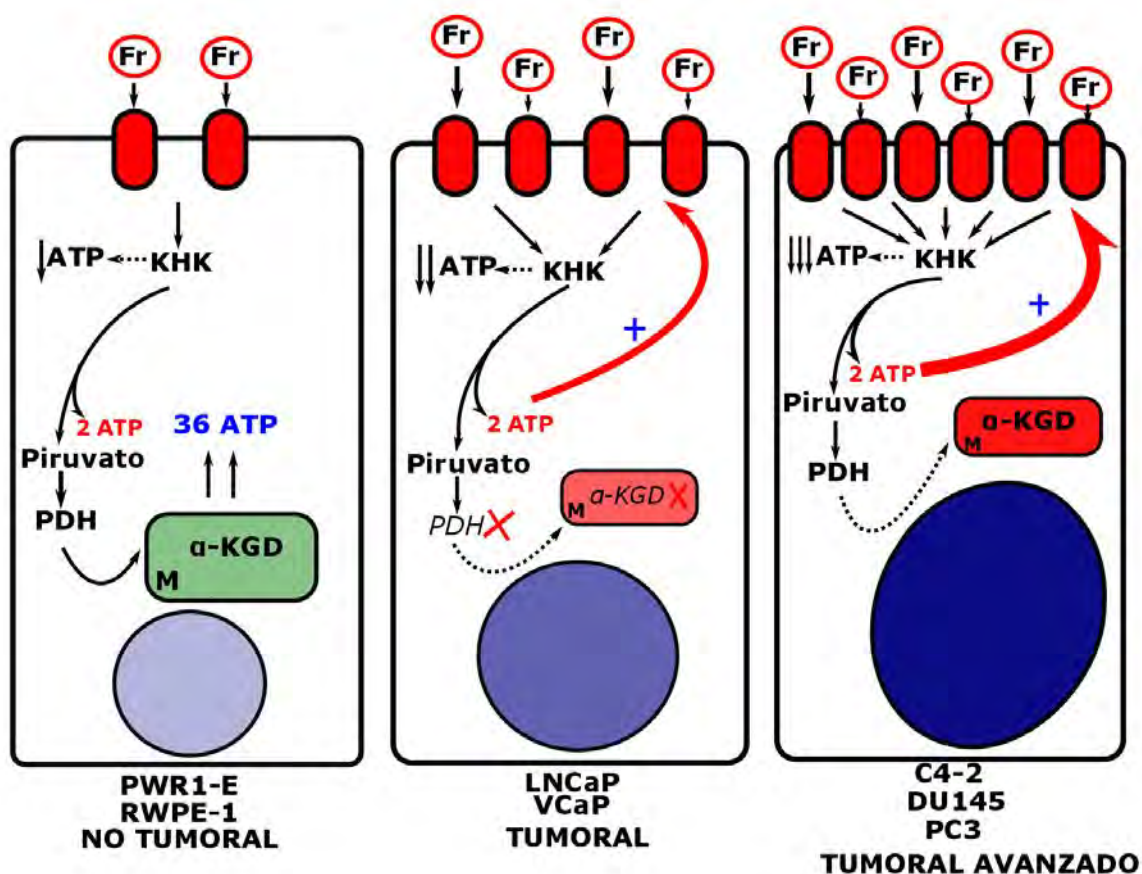
En conclusión, los mecanismos anteriormente descritos y propuestos apoyan la idea de una adaptación por parte de las células de cáncer prostático que adquieren una resistencia a la ausencia de andrógenos, para poder re-establecer los niveles de expresión de las enzimas  $\alpha$ -KGD y PDH, las cuales son clave en la obtención de niveles basales y eficientes de ATP y en la entrada de piruvato hacia la mitocondria, respectivamente.

De manera destacable, lo que refleja la enzima fructoquinasa en el análisis de mRNA potencia la idea de que la fructosa es la hexosa que está siendo metabolizada de manera preferencial en las células neoplásicas como una estrategia por parte de la célula para poder suplir las demandas de ATP, debido a que existe un re-establecimiento de la expresión de las enzimas nombradas anteriormente. Por lo tanto, pueden destacarse ciertos aspectos de la “glicólisis aeróbica” descrita ya hace muchas décadas (Warburg, 1956), debido a que posiblemente la fructosa es eficientemente metabolizada a piruvato pero en una transición maligna no logra ser oxidada dentro de la mitocondria para producir una cantidad eficiente de energía, por lo que al no ser metabolizada en este organelo utiliza otras vías que suplen esta falta de energía, incluso en presencia de oxígeno, como también en ausencia de este, como ocurre en ambiente hipóxicos dentro de las masas celulares de muchos tumores (Vaupel & Mayer, 2007), como por ejemplo en la próstata (Reinicke et al., 2012). La vía de elección de esta propuesta podría ser la utilización del piruvato para producir lactato a través de la enzima LDH (Lactato deshidrogenasa), una vía que además se ha descrito en tumores (Hirschhaeuser, Sattler, & Mueller-Klieser, 2011), pero no produce una forma eficiente de ATP como normalmente ocurre en la mitocondria, lo que explica la base del aumento de la expresión de estos transportadores de fructosa, caracterizando además el nivel de agresividad determinado por la falta de regulación celular en la entrada y metabolización de esta hexosa, un caso que no caracteriza a la glucosa.

De esta forma, la utilización de la fructosa como un sustrato primordial estaría sustentada por un eje que incluye en primera línea los transportadores de fructosa, como segundo componente, la enzima fructoquinasa y como tercera pieza del eje las

enzimas mitocondriales involucradas en decidir de manera eficiente y dependiendo de los requerimientos de la célula, cuál vía metabólica seguirá la fructosa, aportando este sustrato de manera indiscriminada al metabolismo aumentado del tumor.

Finalmente, este estudio sugiere fuertemente que la fructosa es un factor clave en las células del cáncer de próstata, contribuyendo al eje anteriormente propuesto (Fig. 28), reflejado en la progresión tumoral a través de líneas celulares y tejidos y que además puede corresponder a un sustrato que predomine sobre otras hexosas comúnmente consumidas por el hombre, como la glucosa.



*Figura 28. El aumento de la expresión de los transportadores de fructosa se relaciona con la progresión tumoral en cáncer de próstata. Se observa una adaptación metabólica por parte de la célula para poder suplir las demandas energéticas requeridas en el cáncer de próstata, utilizando fructosa como metabolito principal. Fr: Fructosa, KHK: Fructoquinasa, M: Mitocondria.*

## 10. Referencias Bibliográficas

- Adelman, R. C., Ballard, F. J., and Weinhouse, S. (1967). Purification and properties of rat liver fructokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 242(14)(3360-3365.).
- Airley, R., Loncaster, J., Davidson, S., Bromley, M., Roberts, S., Patterson, A., . . . West, C. (2001). Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*, 7(4), 928-934.
- Alex Mitchell, H.-Y. C., Louise Daugherty, Matthew Fraser, Sarah Hunter, Rodrigo Lopez, Craig McAnulla, Conor McMenamin, Gift Nuka, Sebastien Pesseat, Amaia Sangrador-Vegas, Maxim Scheremetjew, Claudia Rato, Siew-Yit Yong, Alex Bateman, Marco Punta, Teresa K. Attwood, Christian J.A. Sigrist, Nicole Redaschi, Catherine Rivoire, Ioannis Xenarios, Daniel Kahn, Dominique Guyot, Peer Bork, Ivica Letunic, Julian Gough, Matt Oates, Daniel Haft, Hongzhan Huang, Darren A. Natale, Cathy H. Wu, Christine Orengo, Ian Sillitoe, Huaiyu Mi, Paul D. Thomas and Robert D. Finn. (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years., from [http://www.ebi.ac.uk/interpro/about.html#about\\_06](http://www.ebi.ac.uk/interpro/about.html#about_06)
- Alfarouk, K. O., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A. K., Adil, H. H. B., Elhassan, G. O., . . . Harguindey, S. (2014). Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*, 1(12), 777-802.
- Algaba, F., Epstein, J. I., Aldape, H. C., Farrow, G. M., Lopez-Beltran, A., Maksem, J., . . . Trias, I. (1996). Assessment of prostate carcinoma in core needle biopsy--definition of minimal criteria for the diagnosis of cancer in biopsy material. *Cancer*, 78(2), 376-381. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19960715)78:2<376::aid-cnrc32>3.0.co;2-r
- Ananthanarayanan, V., Pins, M. R., Meyer, R. E., & Gann, P. H. (2005). Immunohistochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative. *Journal of Clinical Pathology*, 58(3), 322-324. doi: 10.1136/jcp.2004.019299
- Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J. L., Ishihara, H., Inukai, K., . . . et al. (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*, 266(36), 24632-24636.
- Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, 62(5), 315-333. doi: 10.1002/iub.315
- Avril, N., Dambha, F., Murray, I., Shamash, J., Powles, T., & Sahdev, A. (2010). The clinical advances of fluorine-2-D-deoxyglucose – positron emission tomography/computed tomography in urological cancers. *International Journal of Urology*, 17(6), 501-511. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02509.x
- Barrientos, A., Fontanesi, F., & Díaz, F. (2009). Evaluation of the Mitochondrial Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation System using Polarography and Spectrophotometric Enzyme Assays. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.], CHAPTER*, Unit19.13-Unit19.13. doi: 10.1002/0471142905.hg1903s63
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2001). *Biochemistry* (5th ed. ed.). New York: W. H. Freeman and CO.
- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., . . . Michelakis, E. D. (2007). A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*, 11(1), 37-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.020>

- Bray, G. A. (2007). How bad is fructose? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(4), 895-896.
- Bray, G. A. (2013). Energy and Fructose From Beverages Sweetened With Sugar or High-Fructose Corn Syrup Pose a Health Risk for Some People. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(2), 220-225. doi: 10.3945/an.112.002816
- Brown, G. K., Otero, L. J., LeGris, M., & Brown, R. M. (1994). Pyruvate dehydrogenase deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 31(11), 875-879.
- Burgos, E. S., Gulab, S. A., Cassera, M. B., & Schramm, V. L. (2012). Luciferase-based assay for adenosine: Application to S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Analytical Chemistry*, 84(8), 3593-3598. doi: 10.1021/ac203297z
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2), 169-193.
- Calvo, M. B., Figueroa, A., Pulido, E. G., Campelo, R. G., & Aparicio, L. A. (2010). Potential Role of Sugar Transporters in Cancer and Their Relationship with Anticancer Therapy. *International Journal of Endocrinology*, 2010, 14. doi: 10.1155/2010/205357
- Carvalho, K. C., Cunha, I. W., Rocha, R. M., Ayala, F. R., Cajaíba, M. M., Begnami, M. D., . . . Soares, F. A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*, 66(6), 965-972. doi: 10.1590/S1807-59322011000600008
- Carver, B. S. (2014). Strategies for targeting the androgen receptor axis in prostate cancer. *Drug Discov Today*, 19(9), 1493-1497. doi: 10.1016/j.drudis.2014.07.008
- Chalovich, M., . . . Golde, D. W. (1997). *Human Erythrocytes Express GLUT5 and Transport Fructose* (Vol. 89).
- Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Molecular Cancer*, 5, 17-17. doi: 10.1186/1476-4598-5-17
- Costello, L. C., Guan, Z., Kukoyi, B., Feng, P., & Franklin, R. B. (2004). Terminal oxidation and the effects of zinc in prostate versus liver mitochondria. *Mitochondrion*, 4(4), 331-338. doi: 10.1016/j.mito.2004.07.031
- Chandler, J. D., Williams, E. D., Slavin, J. L., Best, J. D., & Rogers, S. (2003). Expression and localization of GLUT1 and GLUT12 in prostate carcinoma. *Cancer*, 97(8), 2035-2042. doi: 10.1002/cncr.11293
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1(2), 581-585. doi: 10.1038/nprot.2006.83
- de Geus-Oei, L. F., Ruers, T. J. M., Punt, C. J. A., Willem Leer, J., Corstens, F. H. M., & Oyen, W. J. G. (2006). FDG-PET in colorectal cancer. *Cancer Imaging*, 6(Spec No A), S71-81. doi: 10.1102/1470-7330.2006.9014
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C. G., . . . Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(4), 256-269.
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7(1), 11-20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002

- Delarue, J., Normand, S., Pachiaudi, C., Beylot, M., Lamisse, F., & Riou, J. P. (1993). The contribution of naturally labelled  $^{13}\text{C}$  fructose to glucose appearance in humans. *Diabetologia*, *36*(4), 338-345. doi: 10.1007/BF00400238
- Eaton, S. L., Roche, S. L., Llaverro Hurtado, M., Oldknow, K. J., Farquharson, C., Gillingwater, T. H., & Wishart, T. M. (2013). Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. *PLoS ONE*, *8*(8), e72457. doi: 10.1371/journal.pone.0072457
- Effert, P., Beniers, A. J., Tamimi, Y., Handt, S., & Jakse, G. (2004). Expression of glucose transporter 1 (Glut-1) in cell lines and clinical specimens from human prostate adenocarcinoma. *Anticancer Res*, *24*(5a), 3057-3063.
- Feliciano, P. (2013). Hexokinase 2 required in tumors. *Nat Genet*, *45*(9), 969-969. doi: 10.1038/ng.2751
- Ferlay J, S. I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2015
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359-E386. doi: 10.1002/ijc.29210
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, 2008, pdb.prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot4986
- Gilsbach, R., Kouta, M., Bonisch, H., & Bruss, M. (2006). Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*, *40*(2), 173-177.
- Godoy, A., Montecinos, V. P., Gray, D. R., Sotomayor, P., Yau, J. M., Vethanayagam, R. R., . . . Smith, G. J. (2011). Androgen deprivation induces rapid involution and recovery of human prostate vasculature. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *300*(2), E263-275. doi: 10.1152/ajpendo.00210.2010
- Godoy, A., Ulloa, V., Rodríguez, F., Reinicke, K., Yañez, A. J., García, M. d. I. A., . . . Nualart, F. (2006). Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1–6 and GLUT9 in human cancer: Ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *Journal of Cellular Physiology*, *207*(3), 614-627. doi: 10.1002/jcp.20606
- Gowrishankar, G., Zitzmann-Kolbe, S., Junutula, A., Reeves, R., Levi, J., Srinivasan, A., . . . Gambhir, S. S. (2011). GLUT 5 is not over-expressed in breast cancer cells and patient breast cancer tissues. *PLoS ONE*, *6*(11), e26902. doi: 10.1371/journal.pone.0026902
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*, *35*(19), e127-e127. doi: 10.1093/nar/gkm671
- Hedley, A. A., Ogden, C. L., Johnson, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., & Flegal, K. M. (2004). PRevalence of overweight and obesity among us children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA*, *291*(23), 2847-2850. doi: 10.1001/jama.291.23.2847



- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, *71*(22), 6921-6925. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-1457
- Humphrey, P. A. (2007). Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J Clin Pathol*, *60*(1), 35-42. doi: 10.1136/jcp.2005.036442
- Hussein, Y. R., Bandyopadhyay, S., Semaan, A., Ahmed, Q., Albashiti, B., Jazaerly, T., . . . Ali-Fehmi, R. (2011). Glut-1 Expression Correlates with Basal-like Breast Cancer. *Transl Oncol*, *4*(6), 321-327.
- Ishimoto, T., Lanaspas, M. A., Le, M. T., Garcia, G. E., Diggle, C. P., Maclean, P. S., . . . Johnson, R. J. (2012). Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(11), 4320-4325. doi: 10.1073/pnas.1119908109
- Ito, K. (2014). Prostate cancer in Asian men. *Nat Rev Urol*, *11*(4), 197-212. doi: 10.1038/nrurol.2014.42
- <http://www.nature.com/nrurol/journal/v11/n4/abs/nrurol.2014.42.html#supplementary-information>
- Jacobson, J., Duchon, M. R., & Heales, S. J. (2002). Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass. *J Neurochem*, *82*(2), 224-233.
- Jiang, Z., Woda, B. A., Rock, K. L., Xu, Y., Savas, L., Khan, A., . . . Fanger, G. R. (2001). P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol*, *25*(11), 1397-1404.
- Johnson, R. J., Rivard, C., Lanaspas, M. A., Otabachian-Smith, S., Ishimoto, T., Cicerchi, C., . . . Hess, T. (2013). Fructokinase, Fructans, Intestinal Permeability, and Metabolic Syndrome: An Equine Connection? *Journal of equine veterinary science*, *33*(2), 120-126. doi: 10.1016/j.jevs.2012.05.004
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*, *23*(5), 537-548. doi: 10.1101/gad.1756509
- Kaaks, R., & Lukanova, A. (2002). Effects of Weight Control and Physical Activity in Cancer Prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *963*(1), 268-281. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04118.x
- Keembiyehetty, C., Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Steer, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., & Moley, K. H. (2006). Mouse Glucose Transporter 9 Splice Variants Are Expressed in Adult Liver and Kidney and Are Up-Regulated in Diabetes. *Molecular Endocrinology*, *20*(3), 686-697. doi: doi:10.1210/me.2005-0010
- Khan, T., van Brummelen, A. C., Parkinson, C. J., & Hoppe, H. C. (2012). ATP and luciferase assays to determine the rate of drug action in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, *11*, 369-369. doi: 10.1186/1475-2875-11-369
- Kothari, V., & Mathews, S. T. (2015). Detection of Blotted Proteins: Not All Blockers Are Created Equal # *T Detection of Blotted Proteins* (Vol. 1314, pp. 27-32).
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2005). Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. *Neoplasia*, *7*(1), 1-6.

- Kumar, V. (2010). *Robbins and Cotran's pathologic basis of disease* (8th ed. / Vinay Kumar. ed.). Philadelphia, Pa. ; London: Saunders.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007
- Laird, P. W., & Jaenisch, R. (1996). THE ROLE OF DNA METHYLATION IN CANCER GENETICS AND EPIGENETICS. *Annual Review of Genetics*, 30(1), 441-464. doi: doi:10.1146/annurev.genet.30.1.441
- Li, R., Ni, J., Bourne, P. A., Yeh, S., Yao, J., di Sant'Agnes, P. A., & Huang, J. (2005). Cell culture block array for immunocytochemical study of protein expression in cultured cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 13(1), 85-90.
- LifeTechnologies. (2014). Real-Time PCR Handbook (Handbook). Retrieved 2015, from Thermo Fisher Scientific Brand lifetechnologies.com/qpcr
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.
- Liu, H., Huang, D., McArthur, D. L., Boros, L. G., Nissen, N., & Heaney, A. P. (2010). Fructose Induces Transketolase Flux to Promote Pancreatic Cancer Growth. *Cancer Research*, 70(15), 6368-6376. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-4615
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Macdonald, I. (1966). Influence of fructose and glucose on serum lipid levels in men and pre- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 18(5), 369-372.
- Mäger, I., Eiríksdóttir, E., Langel, K., El Andaloussi, S., & Langel, Ü. (2010). Assessing the uptake kinetics and internalization mechanisms of cell-penetrating peptides using a quenched fluorescence assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(3), 338-343. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.001>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*, 4(9), 429-434. doi: 10.4103/1947-2714.100998
- Manolescu, A. R., Augustin, R., Moley, K., & Cheeseman, C. (2007). A highly conserved hydrophobic motif in the exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts as a critical determinant of their substrate selectivity. *Mol Membr Biol*, 24(5-6), 455-463. doi: 10.1080/09687680701298143
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., & Cheeseman, C. (2007). Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda)*, 22, 234-240. doi: 10.1152/physiol.00011.2007
- Marriott, B. P., Cole, N., & Lee, E. (2009). National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr*, 139(6), 1228s-1235s. doi: 10.3945/jn.108.098277
- Massie, C. E., Lynch, A., Ramos-Montoya, A., Boren, J., Stark, R., Fazli, L., . . . Mills, I. G. (2011). The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *The EMBO Journal*, 30(13), 2719-2733. doi: 10.1038/emboj.2011.158
- Matos, L. L., Trufelli, D. C., de Matos, M. G., & da Silva Pinhal, M. A. (2010). Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights*, 5, 9-20.

- Medina, R. A., Meneses, A. M., Vera, J. C., Guzman, C., Nualart, F., Astuya, A., . . . Owen, G. I. (2003). Estrogen and progesterone up-regulate glucose transporter expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Endocrinology*, *144*(10), 4527-4535. doi: 10.1210/en.2003-0294
- Michaud, D. S., Fuchs, C. S., Liu, S., Willett, W. C., Colditz, G. A., & Giovannucci, E. (2005). Dietary Glycemic Load, Carbohydrate, Sugar, and Colorectal Cancer Risk in Men and Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *14*(1), 138-147.
- Ministerio de Salud, G. d. C. (2010). Guía clínica Cáncer de próstata en personas de 15 años y más. Retrieved March, 2015, from <http://web.minsal.cl/portal/url/item/722233c6b946cd08e04001011f011d5e.pdf>
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., . . . Lodish, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, *229*(4717), 941-945.
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2-3), 121-138. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>
- Novoa, C., Anguita, C., Badilla-O, S., Aliaga, A., & Reyes, D. (2014). Nivel educacional como determinante en tamizaje de cáncer de próstata. *Revista médica de Chile*, *142*, 1136-1141.
- Okayama, H. (2012). Functional cDNA expression cloning: Pushing it to the limit. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *88*(3), 102-119. doi: 10.2183/pjab.88.102
- Parsons, J. K., Gage, W. R., Nelson, W. G., & De Marzo, A. M. (2001). p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. *Urology*, *58*(4), 619-624.
- Patel, C., Douard, V., Tharabenjasin, P., Topaktas, E., & Ferraris, R. (2014). Role of metabolism and intracellular trafficking in fructose-induced GLUT5 regulation (822.4). *The FASEB Journal*, *28*(1 Supplement).
- Patel, C., Douard, V., Yu, S., Gao, N., & Ferraris, R. P. (2015). Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *Faseb j.* doi: 10.1096/fj.15-272195
- Petit, J. M., Huet, O., Gallet, P. F., Maftah, A., Ratinaud, M. H., & Julien, R. (1994). Direct analysis and significance of cardiolipin transverse distribution in mitochondrial inner membranes. *Eur J Biochem*, *220*(3), 871-879.
- Pinthus, J. H., Bryskin, I., Trachtenberg, J., Lu, J.-P., Singh, G., Fridman, E., & Wilson, B. C. (2007). Androgen Induces Adaptation to Oxidative Stress in Prostate Cancer: Implications for Treatment with Radiation Therapy. *Neoplasia*, *9*(1), 68-80.
- Pizzi, S., Porzionato, A., Pasquali, C., Guidolin, D., Sperti, C., Fogar, P., . . . Parenti, A. (2009). Glucose transporter-1 expression and prognostic significance in pancreatic carcinogenesis. *Histol Histopathol*, *24*(2), 175-185.
- Pontén, F., Jirstrom, K., & Uhlen, M. (2008). The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *The Journal of Pathology*, *216*(4), 387-393. doi: 10.1002/path.2440
- Port, A. M., Ruth, M. R., & Istfan, N. W. (2012). Fructose consumption and cancer: is there a connection? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, *19*(5), 367-374. doi: 10.1097/MED.0b013e328357f0cb
- Pourhoseingholi, M. A. (2012). Increased burden of colorectal cancer in Asia. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *4*(4), 68-70. doi: 10.4251/wjgo.v4.i4.68

- Pryor, R. J., & Wittwer, C. T. (2006). Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods Mol Biol*, 336, 19-32. doi: 10.1385/1-59745-074-x:19
- Pyla, R., Poulou, N., Jun, J. Y., & Segar, L. (2013). Expression of conventional and novel glucose transporters, GLUT1, -9, -10, and -12, in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 304(6), C574-C589. doi: 10.1152/ajpcell.00275.2012
- Reinicke, K., Sotomayor, P., Cisterna, P., Delgado, C., Nualart, F., & Godoy, A. (2012). Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in benign and malignant human prostate tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2), 553-562. doi: 10.1002/jcb.23379
- Salla, J. T., Johann, A. C., Lana, A. M., do Carmo, M. A., Nunes, F. D., & Mesquita, R. A. (2008). Immunohistochemical study of GLUT-1 in oral peripheral nerve sheath tumors. *Oral Dis*, 14(6), 510-513. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01409.x
- Society, A. C. (2014). Survival Rates For Prostate Cancer. Retrieved March, 2015, from <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-survival-rates>
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. (2004). Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 24(36), 7779-7788. doi: 10.1523/jneurosci.1899-04.2004
- Stepanenko, A., Andreieva, S., Korets, K., Mykytenko, D., Huleyuk, N., Vassetzky, Y., & Kavsan, V. (2015). Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 771(0), 56-69. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.006>
- Stewart, G. D., Gray, K., Pennington, C. J., Edwards, D. R., Riddick, A. C., Ross, J. A., & Habib, F. K. (2008). Analysis of hypoxia-associated gene expression in prostate cancer: lysyl oxidase and glucose transporter-1 expression correlate with Gleason score. *Oncol Rep*, 20(6), 1561-1567.
- Tappy, L., & Lê, K.-A. (2010). *Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity* (Vol. 90).
- Thalmann, G. N., Anezinis, P. E., Chang, S. M., Zhou, H. E., Kim, E. E., Hopwood, V. L., . . . Chung, L. W. (1994). Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res*, 54(10), 2577-2581.
- Tretter, L., & Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2335-2345. doi: 10.1098/rstb.2005.1764
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., & Thorens, B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letters*, 524(1), 199-203. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03058-2
- Varma, M., Linden, M. D., & Amin, M. B. (1999). Effect of formalin fixation and epitope retrieval techniques on antibody 34betaE12 immunostaining of prostatic tissues. *Mod Pathol*, 12(5), 472-478.
- Vaupel, P., & Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 225-239. doi: 10.1007/s10555-007-9055-1
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.

- Ware, J. L. (1994). Prostate cancer progression. Implications of histopathology. *The American journal of pathology*, 145(5), 983-993.
- Whelan, K. F., Lu, J. P., Fridman, E., Wolf, A., Honig, A., Paulin, G., . . . Pinthus, J. H. (2010). What can surrogate tissues tell us about the oxidative stress status of the prostate? A hypothesis-generating in-vivo study. *PLoS ONE*, 5(12), e15880. doi: 10.1371/journal.pone.0015880
- Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89(01), 3-9. doi: doi:10.1079/BJN2002763
- Xie, H. (2008). Activity assay of membrane transport proteins. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40(4), 269-277.
- Young, C. D., Lewis, A. S., Rudolph, M. C., Ruehle, M. D., Jackman, M. R., Yun, U. J., . . . Anderson, S. M. (2011). Modulation of glucose transporter 1 (GLUT1) expression levels alters mouse mammary tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 6(8), e23205. doi: 10.1371/journal.pone.0023205
- Zhao, Y., Butler, E. B., & Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis*, 4, e532.