



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Mención Ciencias Fisiológicas.

Estudio del Rol Biológico de la Fructosa en Células de Cáncer Prostático.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ciencias
Fisiológicas

Por

NÉSTOR BASTIÁN CORRO ACUÑA

Director de Tesis: Alejandro S. Godoy, PhD

Marzo 2022



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

ACTA DEFENSA FINAL DE TESIS

Don Néstor Bastián Corro Acuña, estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Ciencias Fisiológicas, ha presentado la Defensa Pública de Tesis.

En consideración a los conocimientos generales sobre Fisiología, y la defensa de la Tesis Doctoral, titulada **"Estudio sobre el rol biológico del metabolismo de la fructosa en células de cáncer prostático"**, el Comité de Tesis a resuelto calificar esta actividad académica como Aprobada y con nota6,0 (seis coma cero)

Se firma la presente acta en la ciudad de Santiago, el día 28 de marzo de 2022.

Dr. Juan Correa M.
Decano
Facultad de Ciencias Biológicas-UC

Dr. Ricardo Moreno M.
Coordinador de Comité de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas-UC

Dr. Alejandro Godoy S.
Director de Tesis
Universidad San Sebastián

Dr. Gareth I. Owen
Miembro Comité de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas-UC

Dr. Maite Castro G.
Miembro Externo Comité de Tesis
Universidad Austral de Chile

Agradecimientos

Quisiera comenzar agradeciendo al Dr. Alejandro Godoy por aceptarme a realizar esta tesis doctoral bajo su tutela. Sus consejos, apoyo y críticas fueron fundamentales tanto para el desarrollo de esta tesis como para mi formación como investigador. Agradezco sus enseñanzas sobre la importancia de los detalles en ciencia, el trabajo en equipo y la constancia en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio, que mediante sus críticas y consejos siempre lograban darme claridad cuando las situaciones se volvían complejas. Muchas gracias, Dra. Daniela Carreño, Patricia Fuenzalida, Dra. Verónica Torres, Catalina Ascencio y Camila Schmidt por su amistad y cariño.

A los distintos colaboradores de nuestro laboratorio que siempre fueron un aporte a la discusión de resultados, y una guía cuando las cosas se volvían confusas. Muchas gracias a la Dra. Loreto Veliz, al Dr. Pedro Cisternas, y al Dr. Ignacio San Francisco. A los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis, Dra. Maite Castro, Dr. Gareth Owen y Dr. Carlos Vio. Sus consejos y críticas constructivas funcionaron como un cable a tierra cuando las expectativas eran más que lo realizable.

Finalmente, a Carolina, mi compañera con quien esta tesis ni siquiera hubiera dado un inicio. Siempre estaré agradecido de tu amor, apoyo incondicional y tu empuje en los momentos que más lo necesité. A mi hijo Oliver, todos los sacrificios habidos y los que vendrán son y serán para ti. A mis padres Arturo y Consuelo, que siempre me apoyaron de maneras que nunca hubiera podido imaginar. Solo cuando eres padre realmente te das cuenta de lo que ellos son capaces de hacer por un hijo, y ustedes han sido el mejor ejemplo que pude haber pedido. Gracias por el amor y la perseverancia. Y a mis hermanos y amigos, que de alguna manera práctica o emocional apoyaron al desarrollo de este trabajo de tesis.

Finalmente, agradezco a la Asociación Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), a través de su beca de doctorado nacional (Nº 21171084), así como al Departamento de Defensa de los Estados Unidos (proyecto Nº W81XWH-12-1-0314) por el financiamiento necesario para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Tabla de Contenidos

Agradecimientos	1
Abreviaciones	4
Resumen.....	5
Abstract	7
1. Introducción	9
1.1. Epidemiología y aspectos clínicos del cáncer prostático.....	9
1.2. Sintomatología y tratamiento del cáncer de próstata.	10
1.3. Efecto de la dieta y la obesidad sobre la incidencia del cáncer prostático.	13
1.4. Metabolismo y transporte de hexosas en células tumorales.	15
1.5. Características del metabolismo tumoral en el tejido prostático humano y en células de CaP.....	22
1.6. Potencial rol del metabolismo de la fructosa en las células de CaP.	25
2. Hipótesis	32
3. Objetivos Específicos	32
4. Resultados.....	33
4.1. Objetivos 1 y 2.....	33
4.1.1. Publicación 1	35
4.1.2. Publicación 2	67
4.1.3. Material complementario Publicación 2	94
4.2. Objetivo 3	100
4.2.1. Metodología.....	102

4.2.2. La incubación con glucosa o fructosa 5mM en líneas celulares de CaP incrementan los niveles de ATP intracelular en el tiempo, pero bajo un mecanismo dependiente del tipo celular y el tipo de hexosa.	109
4.2.3. Los niveles de lactato intracelular disminuyen significativamente en células de CaP al incubar con fructosa por 48 horas respecto a glucosa.	113
4.2.4. Incubaciones con glucosa o fructosa 5mM promueven la sobreexpresión relativa de mRNA de distintas enzimas metabólicas en líneas celulares de CaP.....	116
5. Discusión	121
5.1. Rol de fructosa en la proliferación de modelos <i>in vitro</i> de CaP.	122
5.2. Rol de fructosa en la estimulación del crecimiento tumoral en modelos preclínicos <i>in vivo</i> de CaP	126
5.3. Rol de fructosa en la producción de ATP y lactato y su efecto sobre expresión enzimática en células de CaP.....	129
6. Conclusiones.....	137
7. Referencias.....	138

Abreviaciones

Aco2	Aconitasa 2
ADT	Terapia de privación androgénica
ATP / ATPi	Adenosín trifosfato / Adenosín trifosfato intracelular
CaP	Cáncer de Próstata
DNL	Vía de la Lipogénesis <i>de novo</i>
FASN	Sintasa de ácidos grasos
GLUT	Transportador de glucosa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HK-2	Hexoquinasa 2
HFCS	Jarabe de maíz alto en fructosa
KHK	Cetohexoquinasa
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
ox-PPP / non ox-PPP	Vía oxidativa de las pentosas fosfato / Vía no oxidativa de las pentosas fosfato.
PET-FDG	Tomografía de emisión de positrones - Fluorodesoxiglucosa
PSA	Antígeno prostático específico
TCA	Ciclo de ácidos tricarboxílicos
T / DHT	Testosterona / Dihidrotestosterona

Resumen

El cáncer prostático (CaP) es uno de los cánceres de mayor prevalencia en hombres tanto en países occidentales desarrollados como en vías de desarrollo. Un número relevante de estudios epidemiológicos han vinculado la progresión del CaP de alto grado con el consumo de dietas altas en grasas, carbohidratos y obesidad. Para poder sostener la alta demanda por glucosa necesaria para alimentar sus altas tasas de proliferación, las células de cáncer sobreexpresan el transportador de glucosa 1 (GLUT-1). Dicha sobreexpresión ha sido utilizada como fundamento en técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET), utilizando moléculas como la fluorodesoxiglucosa (FDG) para detectar tumores primarios y metastásicos. Pero el PET-FDG ha mostrado una aplicabilidad clínica limitada al estadificar el CaP. Además, nuestro laboratorio ha reportado la sobreexpresión de transportadores GLUT-2, y 5 (ambos descritos como transportadores de fructosa), en células de CaP en desmedro de GLUT-1. La fructosa es una hexosa presente en alimentos procesados y su excesivo consumo ha sido vinculada a patologías como hígado graso no alcohólico, gota y síndrome metabólico, así como cáncer de mama, páncreas e intestinal, esbozando la posibilidad que fructosa podría dar el soporte proliferativo a las células de CaP en lugar de glucosa. Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo doctoral es que “las células de cáncer prostático captan fructosa intrínsecamente y que dicho transporte incrementa características celulares asociadas tanto a capacidades proliferación como de agresividad tumoral con respecto a glucosa”.

Para poder confirmar esta hipótesis, primero se evaluó *in vitro* la capacidad de fructosa en incidir en parámetros como la tasa de proliferación, la viabilidad celular y la capacidad migratoria/invasiva con respecto a glucosa en modelos celulares benignos y malignos de CaP. También estudiamos valores cinéticos del transporte de fructosa en líneas celulares malignas de CaP. Posteriormente evaluamos el crecimiento tumoral en modelos *in vivo* de xenotransplante de CaP expuestos a la incorporación de fructosa o glucosa en la dieta, así como describir la expresión de transportadores GLUTs de fructosa y glucosa en los tumores. Finalmente analizamos el efecto de la incubación con fructosa o glucosa por hasta 72 horas sobre los niveles de ATP intracelular (ATPi), lactato intracelular, y su impacto en los niveles relativos de algunas enzimas metabólicas de interés mediante qPCR.

Los resultados demostraron que fructosa podía mantener tasas de proliferación y viabilidad comparables a glucosa y aunque no modifica capacidades migratorias, si incrementa la invasividad tumoral en modelos *in vitro* de CaP. Los estudios cinéticos describieron que las células de CaP poseen una afinidad de transporte por fructosa correspondiente a la descrita para GLUT-5, sugiriendo que es GLUT-5 quien media este transporte. Ensayos de knockdown de GLUT-5 mediante siRNA confirmaron esta observación. La adición de fructosa en el agua de beber incrementó el tamaño de los tumores de modelos murinos de xenotransplante derivados tanto de línea celulares de PC3 como muestras clínicas, mientras glucosa en el agua no incidió significativamente sobre el tamaño tumoral con respecto al control. El análisis inmunohistoquímico de los tumores postratamiento reportó aumentos en los niveles de expresión de GLUT-5, 9 en presencia de fructosa con respecto a glucosa y control. Los niveles de ATPi se vieron incrementados tanto con glucosa como con fructosa al cabo de 72 horas en células malignas de CaP, pero no en benignas. Los niveles de ATPi con fructosa fueron significativamente menores con respecto a glucosa. Por otra parte, los niveles de lactato intracelular en células cultivadas con fructosa en el medio presentaron una disminución significativa respecto al control, mientras glucosa incremento dicho valor, sugiriendo que los metabolitos están siendo desviados a otras vías metabólicas o que el transporte de lactato ha sido afectado por la incubación con fructosa. Finalmente, se analizaron los niveles relativos de mRNA de las enzimas metabólicas, encontrando la sobreexpresión de las enzimas HK-2, G6PDH y FASN en células LNCaP y DU145.

La importancia de este estudio radica en demostrar que fructosa es una hexosa que puede alimentar a las células de CaP mediante GLUT-5, un transportador que se sobre expresa en células y tejidos malignos de CaP y que tiene potencial para sostener la proliferación y viabilidad celular maligna. Aunque el mecanismo por el cual esta potenciación no está aún descrito, nuestros datos sugieren que dicho mecanismo involucra el consumo de fructosa dietética, influye en metabolitos como ATP y lactato intracelular, y puede modular la actividad de algunas enzimas a nivel de transcrito, lo que demuestra que fructosa y su metabolismo en CaP tienen potencial de ser utilizados como blancos terapéuticos o biomarcadores en CaP.

Abstract

Prostatic cancer (PCa) is one of the most prevalent cancers in men, in both developed and developing western countries. A relevant number of epidemiological studies have proven a link between the progression of high-grade PCa with the consumption of high-fat, high-carbohydrate diets, and obesity. In order to sustain a high glucose demand, necessary for fuel their high proliferation rate, cancer cells usually overexpress the glucose transporter 1 (GLUT-1). This overexpression has been used as a basis in imaging techniques such as positron emission tomography (PET) using molecules such as fluorodeoxyglucose (FDG) to detect primary and metastatic tumors. But PET-FDG has shown limited clinical applicability in staging PCa. In addition, our laboratory has reported the overexpression of GLUT-2 and 5 (both previously described as capable of fructose uptake) in PCa cells to the detriment of GLUT-1. Fructose is a hexose present in processed foods and its excessive consumption has been linked to pathologies such as non-alcoholic fatty liver, gout, and metabolic syndrome, as well as breast, pancreatic and intestinal cancer, outlining the possibility that fructose could provide proliferative support to PCa cells instead of glucose. Therefore, the hypothesis of this doctoral thesis is that “prostate cancer cells intrinsically uptake fructose and this transport enhances cellular characteristics associated with proliferation capacities and tumor aggressiveness with respect to glucose”.

To confirm this hypothesis, the ability of fructose to influence parameters such as proliferation rate, cell viability and migratory/invasive ability with respect to glucose in benign and malignant cellular models of PCa was first evaluated *in vitro*. We also studied kinetic values of fructose transport in malignant PCa cell lines. Subsequently, we evaluated tumor growth in *in vivo* PCa xenotransplantation models exposed to the incorporation of fructose or glucose in the diet, while describing the expression of fructose and glucose transporters GLUTs in their tumors. Finally, we analyzed the effect of incubation with fructose or glucose for up to 72 hours on the levels of intracellular ATP (ATPi), intracellular lactate, and its impact on the relative levels of metabolic enzymes of interest using qPCR.

The results showed that fructose can support proliferation and viability rates comparable to glucose and, although it does not change migratory abilities, it does increase tumor invasiveness in *in vitro* models of PCa. Kinetic studies described that PCa cells have an affinity

for fructose transport corresponding to the one described for GLUT-5, suggesting that GLUT-5 is the one that mediates this transport. GLUT-5 knockdown assays by siRNA confirmed this observation. The addition of fructose in drinking water increased the size of tumors in murine xenotransplantation models derived from both PC3 cell lines and clinical samples, while glucose in the water did not significantly affect tumor size compared to control. Immunohistochemical analysis of post-treatment tumors reported increases in the expression levels of GLUT-5 and 9 in tumors growth in fructose enriched diet compared to glucose and control. ATPi levels were increased with both glucose and fructose after 72 hours in malignant PCa cells models but not in benign prostate cells. ATPi levels in fructose treatment were significantly lower than glucose after 72 hours of exposition in PCa cells. Meanwhile, the levels of intracellular lactate in cells cultured with fructose in media showed a significant decrease compared to the control, while glucose incubation increased said value, suggesting that the metabolites are being diverted to other metabolic pathways or lactate transport has been affected by fructose incubation. Finally, the relative levels of mRNA of the metabolic enzymes were analyzed, finding overexpression of the enzymes HK-2, G6PDH and FASN in LNCaP and DU145 cells.

The importance of this study lies in proving that fructose is a hexose that can feed PCa cells through GLUT-5, a transporter that is overexpressed both in malignant PCa cells and tissues and therefore, has the potential to support malignant cell proliferation and viability. Although the mechanism of this potentiation is not yet described, our data suggest that dietary fructose consumption and therefore, transport and metabolism of fructose by PCa cells, can influences metabolites such as ATP and intracellular lactate, and may modulate the activity of some enzymes at the transcript level, ultimately proposing that fructose and its metabolism in PCa have the potential to be used as therapeutic targets or biomarkers in PCa staging.

1. Introducción

1.1. Epidemiología y aspectos clínicos del cáncer prostático.

El cáncer comprende un conjunto de patologías que pueden iniciarse en cualquier tejido del cuerpo y que se caracteriza por un crecimiento desregulado de uno o más tipos celulares que lo componen. Estas células alteradas pueden escapar de los límites del tejido de origen e invadir otros en un mecanismo conocido como metástasis, siendo esta la principal causa de muerte por cáncer en el mundo (OMS, 2021). Se define entonces como cáncer prostático (CaP) a un crecimiento descontrolado de las células de esta glándula, patología asintomática y de alta sobrevivencia si es detectada en etapas tempranas pero sintomática y muy letal si no es controlada oportunamente. Según Siegel *et al.* (2021), para el año 2021 se estima un total de 248.530 nuevos casos de CaP y 34.310 fallecimientos asociados a esta enfermedad solo en Estados Unidos, lo que posiciona al CaP como el cáncer con mayor incidencia de nuevos casos en ese país con un 26% del total. En Chile las estimaciones más recientes realizadas por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) dan cuenta que al 2020, el CaP es el cáncer de mayor incidencia y mortalidad en la población masculina, con valores de 56,7 y 14,0 por cada 100.000 habitantes respectivamente (Sung *et al.*, 2021).

La próstata es una glándula encontrada solo en mamíferos machos, parte del sistema reproductor masculino y dentro de sus funciones fisiológicas están la de operar como un intercambiador muscular entre la eyaculación y la micción, así como la de producir y contener fluidos que componen parte del semen. La próstata se ubica por debajo de la vejiga, frente del recto y por delante de las vesículas seminales mientras que la glándula es atravesada

transversalmente por la uretra. 95 al 99% de los CaP diagnosticados son identificados como adenocarcinomas, siendo 9 de cada 10 adenocarcinomas acinares, vale decir, que se desarrollan a partir de las células glandulares encargadas de crear el fluido prostático. El resto de los diagnósticos de CaP suelen ser en mayor medida neuroendocrinos o sarcomas (Humphrey, 2012, 2017; Shah y Zhou, 2019). Según la Sociedad Americana para la Investigación del Cáncer, los factores de riesgo mejor establecidos son la edad (muy raro antes de los 40 años, pero la probabilidad de contraer CaP aumentan rápidamente a partir de los 50 años), la etnicidad (CaP se desarrolla más frecuentemente en hombres con descendencia afroamericana) y la historia familiar (las probabilidades se duplican si el paciente tiene un hermano o padre con CaP). Algunos estudios sugieren que la predisposición genética a CaP puede ser responsable del 5% al 10% de los casos de CaP cada año, siendo otro 30% a 40% causada por mutaciones más comunes (Siegel *et al.*, 2021).

1.2. Sintomatología y tratamiento del cáncer de próstata.

La sintomatología asociada a CaP se relaciona al crecimiento exacerbado de la próstata y sus efectos sobre estructuras colindantes. Problemas relacionados a la micción incluyendo flujo urinario débil, lento y/o con frecuencia incrementada; presencia de sangre tanto en orina como en semen, disfunción eréctil y en casos más severos, dolores en caderas, espalda y/o costillas (zonas donde la metástasis por CaP suele ocurrir), entre otros. Debido a que la mayoría de estos síntomas también pueden ocurrir con patologías no cancerosas como la hiperplasia benigna de la próstata, se debe determinar la presencia del tumor y su malignidad mediante estadificación y graduación histopatológica del tumor. Para esto, se han descrito dos mecanismos de estadificación del CaP que pueden dar cuenta del grado de avance de esta: i)

estadificación clínica, basado en los resultados en conjuntos de los niveles del Antígeno Prostático Específico en suero (PSA por sus siglas en ingles), observaciones obtenidas a partir del examen rectal digital y del “Gleason Score” (puntaje de 0 a 10 asignado según la apariencia de las células en el microscopio) otorgado a la biopsia por un patólogo y **ii)** la estadificación patológica, basada en información determinada durante la cirugía además de resultados de laboratorio del tejido prostático y algunos nodos linfáticos removidos durante esta. Estas estadificaciones son agrupadas en un sistema llamado TNM (tumor, nodo, metástasis), cuyos resultados combinados dan cuenta de 4 etapas definidas según el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (*Prostate Cancer: Stages and Grades | Cancer.Net*):

- Etapa 1: El CaP en esta etapa temprana presenta un crecimiento lento y sus células presentan un aspecto poco indiferenciado al microscopio.
- Etapa 2: El tumor se encuentra confinada dentro de la glándula prostática, los niveles de PSA son bajos o moderados. En esta etapa el tumor es pequeño, pero presenta un riesgo inminente de crecimiento y diseminación.
- Etapa 3: Niveles de PSA altos, el tumor crece y tiene un puntaje Gleason de riesgo (sobre 7 puntos de 10). Localmente las células de cáncer se presentan altamente indiferenciadas y su crecimiento y diseminación a tejidos colindantes es inminente.
- Etapa 4: El CaP ya se ha esparcido fuera de la próstata hacia nodos linfáticos colindantes, y en casos más extremos hacia otras partes del cuerpo.

Los pacientes afectados con CaP son asistidos por equipos médicos en conjunto con guías clínicas, determinan un curso de acción apropiado para cada paciente. Es importante

considerar el efecto secundario de dichos tratamientos y la incidencia de comorbilidades preexistentes de manera de encontrar un equilibrio entre la sobrevivencia del paciente y el perjuicio a su calidad de vida. Los efectos secundarios más comunes a los distintos tratamientos pueden abarcar desde, por ejemplo, disfunciones urinarias, sexuales y de vejiga, hasta desbalances hormonales resultantes en ginecomastia, por lo que tumores denominados como de “bajo riesgo” (Etapas 1 y 2) suelen ser vigilados por el equipo médico hasta que la intervención médica se vuelve inevitable. El desarrollo de un tumor de CaP puede tomar varios años y no necesariamente afectar la vida de los pacientes durante dicho periodo. Aquellos pacientes que deciden tomar tratamiento del tumor suelen verse sometidos a cirugías como la prostatectomía radical, radioterapia y en casos de pacientes con tumores de alto riesgo, terapias de deprivación androgénica (ADT por sus siglas en inglés) (Brawley, Mohan y Nein, 2018).

La ADT tiene como objetivo disminuir los niveles séricos de andrógenos como la testosterona (T) o dihidrotestosterona (DHT) mediante disminución en la producción en testículos y glándulas suprarrenales mediante cirugía (orquiectomía o remoción de los testículos), agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHDH, afectando la liberación de andrógenos en los testículos), moléculas que bloquean la producción de andrógenos fuera de los testículos (como Quetoconazol o Abiraterona) y antagonistas que bloquean la actividad del receptor de andrógenos tanto en células de CaP como benignas (como Flutamida, Bicalutamida o Nilutamida). Estos tratamientos buscan aprovechar la dependencia de las células de CaP a la actividad de los andrógenos para sostener sus capacidades proliferativas, pero aquellos pacientes que recurren a estos tratamientos suelen ser afectados por un fenotipo de CaP denominado “cáncer prostático resistente a la castración” (CRPC por sus siglas en inglés) (Proverbs-Singh *et al.*, 2015). Dicho cáncer es muy difícil de tratar, más

agresivo que las etapas anteriores y de la cual no existe cura. Se ha estimado que la tasa de supervivencia relativa en 5 años (desde el primer diagnóstico) para pacientes con CaP ronda el 98%, aunque dicho porcentaje difiere según el grado de avance del tumor: la tasa de supervivencia es prácticamente del 100% para tumores que no se han esparcido fuera de la glándula prostática como para aquellos casos donde el tumor ha invadido nodos linfáticos cercanos, por otro lado, si el CaP se ha diseminado a tejidos distantes la tasa de supervivencia baja al 30%. (Siegel *et al.*, 2021).

Las mayores probabilidades de éxito para los tratamientos de CaP son muy dependientes de la capacidad de diagnóstico en las etapas iniciales, donde la supervivencia al cáncer es mayor y los efectos de los tratamientos son más llevaderos. Es por esto que los esfuerzos de estadificación del CaP y las distintas estrategias de prevención y control en etapas tempranas ha logrado mantener estables tanto las tasas de incidencia como la de mortalidad por CaP desde el año 2013 en adelante en EE. UU., lo que por una parte demuestra lo efectivo de esta metodología, pero que por otra, deja en evidencia la necesidad de investigar, innovar y desarrollar nuevas y más precisas técnicas de análisis clínicos y biomarcadores capaces de detectar el CaP en etapas iniciales, siendo este uno de los desafíos más importantes en la batalla contra el CaP.

1.3. Efecto de la dieta y la obesidad sobre la incidencia del cáncer prostático.

Además de los factores de riesgo previamente establecidos, otros factores han sido reportados como significativos sobre la incidencia de CaP, aunque con no tan claros mecanismos de acción como el tabaquismo, la obesidad, el ejercicio y la dieta. Varios estudios epidemiológicos han sugerido fuertemente que la obesidad está asociada con la progresión en

CaP avanzado (Cerhan *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 2019). Tanto CaP como obesidad se correlacionan positivamente en regiones como Norteamérica (sobre el 40% de prevalencia en obesidad) con respecto a países asiáticos (menos del 10% de prevalencia de obesidad) que destacan por bajos niveles de CaP en su población. Durante la última década, distintos grupos se han dedicado a estudiar la relación entre CaP y distintos nutrientes como grasa, azúcares, así como con patrones de alimentación como la Dieta Occidental. Los carbohidratos son moléculas abundantes en frutas, arroz, trigo y papas, clasificadas como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, o polisacáridos en función del número de monómeros que la componen. De estos, los monosacáridos y disacáridos son los más abundantes tanto en frutas como en productos de consumo diario, siendo azúcares como la glucosa o fructosa rápidamente metabolizados por el cuerpo y en donde un alto consumo de ellos puede llevar a producir patologías como la hiperinsulinemia y la obesidad (Matsushita, Fujita y Nonomura, 2020). Como resultado, el alto consumo de mono o disacáridos puede contribuir a la progresión de CaP mediante inflamación mediada por IGF-1 (Allott, Masko y Freedland, 2013). Freedland y cols. (Freedland *et al.*, 2008) analizaron el efecto de incorporar una dieta cetogénica (sin carbohidratos) en un modelo preclínico de CaP (xenotransplante con células LAPC-4), reportando una disminución del 15% de la masa corporal pero también del 33% del tamaño del tumor primario, así como un aumento en la sobrevida comparado a aquellos animales alimentados con dieta occidental.

Se han reportado algunos estudios enfocados en investigar la relación entre el consumo de carbohidratos y el riesgo de desarrollar CaP en humanos. Una revisión sistemática de un total de 46 publicaciones sobre factores dietéticos y riesgo en CaP encontró una asociación entre el consumo de dietas altas en grasa, carnes rojas y calcio con un riesgo incrementado de CaP,

mientras que se encontraron inconsistencias al relacionarlo con el consumo de ciertas frutas y vegetales (Gathirua-Mwangi y Zhang, 2014). Un estudio prospectivo de 3.184 adultos analizó si existe alguna diferencia entre la cantidad o la calidad de los carbohidratos consumidos sobre el riesgo de desarrollar algunos cáncer relacionados a obesidad (mama, próstata y colorrectal), encontrando que el consumo incrementado de jugos de fruta estaba significativamente asociado al riesgo en CaP sin encontrar diferencias entre el consumo de bebidas endulzadas y dicho riesgo (Makarem *et al.*, 2017, 2018). Sin embargo, otro estudio en 22.720 hombres reportó que el consumo de jugos de frutas no tenía relación con el riesgo de CaP mientras que las bebidas endulzadas si tenían una relación significativa (Miles, Neuhouser y Zhang, 2018). Estos estudios, aunque diversos, sugieren que tanto la cantidad como la calidad de los carbohidratos consumidos son relevantes en la incidencia de desarrollo de CaP, destacando una diferencia entre los azúcares provenientes de fuentes naturales a aquellas incorporadas en alimentos procesados, pero sin descuidar que una sobrecarga de azúcares en la alimentación, independiente de su fuente, puede incrementar el riesgo de CaP.

1.4. Metabolismo y transporte de hexosas en células tumorales.

Una de las principales características de las células de cáncer es su alta tasa de proliferación respecto a células sanas. Dado que este crecimiento requiere de nutrientes y energía, las células tumorales deben modificar su metabolismo de manera que puedan satisfacer dicha demanda mediante alteraciones del metabolismo energético, biosintético y de balance redox que puedan dar soporte a la sobrevivencia celular. Las alteraciones que las células tumorales adoptan para modular el metabolismo de azúcares, lípidos y aminoácidos abarcan cambios en los perfiles de captación de nutrientes, reprogramación de vías de señalización

asociadas a biosíntesis, desacople de la actividad mitocondrial, entre otros. Estas adaptaciones dependen de distintas variables como el tipo celular afectado, la etapa de evolución del tumor, así como de la disponibilidad de otros factores como presión parcial de oxígeno, disponibilidad de distintos factores de crecimiento, el grado de vascularización del tumor, etc. (DeBerardinis y Chandel, 2016), lo que indica que el metabolismo tumoral es un proceso complejo, influenciado fuertemente por el microambiente y la disponibilidad de nutrientes en el tiempo. A pesar de la alta heterogeneidad molecular y genética que existe entre distintos tipos de tumores, las adaptaciones en el metabolismo tumoral y otras vías necesarias para la proliferación celular suelen convergen en alteraciones que son comunes para una buena parte de los tumores estudiados hasta hoy. (Bose, Allen y Locasale, 2020). Esta confluencia de características en el metabolismo tumoral conforman una diana de interés farmacológico y clínico que sustentan la base biológica del desarrollo de terapias, fármacos y técnicas de detección por imágenes basadas en captura de metabolitos y otras moléculas análogas (Hanahan y Weinberg, 2011; Vander Heiden y DeBerardinis, 2017; Carreño *et al.*, 2019; Stuani, Sabatier y Sarry, 2019).

En el 2016, DeBerardinis y Chandel definieron el término “reprogramación metabólica” como el proceso por el cual una o más vías metabólicas se ven incrementadas o reprimidas en las células de cáncer respecto a su contraparte benigna. Un ejemplo clásico de este efecto en cáncer es el “efecto Warburg” (Lunt y Vander Heiden, 2011). La glucólisis anaeróbica es una respuesta fisiológica de los tejidos normales en hipoxia en donde la glucosa es metabolizada preferentemente hacia la producción de lactato en vez de piruvato, lo que permite la generación de moléculas de ATP en bajas concentraciones de oxígeno. En 1924, Otto Warburg describió en cortes de tumores sólidos que estas células malignas absorbían más glucosa que sus contrapartes benignas y que destacaban por una preferencia a la fermentación

láctica en condiciones de normoxia, fenómeno que hoy en día es denominada como “glucólisis aeróbica” (Warburg, 1956), observación que ha sido corroborada en muchos otros tipos de células cancerígenas (Koppenol, Bounds y Dang, 2011). Warburg originalmente sugirió que las células tumorales desarrollaban este fenotipo debido a una inhibición de la actividad mitocondrial y subsecuente dependencia del metabolismo glucolítico, explicación que hoy en día ha sido refutada debido a que la función mitocondrial no está impedida en la mayoría de las células tumorales (Wallace, 2012; DeBerardinis y Chandel, 2016; Vasan, Werner y Chandel, 2020). Muchos estudios no solo han demostrado que la actividad mitocondrial es necesaria para la proliferación de células de cáncer, sino que la gran mayoría de las células tumorales tiene la capacidad de producir energía a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Weinberg *et al.*, 2010; Israelsen *et al.*, 2013; Martínez-Reyes *et al.*, 2016). Otra particularidad de la actividad mitocondrial es la versatilidad que tiene el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA) para utilizar moléculas distintas al piruvato, como la glutamina, que pueden servir de sustrato para las células de cáncer, otorgando adaptabilidad a los cambios del microambiente al que estas células se ven sometidas durante la evolución del tumor (Boroughs y DeBerardinis, 2015). En general, las alteraciones metabólicas pueden incluir una capacidad incrementada de adquirir nutrientes, potenciar vías metabólicas preferentes, y alterar la modulación normal de las vías asociadas a la proliferación celular (Pavlova y Thompson, 2016)

El aumento en la proliferación en células de cáncer debe ir acorde a la captación y posterior metabolización de moléculas necesarias para alimentar vías de síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, siendo la glucólisis una de las vías alteradas en la mayoría de los tumores estudiados y por ende la de mayor estudio en el campo del metabolismo tumoral. El aumento en la glucólisis es una característica recurrente en el proceso carcinogénico, lo que

vuelve a sus componentes enzimáticos, cofactores y transportadores de glucosa en potenciales biomarcadores de la progresión tumoral, así como de dianas de interés farmacológico. Los GLUTs son transportadores facilitativos de azúcares, capaces de mover hexosas como glucosa, fructosa, manosa u otras moléculas como el inositol o agua, permitiendo la permeabilización de estas moléculas a favor del gradiente de concentración. Esta familia (bajo el nombre familiar genético *SLC2A*) caracterizada por 14 miembros se subdivide a su vez en tres clases dependiendo del nivel de identidad de la secuencia nucleotídica: Clase 1 (GLUTs 1-4, 14); Clase 2 (GLUTs, 5, 7, 9 y 11); Clase 3 (GLUTs 6, 8, 10, 12 y 13/HMIT). Por otro lado, la homología de las secuencias aminoacídicas muestra una identidad de entre 39-68% entre los GLUTs 1 al 5 y al menos un 28% de identidad entre GLUT-1 y el resto de los miembros de esta familia (Ancey, Contat y Meylan, 2018). La distribución de estos transportadores revela tanto una expresión tejido-dependiente como una gran versatilidad en el transporte de moléculas de acuerdo con sus afinidades (distintos GLUTs tienen distintas afinidades al mismo sustrato) así como multifuncionalidad (un mismo GLUT puede transportar más de un sustrato). La expresión de estos transportadores responde también al contexto fisiológico en el que las células y tejidos están expuestos. Por ejemplo, el cerebro es conocido por ser un tejido cuya actividad depende fuertemente del transporte de glucosa por lo que expresa transportadores de alta afinidad como GLUT-1 (K_m 3mM por glucosa) y GLUT-3 (K_m 1,1mM por glucosa) mientras que transportadores de menor afinidad por glucosa como GLUT-2 (K_m 17mM por glucosa) son esenciales para activar y modular la secreción de insulina desde los islotes β del páncreas en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre luego de la ingesta de alimentos. (Ancey, Contat y Meylan, 2018; Berger y Zdziebło, 2020; Echeverría *et al.*, 2021). En la tabla

Nº1 se han resumido las principales afinidades y sitios de expresiones de los transportadores GLUTs conocidos a la fecha.

De todos los miembros, GLUT-1 es el transportador más estudiado en células tumorales siendo también el GLUT expresado de manera más ubicua en los tejidos humanos (DeBerardinis *et al.*, 2008; Hsu y Sabatini, 2008; Jones y Thompson, 2009; Augustin, 2010), siendo también sobreexpresado en un número importante de tumores, encontrando una correlación positiva entre el nivel de expresión de GLUT-1 y el desarrollo de metástasis, así como de bajas probabilidades de sobrevivencia de los pacientes (Koh, Lee y Park, 2017; Zhang, Xie y Li, 2019; Kaida *et al.*, 2020). El aumento tanto en el perfil de expresión de GLUT-1, así como en la activación de sus genes asociados es, en la mayoría de los tumores estudiados, una característica importante en el desarrollo desde un fenotipo benigno a uno maligno (Warburg, 1956; Birnbaum, Haspel y Rosen, 1987; Flier *et al.*, 1987; Godoy *et al.*, 2006; Reinicke *et al.*, 2012). Este incremento en los niveles de GLUT-1 promueve tanto la captación de glucosa como el desarrollo de fenotipos tipo Warburg, vale decir, que cambian desde un perfil oxidativo de glucosa a uno fermentativo.

La alta captación de glucosa en células tumorales es la base biológica que sustenta técnicas de detección de tejidos con alta capacidad de captación de glucosa, permitiendo la localización de tumores primarios y sitios de metástasis. De estas técnicas, la tomografía de emisión de positrones (PET-Scan) se basa en la captación de un análogo de glucosa marcada, la 2-deoxi-2-[18F]-fluoro-D-glucosa ([18F]-FDG). El FDG es una molécula que es reconocida por transportadores como el GLUT-1, pero que no puede ser fosforilada hacia la glucólisis, por lo que se tienden a acumular el trazador de una manera correlativa a la capacidad de captación

TABLA N^o1

Nombre, Especificidad, afinidad a sustratos y localización de transportadores GLUTs en humanos.

Isoforma/gen	Clase/número de transcritos	Especificidad/afinidad	Localización celular principal	Expresión en tejidos benignos	Expresión en tejidos malignos
GLUT-1/SLC2A1	Clase I/4	Glucosa/Km 3 mM, glucosamina/Km 2.1 mM, DHA/Km 1.1 mM, manosa/N.D.	Membrana, intracelular	Barrera hemato-encefálica, eritrocitos, astrocitos	Pulmón, colorrectal, cabeza y cuello, astrocitoma
GLUT-2/SLC2A2	Clase I/2	Glucosa/Km 17 mM, galactosa/Km 85 mM, glucosamina/Km 0.8 mM, fructosa/Km 11 mM manosa/N. D, DHA/Km 2.33 mM	Membrana	Riñón, hígado, retina, páncreas	Carcinoma hepatocelular, mama
GLUT-3/SLC2A3	Clase I/2	Galactosa/Km 8.5 mM, DHA/Km 1.1 mM, glucosa/Km 1.4 mM	Membrana	Neurona, testículos, placenta, astrocitos	Gástrico, glioblastoma, cabeza y cuello
GLUT-4/SLC2A4	Clase I/3	Glucosa/Km 5.2 mM, DHA/Km 0.98 mM, glucosamina/Km 3.9 mM	Membrana	Células adiposas, musculo esquelético y cardiaco	Mama, mieloma, glioblastoma, endometrial
GLUT-5/SLC2A5	Clase II/9	Fructosa/Km 6 mM	Membrana, intracelular	Intestino delgado, riñón	Leucemia mieloide aguda, próstata, páncreas, pulmón, glioblastoma
GLUT-6/SLC2A6	Clase III/4	Glucosa/Km 5 mM	Membrana	Cerebro, bazo	Endometrial, mama, páncreas, gástrico

Isoforma/gen	Clase/número de transcritos	Especificidad/afinidad	Localización celular principal	Expresión en tejidos benignos	Expresión en tejidos malignos
GLUT-7/SLC2A7	Clase II/1	Glucosa/Km 0.3 mM, fructosa/Km 0.2 mM	Membrana	Colon, intestino delgado	Mieloma
GLUT-8/SLC2A8	Clase III/10	Glucosa/Km 2 mM, DHA/Km 3.23 mM	Membrana	Células adiposas, neuronas	Endometrial, mieloma
GLUT-9/SLC2A9	Clase II/4	Glucosa/Km 0.61 mM, fructosa/Km 0.42 mM, urato/Km 0.890 mM	Membrana	Pulmón, hígado, riñón	Carcinoma hepatocelular
GLUT-10/SLC2A10	Clase III/2	2-deoxi-D-glucosa/Km 0.3 mM	Membrana, intracelular	Hígado, páncreas, placenta	Gástrico, leucemia mieloide aguda
GLUT-11/SLC2A11	Clase II/6	Glucosa/Km 0.16 mM, fructosa/Km 0.06 mM	Membrana	Riñón, musculo esquelético	Mieloma
GLUT-12/SLC2A12	Clase III/1	Glucosa/N.D. galactosa/N.D.	Membrana	Musculo esquelético, próstata	Próstata
HMIT/SLC2A13	Clase III/2	Mioinositol/Km 0.1 mM	Membrana	Células adiposas, cerebro	Renal, mama
GLUT-14/SLC2A14	Clase I/8	N.D.	Membrana, intracelular	Testis	Testis

N.D., no determinado.

Adaptado de Echeverría et al., 2021

de glucosa. El PET-FDG es utilizado para detectar tumores sólidos, así como evaluar el efecto de los tratamientos en tumores como mama (Groheux *et al.*, 2016; Paydary *et al.*, 2019), rectal (Crimi *et al.*, 2021), cérvico (Gandy *et al.*, 2019) y linfoma (Cheson, 2018), entre otros.

1.5. Características del metabolismo tumoral en el tejido prostático humano y en células de CaP.

La progresión de CaP es también favorecida por alteraciones moleculares que promueven un incremento en la biosíntesis de lípidos, glucosa y de glutaminas, pero dichas alteraciones se efectúan bajo un perfil metabólico muy particular en CaP que lo diferencia del resto de los carcinomas. Las células epiteliales liberan al fluido prostático altos niveles de citrato mediante la inhibición endógena de la enzima m-aconitasa (cuya función en el TCA es la de generar isocitrato a partir de citrato). Esta inhibición es gatillada por la sobreexpresión de la proteína ZIP1 (zinc-regulated transporter/iron-regulated transporter-like protein) en las células epiteliales prostáticas. Debido a que el TCA se encuentra limitado en estas células, un aumento en la actividad glucolítica es necesaria para compensar dicha limitación. Sin embargo, durante el primer paso de la carcinogénesis de CaP, los niveles de ZIP1 disminuyen a medida que la actividad de la OXPHOS aumenta (Singh *et al.*, 2006), actividad que se ve mitigada a medida que las células de CaP se vuelven más invasivas (Vayalil y Landar, 2015), lo que se contradice con lo descrito en el efecto Warburg. Por otro lado, la sobreproducción de lactato ha sido asociada a la progresión de células de CaP dependientes de OXPHOS. Estas células utilizan la secreción de interleuquina-6 para activar la glucólisis en los fibroblastos asociados a cáncer (CAF), que a su vez incrementan la secreción de lactato en el microambiente tumoral (Doldi *et al.*, 2015). El lactato es entonces consumido por las células de CaP, lo que sugiere que el

metabolismo del lactato puede cumplir un rol en la homeostasis de estas células tumorales (Cutruzzolà *et al.*, 2017).

El metabolismo glucolítico en células de CaP depende fuertemente de la señalización del receptor de andrógenos (AR). El AR es un factor de transcripción nuclear regulado por ligando perteneciente a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas. Este factor se une a ligandos como la testosterona (T) o dihidrotestosterona (DHT), dimerizando y translocándose al núcleo, permitiéndole regular la transcripción de miles de genes involucrados en diferenciación celular y proliferación (Jamroze, Chatta y Tang, 2021). La expresión de genes sensibles a andrógenos está involucrada en la formación y mantención de la citoarquitectura, homeostasis y fisiología prostática, mientras que en CaP, los andrógenos promueven proliferación y sobrevivencia de las células tumorales. Las células de CaP en etapas tempranas son células dependientes de la actividad de AR, y, por ende, son sensibles a la disponibilidad de andrógenos. Por otro lado, se ha descrito que estas células insensibles a andrógenos suelen tener una mayor dependencia de la actividad glucolítica (Higgins *et al.*, 2009; Vaz *et al.*, 2012).

Aunque la expresión de los GLUTs en cáncer ha sido estudiada extensamente en la última década, no existe una idea clara de la manera en que la expresión y funcionalidad de estos transportadores varía durante la carcinogénesis y posterior progresión del CaP. Se ha reportado que GLUT-1 se sobre expresa en células de CaP avanzado, en donde los niveles más altos coinciden con células andrógeno-independientes (Vaz *et al.*, 2012). La expresión de GLUT-1 también ha sido analizada en modelos *in vitro* de CaP, en donde los mayores niveles de GLUT-1 aparecen en células andrógeno-independientes como DU145 y PC3 con respecto a células andrógeno-dependientes como LNCaP (Effert *et al.*, 2004). Se evaluó la expresión de GLUT-1

y el marcador de proliferación Ki-67 en 140 muestras de CaP clínicamente localizadas en tejido prostático extraído durante prostatectomía radical, encontrando correlación entre los niveles de expresión de PSA y Ki-67, mientras que la correlación entre GLUT-1 y el volumen tumoral o el grado de malignidad tumoral no era significativa (Luczynska, Gasinska y Wilk, 2012). Otro estudio determinó un aumento en los niveles de expresión de GLUT-1 en células de CaP con respecto a tejidos benignos colindante tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares de CaP, pero ensayos de knockdown de GLUT-1 en células 22RV1 y PC3 mostraron resultados dispares; el knockdown de GLUT-1 en PC3 no tuvo efecto alguno en ensayos de migración celular, pero si logró inhibir la glucólisis celular y la proliferación en la línea 22RV1 (Xiao *et al.*, 2018). Estos datos sugieren que el proceso carcinogénico, así como las etapas iniciales del CaP no requieren de la sobreexpresión de GLUT-1 como ocurre con otros tumores, aunque esta característica podría tener un rol en las etapas más avanzadas del CaP.

Por otra parte, al evaluar la aplicabilidad clínica del PET-FDG en CaP, se ha determinado que sus resultados varían en función del desarrollo de la enfermedad, siendo más eficiente en etapas avanzadas (Gonzalez-Menendez *et al.*, 2018) pero con importantes limitaciones en diferenciar el tejido benigno del maligno en etapas iniciales (Bender *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que las células de CaP al comienzo del desarrollo maligno tienen una captación de glucosa indistinta al del tejido benigno colindante, lo que respalda la idea de que GLUT-1 no sea sobreexpresado en la etapa carcinogénica del CaP. Considerando que estadificar y detectar correctamente el CaP mientras aún se encuentra confinada en la glándula prostática es clave para la supervivencia del paciente y que técnicas que dependen de un aumento en captación de glucosa como el FDG-PET no son adecuadas para dar con esta estadificación, es que se hace necesario ampliar la caracterización de la expresión y el

rol de otros GLUTs, así como de otras fuentes de carbono distintas a glucosa que puede entregar una mayor claridad en los mecanismos asociados al proceso carcinogénico en CaP y sus demandas metabólicas.

En el año 2006, nuestro laboratorio reportó la sobreexpresión de GLUT-2 y GLUT-5 en distintos tumores humanos, y además, se demostró que las células de modelos *in vitro* de papiloma de plexo coroideo, de cáncer de mama (ZR-75-1) y de hepatoma (HepG2) podían transportar fructosa eficientemente *in vitro* (Godoy *et al.*, 2006). Desde esa fecha un número importante de trabajos han logrado definir como la metabolización de fructosa puede impactar la biología de otros tumores. Se ha reportado la captación y utilización de fructosa a través de GLUT-5 en líneas celulares de leucemia mieloide aguda, proponiendo que fructosa representa una fuente alternativa de energía en condiciones de privación de glucosa (Chen *et al.*, 2016). También se ha reportado la sobreexpresión de GLUT-5 y de la enzima cetohecoquinasa (KHK; enzima encargada de la fosforilación de fructosa a fructosa-1-P) en especímenes de glioma maligno, sugiriendo además que GLUT-5 podría ser usado como predictor de sobrevivencia (Gao *et al.*, 2018).

1.6. Potencial rol del metabolismo de la fructosa en las células de CaP.

Por miles de años, los humanos han consumido 16 a 24g de fructosa de manera diaria, principalmente desde frutas y miel obtenidas de la actividad agrícola. La modernización y especialización de la industria alimenticia han alterado de manera significativa el valor de este consumo alcanzando en EE. UU. una carga promedio de 80g por día per cápita (Bray, 2007). Una de las principales causas de este aumento esta dado por la incorporación del jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS por sus siglas en ingles), endulzante de bajo costo que ha sido

incorporado a un amplio abanico de alimentos procesados. Un grupo creciente de evidencias indican que el consumo de altos niveles de fructosa, especialmente en la forma de HFCS induce altas concentraciones de fructosa sistémica comparada con el disacárido sacarosa y que fructosa puede promover comorbilidades como síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico y cáncer (Hannou *et al.*, 2018). Aunque no ha sido reportada una concentración basal de fructosa en el cuerpo, Hui *et al.*, (2009) reportaron concentraciones en suero de 1,9 mM en pacientes sanos pero que luego 30 minutos luego de la ingesta de bebidas que contenían HFCS, podía incrementar los niveles de fructosa sérica hasta 17,2mM. Al evaluar los niveles basales de fructosa en pacientes con cáncer pancreático, se reportaron niveles cercanos a 5.7mM.

La fructosa es transportada hacia las células a través de GLUT-5 (K_m 6mM) (Burant *et al.*, 1992)., sin embargo, otras isoformas, tales como GLUT-1, GLUT-2, GLUT-7 y GLUT-9, que tienen una alta homología de secuencia con GLUT-5, también han sido identificadas como isoformas capaces de transportar fructosa, lo que sugiere que las células de cáncer podrían usar fructosa como una fuente de energía alternativa o complementaria a la glucosa (Fig. 1). La metabolización de fructosa a fructosa-1-fosfato (F-1-P) por parte de la enzima KHK y posterior catálisis por aldolasa-B permite la incorporación de metabolitos a la glucólisis como parte de las triosas fosfato. A diferencia de hexoquinasa, KHK no presenta un mecanismo de retroalimentación negativo, por lo que el ingreso de fructosa a la célula solo va a depender de la concentración extracelular y la actividad de los transportadores asociados (GLUT-2 o 5 por ejemplo) (Charrez, Qiao y Hebbard, 2015). Las células de cáncer pancreático usan preferentemente la fructosa por sobre glucosa para alimentar las vías de síntesis de ácidos nucleicos a través de la vía no oxidativa de las pentosas fosfato (PPP) incrementando a su vez la expresión de la enzima transcetolasa (TKL) que permite a estas células producir más ácidos

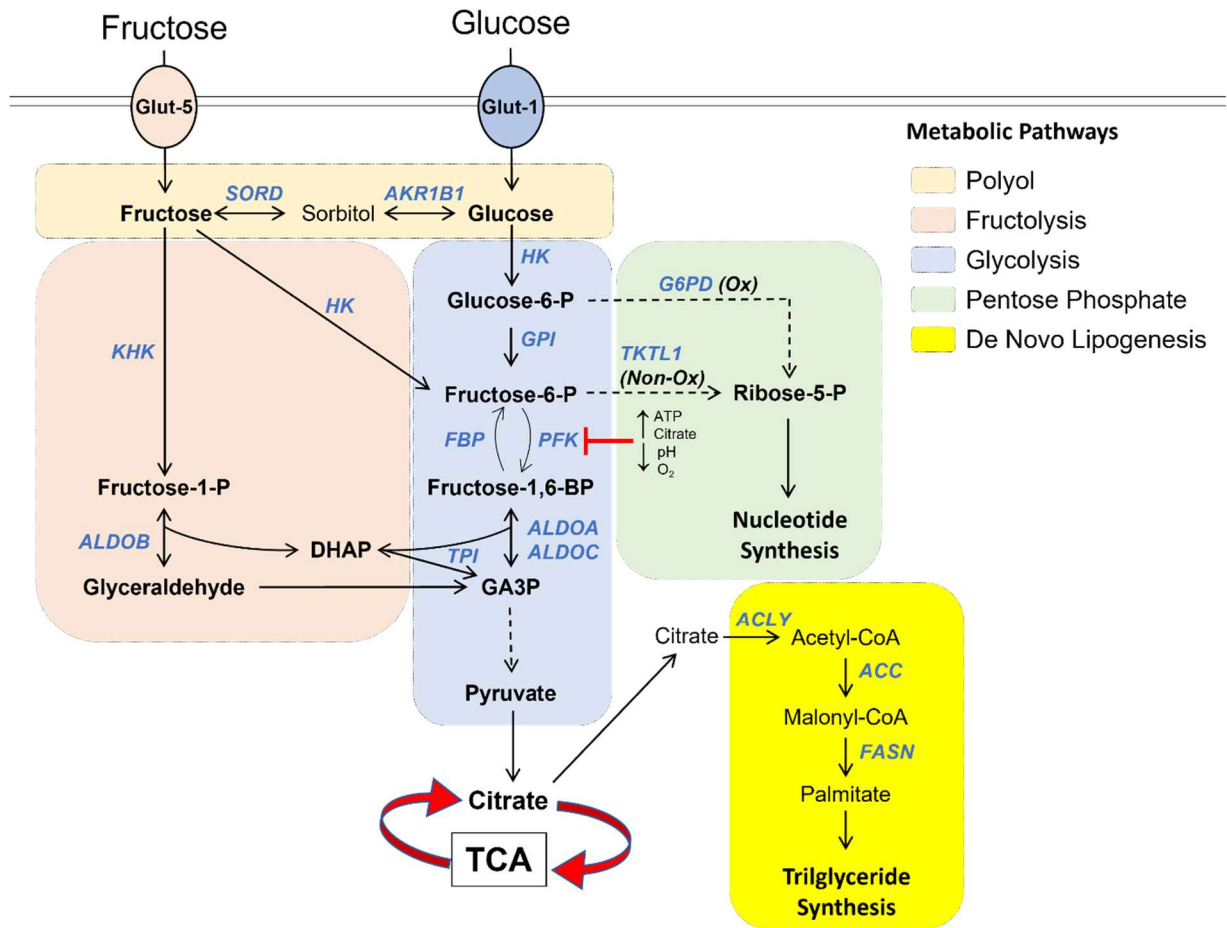


Figura 1. Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y fructosa en células humanas. Tanto glucosa como fructosa son activamente captadas hacia el interior de las células mediante transportadores GLUTs. Glucosa es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato mediante la acción de la enzima hexoquinasa (HK) y continúa la vía glucolítica hasta la generación de piruvato. Fructosa por otro lado es fosforilada por la enzima cetohexoquinasa (KHK) hacia fructosa-1-fosfato (F-1-P) para luego ser metabolizada directamente a dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehído por la enzima aldolasa-B. Gliceraldehído es metabolizado hacia gliceraldehído-3-fosfato (G3P), punto en el cual se une a la glucólisis. KHK no tiene retroalimentación regulada por lo que, y dependiendo solo de la disponibilidad de fructosa y su metabolización a F-1-P, causa una disminución aguda del nivel de ATP además de promover una entrada constante de metabolitos hacia la glucólisis y otras vías de biosíntesis: 1) la vía de las pentosas fosfato (oxidativa, oxPPP; no oxidativa, non-oxPPP) permite la síntesis de ribosa-5-fosfato, molécula clave para la síntesis de nucleótidos; 2) el ciclo de ácidos

tricarboxílicos permite no solo la reducción de NADP y NADPH necesarios para sostener la fosforilación oxidativa, sino que también genera intermediarios metabólicos como el citrato, que pueden ser utilizados en otras vías de biosíntesis, 3) la vía de la lipogénesis de novo (DNL) permite la generación de triglicéridos a partir del palmitato que enzimas como la acetil-carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FASN), que utilizan el citrato generado en el TCA. Este último puede ser utilizado en la producción de energía (ATP) mediante fosforilación oxidativa o metabolizada hacia lactato por la enzima lactato deshidrogenasa para luego ser transportado fuera de la célula. Otras enzimas de interés son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) que modula la actividad de la oxPPP mientras que se ha reportado que la enzima transcetolasa es quien modula la respuesta de la non-oxPPP al metabolizar fructosa.

nucleicos, explicando en parte un aumento en la capacidad proliferativa (Liu *et al.*, 2010). Adicionalmente, múltiples células tumorales como las de glioma o mama, han demostrado que un aumento en la proliferación como en propiedades invasivas cuando son cultivadas con fructosa (Fan *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018). Los mecanismos tras esta potenciación no están bien comprendidos pero estas evidencias sugieren que los niveles de fructosa en suero y/o el metabolismo asociado a los niveles sistémicos de fructosa podrían representar importantes biomarcadores en cáncer.

En resumen, el CaP es uno de los carcinomas más prevalentes en la población masculina de países occidentales y aunque las técnicas de detección del CaP basados en los niveles de PSA sérico, tacto rectal y evaluación histopatológica del tumor han logrado bajar los números de incidencia y aumentar la sobrevida de manera importante desde hace cuatro décadas, en los últimos 10 años los niveles se han mantenido sin mejoras, lo que indica una fuerte necesidad de mejorar los sistemas de detección, estadificación y tratamiento del CaP. Para esto, ahondar en los factores de riesgo menos establecidos como la obesidad y la dieta es clave para poder evaluar tratamientos de manera más óptima y personalizada. Los tratamientos con mayores posibilidades de curación contra el CaP son dependientes de que el carcinoma no se haya propagado a tejidos adyacentes, por lo que detectar nuevos biomarcadores que permitan mejorar los métodos de estadificación y permitan detectar el CaP en etapas tempranas forma un gran campo de investigación biomédica hoy en día. Por otra parte, el estudio del metabolismo tumoral es un área de investigación que aunque iniciado hace casi 100 años por los trabajos de Otto Warburg, ha sido recientemente que ha recibido su apogeo, permitiendo dar con blancos moleculares, dianas farmacológicas, así como extender los conocimientos sobre como las células de cáncer sabotean las vías metabólicas y se aprovechan de los distintos recursos a su

disposición, mejorar su capacidad proliferativa y adaptación a los cambios de ambiente y nutrientes al que se somete durante su evolución. De estos, los cambios que las células de cáncer realizan a la vía glucolítica se encuentran entre los más estudiados, demostrando la gran plasticidad metabólica que les otorga incrementar significativamente la glucólisis para generar un aumento en metabolitos secundarios utilizados en promover vías de biosíntesis y balance redox como la PPP, DNL y el ciclo TCA. Suplir una alta demanda en la capacidad glucolítica requiere de un transporte acorde, y en esto ya se ha descrito que la sobreexpresión de transportadores de glucosa, en específico GLUT-1, es clave para el proceso carcinogénico de un número importante de tumores, encontrando correlaciones positivas entre el nivel de expresión de GLUT-1, el desarrollo de metástasis y menores probabilidades de sobrevivencia de los pacientes afectados. Es este mismo transporte exacerbado lo que da sustento a una de las técnicas de imagen más utilizada en oncología, el PET-Scan, específicamente el que usa el análogo de glucosa [18F]-FDG, permitiendo evaluar el tamaño de tumores primarios y detectar sitios metastásicos. Curiosamente, la aplicabilidad clínica del FDG-PET se ha visto limitada en diferenciar neoplasia de CaP del tejido benigno, al menos en etapas iniciales y considerando las características metabólicas particulares del tejido prostático, es que se vuelve aún más relevante el caracterizar el rol tanto de otros transportadores de glucosa, así como de fuentes alternativa de carbono, distintos a la glucosa, que tengan relevancia en el proceso evolutivo del CaP, desde su carcinogénesis hasta la adquisición de la capacidad de invadir otros tejidos. Tratando de responder esta problemática, nuestro grupo de investigación publicó en el año 2012 un trabajo en donde se analizó la distribución celular de GLUT-1 y GLUT-5 en 76 especímenes de próstata benigna, 10 especímenes con lesiones intraepiteliales de alto grado (HGPIN, un tipo de lesión proliferativa, precursora directa de algunos tipos de carcinoma prostático) y 28 especímenes de

CaP (Reinicke *et al.*, 2012). En este estudio, se determinó mediante análisis inmunohistoquímico que la expresión de GLUT-1 se localizaba preferentemente en las células basales, así como en la membrana basolateral de células epiteliales prostáticas, mientras que GLUT-5 se localizaba en las membranas apicales. Cuando se evaluó la expresión en estos transportadores en las lesiones HGPIN, se reportó la expresión de GLUT-5 en las membranas apicales de estas células mientras GLUT-1 no fue detectado por los estudios inmunohistoquímicos. Por lo tanto, y considerando los antecedentes ya discutidos en este marco teórico, la posibilidad de que tanto las células de próstata como las de CaP utilicen fructosa en vez de glucosa para satisfacer sus demandas metabólicas es suficientemente alta al considerar los estudios ya publicados en torno a la expresión de transportadores específicos de fructosa como el GLUT-5, de las cuales ya se ha demostrado su expresión en tejido benigno y maligno de CaP. Además, la dieta y la obesidad son factores de riesgo para contraer CaP, existe una correlación entre la aparición de enfermedades metabólicas y cáncer causadas por el sobreconsumo de fructosa, y se ha reportado que otros tumores con transporte activo de fructosa como colorrectal y páncreas entre otros, se ven beneficiados al incorporar la fructólisis en su metabolismo, incrementando su capacidad proliferativa. Es entonces que esta tesis busca analizar el efecto biológico que el transporte de fructosa, a través de transportadores como GLUT-5, pueda tener sobre modelos *in vitro* e *in vivo* de CaP, aportando información de como estas células pueden beneficiarse del impacto que pudiera tener el putativo metabolismo de la fructosa en términos de agresividad celular y modulación en la expresión de otros actores moleculares como enzimas y metabolitos asociados a la glucólisis.

2. Hipótesis

Esta tesis propone que **las células de cáncer prostático captan fructosa intrínsecamente y que dicho transporte incrementa características celulares asociadas tanto a capacidades de proliferación como de agresividad tumoral con respecto a glucosa.**

3. Objetivos Específicos

- 1) Evaluar la capacidad de distintos modelos *in vitro* de cáncer prostático de captar fructosa en el medio de cultivo y analizar si esta captación puede incidir sobre parámetros de viabilidad celular y de agresividad tumoral en comparación a glucosa.
- 2) Determinar el efecto que tiene la adición de fructosa en la dieta sobre parámetros de la agresividad y progresión tumoral en modelos *in vivo* de cáncer prostático.
- 3) Analizar el efecto *in vitro* de la metabolización de fructosa sobre parámetros de actividad metabólica y sobre los niveles de expresión de las principales enzimas glucolíticas, de la vía de las Pentosas Fosfato y Lipogénesis *de novo* en modelos celulares de cáncer prostático humano.

4. Resultados

4.1. Objetivos 1 y 2.

1. Evaluar la capacidad de distintos modelos *in vitro* de cáncer prostático de captar fructosa en el medio de cultivo y analizar si esta captación puede incidir sobre parámetros de viabilidad celular y de agresividad tumoral en comparación a glucosa.

2. Determinar el efecto que tiene la adición de fructosa en la dieta sobre parámetros de la agresividad y progresión tumoral en modelos *in vivo* de cáncer prostático.

- **Racional:**

Dado que hasta la fecha de la aprobación del correspondiente proyecto de Tesis (2016) no existían trabajos que hayan evaluado el rol biológico de la fructosa en las células de CaP, y basándonos en los antecedentes aportados en el marco teórico que:

- 1) Sugieren que la metabolización de fructosa puede influir en características asociadas a proliferación celular en tumores de CaP de manera similar a aquellos que expresan transportadores como GLUT-5 como glioma, páncreas, o colon,
- 2) Hemos reportado la expresión de transportadores de fructosa en el tejido prostático benigno, en lesiones HGPIN, pero también en células de CaP que sugieren un rol del metabolismo de fructosa en la homeostasis de estas células.

Decidimos unificar los antecedentes respecto a este tema en un trabajo de revisión que resume los efectos biológicos del excesivo consumo fructosa en células humanas, su posible impacto en el transporte y metabolismo glucolítico en células de cáncer y como las células de CaP

podrían beneficiarse de su metabolización, además de presentar un resultado preliminar que demuestra la expresión de GLUT-5 en células de cáncer prostático (Carreño *et al.*, 2019)¹.

Por otra parte, los resultados obtenidos al evaluar los objetivos específicos 1 y 2 de esta tesis, específicamente aquellos obtenidos al evaluar el efecto biológico de la fructosa tanto en líneas celulares de CaP, así como en 2 modelos xenoinjerto fueron presentados como parte de la Publicación 2 (Carreño *et al.*, 2021)².

¹ Daniela Carreño y Néstor Corro contribuyeron equitativamente a este trabajo, compartiendo coautoría correspondiente.

² Daniela Carreño, Néstor Corro y Javier Cerda-Infante contribuyeron equitativamente a este trabajo, compartiendo coautoría correspondiente.

4.1.1. **Publicación 1: Fructose and Prostate Cancer: Towards an Integrated View of Cancer Cell Metabolism**

Daniela Carreño^{1‡}, Néstor Corro^{1‡}, Verónica Torres-Estay¹, Loreto P. Véliz¹, Rodrigo Jaimovich², Pedro Cisternas³, Ignacio F. San Francisco⁴, Paula C. Sotomayor⁵, Marina Tanasova⁶, Nibaldo C. Inestrosa³ and Alejandro S. Godoy^{1,7}

Departments of Physiology¹, Urology⁴, and Centro de Envejecimiento y Regeneración (CARE) from the Department of Cell Biology³, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; Department of Nuclear Medicine², Clínica Las Condes, Santiago, Chile; Center for Integrative Medicine and Innovative Science⁵, Faculty of Medicine, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile; Department of Chemistry⁶, Michigan Technological University, Houghton, Michigan 49931; and Department of Urology⁷, Roswell Park Comprehensive Cancer Center, Buffalo, New York 14263.

‡These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to: Alejandro S. Godoy, Ph.D. Assistant Professor, Department of Physiology, Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Casilla 114-D, Santiago de Chile. Phone: (056) 02-3541957. E-mail: agodoy@bio.puc.cl; Adjunct Assistant Professor of Oncology, Department of Urology, Roswell Park Comprehensive Cancer Center, Elm & Carlton Streets, Buffalo, NY 14263.

Abstract

Activation of glucose transporter-1 (Glut-1) gene expression is a molecular feature of cancer cells that increases glucose uptake and metabolism. Increased glucose uptake is the basis for the clinical localization of primary tumors using positron emission tomography (PET) and 2- deoxy-2-[18F]-fluoro-D-glucose (FDG) as a radiotracer. However, previous studies have demonstrated that a considerable number of cancers, which include prostate cancer (CaP), express low to undetectable levels of Glut-1 and that FDG-PET has limited clinical applicability in CaP. This observation could be explained by a low metabolic activity of CaP cells that may be overcome using different hexoses, such as fructose, as the preferred energy source. However, these hypotheses have not been examined critically in CaP. This review article summarizes what is currently known about transport and metabolism of hexoses, and more specifically fructose, in CaP and provides experimental evidence indicating that CaP cells may have increased capacity to transport and metabolize fructose in-vitro and in-vivo. Moreover, this review highlights recent findings that allow better understanding of how metabolism of fructose may regulate cancer cell proliferation and how fructose uptake and metabolism, through the De Novo Lipogenesis pathway, may provide new opportunities for CaP early diagnosis, staging and treatment.

Keywords: Fructose, cancer, metabolism, glucose transporters, biomarkers.

Introduction

The study of tumor metabolism dates from the middle of the 20th century, with the first observations generated by Otto Warburg, who characterized the preferential anabolic metabolism of glucose to pyruvate, and then to lactate, even in the presence of normal oxygen concentrations(1). Since then, the role of energy metabolism in cancer is widely recognized in the literature as a key aspect in various events of cancer biology such as carcinogenesis and metastasis. A good part of the research in this field is focused on the study of metabolism and tumor aggressiveness, its relationship with the metabolic state of the patient, and how this interaction can be used to generate new molecular targets and better treatments. The majority of these studies are based on characteristics such as the increase in glucose uptake (mediated through the glucose transporter-1 or Glut-1) or the effect of hypoxia in anaerobic metabolism, however, little is known about the contribution of other transporters of the Glut family, as well as the impact of other hexoses present in the diet, in the biology of cancer.

Hexoses are naturally occurring sweeteners; the most common hexoses in the human diet are glucose, fructose, and galactose. For thousands of years, humans consumed about 16-24 grams of fructose each day, mainly in fruits and honey obtained from foraging and agricultural activity. Recent modernization and specialization in agricultural and food processing methods have increased fructose consumption patterns; today, fructose consumption per day in the United States averages ~80 grams(2-4). Most of the increase in consumption is from processed fructose in the form of high fructose corn syrup(5). Recent studies suggest a direct relationship between the increase in fructose consumption and the increase in incidence of obesity and type-2-diabetes(6-8). Consistent with this hypothesis, a considerable amount of

basic science data suggests that fructose serves as a major source of energy for several human cell types, which include erythrocytes, myocytes, spermatozooids and adipocytes(9-12).

A few studies in the area to establish a relationship between fructose consumption and the incidence of prostate cancer. In 1998, a prospective study in 47,781 patients provided indirect evidence that increased fruit consumption and avoidance of high calcium intake reduce the risk of advanced CaP(14). A more recent study, however, found that the consumption of high levels of fruit juice increases the risk of prostate cancer by 58%(15). Taken together, both studies suggest us that the amount of fructose present in the diet is critical when establishing an effect on risk of CaP, given that the amount of fructose ingested in fruits is lower than that found in fruit juices or sugary beverages. Other studies that have analyzed the possible effect of fructose consumption in other types of cancer support this idea. A systematic analysis in 37 cohort studies between 1990 and 2017 evaluated associations between dietary sugar, lifestyle and cancer risk(16). Of 14 reports in fructose, 8 reported null association, 2 suggested a protective effect, while in 4 studies a prejudicial association was reported. Although a good part of those studies reported a null association, the ones that analyzed the consumption of foods with added sugar and sweetened drinks demonstrated a detrimental association with the risk of cancer.

These observations support the hypothesis that the type of sugar consumed may be just as important as the amount consumed. Limiting the intake of dietary factors that accelerate cancer cell proliferation could decrease the incidence and increase the window of opportunity to treat effectively some cancers. This review examines the role of fructose uptake and metabolism in cancer, with special emphasis on prostate cancer, and how fructose uptake and

metabolism integrate with glycolytic and alternative metabolic pathways, like de novo lipogenesis and pentose phosphate, to impact CaP aggressiveness and progression.

Facilitative hexose transporter family

Facilitative sugar transporters, Gluts, move sugars (including glucose, fructose, and other hexoses) across the plasma membrane, without energy consumption and in favor of a gradient concentration. Fourteen members of Gluts have been identified and grouped in three classes based on their structural and sequence similarity (Table 1)(17). However, despite these similarities, Gluts, even within the same class, display different capabilities to transport distinct sugars and they are differently regulated and distributed among human tissues (Table 1)(18). In particular, Glut tissue-specific expression may play important roles in the regulation of hexose uptake and metabolism, under distinct nutritional and hormonal conditions(18).

Class-I facilitative hexose transporters: Includes Glut-1, Glut-2, Glut-3, Glut-4 and Glut-14(19). Glut-1 is the most ubiquitous member of the family and transports primarily glucose, although it can also move galactose, mannose, and glucosamine with certain efficiency(20). Glut-2 is primarily a glucose transporter (although it displays the highest affinity for glucosamine) that shows low affinity for fructose, galactose and mannose(21). Glut-3 transports glucose with very high affinity, although it also transports galactose, mannose, maltose, or xylose, but is unable to transport fructose(18). Glut-4 is a high-affinity glucose transporter that translocate from intracellular reservoir to the plasma membrane in response to insulin(22). Glut-14 is the most recently discovered member of the class-I isoforms that shows a 95% sequence identity to Glut- 3 and is able to transport glucose(23).

Class-II facilitative hexose transporters: Includes Glut-5, Glut-7, Glut-9 and Glut-11(19). Glut-5 in humans is only capable to transport fructose, with no ability to transport glucose or

galactose(24). Glut-7 can move both glucose and fructose with the highest affinity among Glut transporters(12), whereas it is unable to transport galactose, xylose or 2-deoxyglucose. Glut-9 seems to be both a fructose and a uric acid transporter(25-27). Glut-11 transports glucose and fructose, but not galactose(17).

Class-III facilitative hexose transporters: Includes Glut-6, Glut-8, Glut-10, Glut-12 and the H(+)- myo-inositol transporter (HMIT)(19). Glut-6 represents a low-affinity glucose transporter. Glut-8 transports glucose with high affinity, and this transport activity is inhibited by fructose and galactose. Glut-10 transports glucose, galactose and deoxyglucose. Glut-12, a glucose and fructose transporters(28) was identified first in MCF-7 breast cancer cells by sequence homology with the insulin-stimulated Glut-4 gene, although its protein sequence displays more similarity with Glut-10(29). HMIT is a specific transporter for myoinositol, and its activity is stimulated by decreased extracellular pH(17).

Among all of Glut isoforms, Glut-2 and Glut-5 were reported originally as the only proteins capable of mediating fructose transport in human cells(10, 30), with Glut-5 being a pure fructose transporter(11, 31). However, more recently, Glut-7, Glut-9, Glut-11 and Glut-12 have been proposed to be fructose transporters based on their high sequence homology with Glut-5 (36-40% identity)(12, 25, 32) and functional characterization using *in vitro* models(28, 33).

Hexose transporter expression in prostate cancer

The elevated level of glucose uptake and metabolism in cancers is the basis for the clinical localization of primary cancers and sites of metastasis using positron emission tomography (PET scanning) and the enhanced cellular uptake of [18F]-FDG (2-deoxy-2-[18F]-fluoro-D-glucose)(34-36). FDG-PET imaging has shown limited clinical applicability in CaP(37,38). This striking difference between CaP and other cancers suggests: 1) a low

metabolic activity for CaP(39); or 2) CaP utilizes hexoses other than glucose, such as fructose, as the energy source to fuel their metabolic requirements(13, 40). However, none of these hypotheses have been critically examined in CaP.

Even though a large number of immunohistochemical studies documented high levels of expression of Glut-1(40-42) in several human neoplasms, in most of these studies it was also shown that a considerable proportion of the human neoplasms expressed low to undetectable levels of Glut-1(40, 42, 43). Moreover, within the types of neoplasms that showed high levels of expression of Glut-1, it was also observed that subgroups of these neoplasms showed low or undetectable levels of this isoform(40, 42). This evidence indicate that glut-1 over-expression does not correspond to a prerequisite of the malignant phenotype. Moreover, this evidence suggest that other hexose transporter isoforms might be expressed in these cancers that lack expression of Glut-1. In support of this hypothesis, our laboratory(40) reported over-expression, in several types of cancers, of Glut-2 and Glut-5, both fructose transporters. In addition, we demonstrated that human choroid plexus papilloma, breast cancer (ZR-75-1), and hepatoma (HepG2) cell lines transported fructose efficiently *in vitro*.

Expression and functionality of Gluts have not been characterized in detail in clinical specimens of CaP. Effert *et al.*(44) and Steward *et al.*(45) analyzed expression of Glut-1 in 45 and 67 clinical specimens of benign hyperplasia and CaP, respectively. However, analysis of the expression of Glut-1 was performed only at the mRNA level. At the protein level, Chandler *et al.*(43) analyzed the immunohistochemical expression of Glut-1 and Glut-12 in 3 clinical specimens of CaP; the 3 specimens immunostained positively for Glut-12, and 1 specimen was positive weakly for Glut-1. In addition, Carvalho *et al.*(42) analyzed the expression pattern of Glut-1 in 195 clinical specimens of malignant prostate tumors using immunohistochemistry. In

this study, only 47% (92 cases) of the specimens showed positive immunoreaction and 53% (103 cases) were negative for Glut-1. Moreover, among the positive cases, the immunostaining for Glut-1 showed a cytoplasmic localization with varying intensities (the authors did not describe the intensity levels or the sample size of each intensity level). Although interesting, these analyses are limited and inconclusive in terms of defining the molecular mechanisms (transport system/s) involved in the full spectrum of hexose uptake, and more specifically fructose uptake, in benign and malignant prostate tissue. In accordance with the previous studies(42, 43), an immunohistochemical study reported by our group(46) indicated that Glut-1 protein was detected poorly in benign prostate tissue and was low to undetectable in CaP, which could explain, at least in part, the deficiency of FDG-PET scanning for imaging CaP. In this report(46), preliminary RT-PCR analyses showed that Glut-7, Glut-9 and Glut-11 mRNAs were detected in non-tumor and malignant prostate tissue, and that Glut-11 mRNA, a potential fructose transporter, was over-expressed consistently in malignant human prostate tissue compared to non-tumor. Further immunostaining analyses (Fig. 1) have validated our previous results and supported the hypothesis that CaP represents a fructose-dependent (Fig. 1D-F), rather than a glucose-dependent (Fig. 1A-C), human malignancy, and that fructose might play a key role to fuel CaP metabolism and growth.

Several important questions related to fructose uptake during CaP carcinogenesis and progression remain open and are the focus of our investigation. For example, do carcinogenesis and/or progression of clinical CaP involve an increase in the ability of malignant prostate epithelial cells to uptake fructose? Does fructose uptake play a role in the biology of CaP epithelial cells? If so, which Glut isoform(s) are involved in these processes? Future studies from our laboratory and others will unravel these, and probably other, interesting questions and

provide mechanistic explanations to understand the role of hexoses, and specifically fructose, uptake in CaP.

Biological role of fructose in cancer - projections to prostate cancer

Fructose consumed in the diet is transported into the enterocyte through a facilitative transport mechanism mediated by Glut-5(47, 48). Once inside the enterocyte, fructose diffuses into blood vessels through a facilitative transport mechanism mediated by Glut-2(49). Fructose present in portal blood is transported rapidly and efficiently into hepatocytes through a transport mechanism mediated by Glut-2. Once inside hepatocytes, fructose is robustly phosphorylated to fructose-1-phosphate (F-1-P) by fructokinase (KHK), and subsequently split by aldolase into glyceraldehyde and dihydroxyacetone phosphate at a much slower rate, which traps of inorganic phosphate in the form F-1-P (Fig. 2). The conversion of fructose into triose phosphate occurs independently of any type of negative feedback as insulin, ATP depletion or citrate. This metabolic conversion leads to 1) a high consumption rate of hepatic ATP for the initial phosphorylation of fructose, which can lead, when fructose intake is high, to transient ATP depletion, formation of AMP and degradation of adenosine to uric acid; 2) an overflow of triose-phosphates, which are secondarily converted into lactate or glucose to be released into the circulation; 3) stimulation of glycogen synthesis; and 4) stimulation of synthesis of fatty acids from the carbons of fructose, through a metabolic pathway known as De Novo Lipogenesis (DNL) (Fig. 2).

The generally accepted concepts that fructose is cleared rapidly, and almost completely, by the liver(50), and that fructose does not represent an important energy source for peripheral tissues, has been challenged over the last five years by evidence indicating that consumption of high levels of fructose, especially in the form of High-Fructose Corn Syrup (HFCS), induces

greater systemic concentrations of fructose than sucrose(51). Hui *et al.*(52) demonstrated that healthy subjects exposed to an oral refined carbohydrate load, exhibited higher levels for longer of fructose than to glucose. Moreover, these authors demonstrated that the fasting serum fructose level was higher in patients with pancreatic cancer than those without pancreatic cancer. The elevated consumption of fructose has been associated with numerous diseases and syndromes, most notably metabolic syndrome that includes hypertension, obesity, diabetes, hyperinsulinemia, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)(53) and fructose malabsorption(54), gout(55), breast cancer(56), pancreatic cancer(13) and renal disease(57). However, the direct effect of fructose on most of the fructose-associated diseases, as well as the fructose-mediated molecular mechanisms involved in these effects, remain unclear. The first evidence that indicated that prolonged fructose consumption may contribute to the development of metabolic syndrome was determined in overweight or obese adults, in which consumption of fructose-sweetened, but not glucose-sweetened, beverages increased DNL, promoted dyslipidemia, decreased insulin sensitivity, and increased visceral adiposity(58). Consumption of fructose at 25% of energy requirements for 10 weeks, compared with isocaloric consumption of glucose, contributed to the development of components of the metabolic syndrome, by increasing circulating uric acid and gamma-glutamyl transferase activity(59).

In addition to higher fat intake(60), a large increase in refined carbohydrate intake has been hypothesized to be a risk factor for several human cancers(61), which include ovarian(62), pancreatic(63), endometrial(64), breast(65) and gallbladder(66) cancer. Even though glucose has an established role in cancer cell proliferation(67), little is known about how tumor cells uptake and utilize fructose, and whether or not, fructose can potentiate cancer cell proliferation. Several epidemiological studies have highlighted a positive correlation between fructose intake

and cancer(68, 69). The correlation is reinforced by reports that Glut-5 expression(40) and blood fructose concentration(52) are increased in various types of cancers and in cancer patients, respectively. Recent *in vitro* studies have provided evidence for a direct effect of fructose and Glut-5 on tumor growth. In cultured breast cancer cells, fructose modified glycan structures of the tumor cells and increased their proliferative and invasive properties when compared to glucose(56). Moreover, suppression of Glut-5 expression with antisense oligonucleotides in breast cancer inhibited tumor cell proliferation(70). More recently, metabolomic analyses of pancreatic cancer cells indicated that fructose was used preferentially for nucleic acid synthesis via the non-oxidative pentose phosphate pathway (PPP) to provide five-carbon pentose for RNA synthesis(13). In this study fructose promoted expression of the transketolase enzyme, an activity that enables a more rapid metabolism of glucose and fructose through the non-oxidative PPP(13) (Fig. 2), which allows pancreatic cancer cells to generate more rapidly nucleic acids and proliferate more efficiently.

The ability of CaP cells to metabolize fructose has not been studied. Moreover, the expression and cellular distribution of GLUTs has been characterized poorly, and results are limited and inconclusive as to defining a molecular mechanism involved in hexose and, more specifically, fructose uptake. However, several pieces of evidence suggest that hexoses other than glucose, such as fructose, may play a key role in CaP biology. The limited clinical applicability showed by FDG-PET, which is only partially useful in late stages of the disease(38), implies limited absorption of glucose by CaP cells(46). Previous *in vitro* analyses(39) indicated that LNCaP cells exhibit cell growth and proliferation levels that are similar when glucose levels are normal or low, but proliferation of DU145 cells was significantly inhibited at low levels of glucose concentration, which indicated that high levels

of glucose consumption are required for rapid, highly proliferative, but not for slow proliferative CaP cells. On the contrary, Gluts expression analyses(46) (Fig. 1) in malignant human prostate tissues indicate a low level of expression of Glut-1, and higher levels of expression of Glut-5. This evidence suggests that fructose, and not glucose, may play a key role in CaP cell metabolism and that further studies in this field could validate Glut-5 and probably other fructose metabolizing enzymes as possible new drug targets/biomarkers to inhibit/detect aggressive CaP. This evidence also suggests that 6-[18F] fluoro-6-deoxy-D-fructose may represent a more efficient radiotracer for positron emission tomography imaging in CaP(71).

De novo lipogenesis: A putative pathway for fructose metabolism in CaP.

Several studies(72-75) have indicated that key elements of the DNL, such as the fatty acid synthase (FASN) or the sterol regulatory element-binding protein (SREBP), are upregulated in a variety of tumor types, which include CaP. The upregulation of FASN in the prostate occurs during the earliest stages of neoplastic transformation (PIN lesions) and in nearly all invasive CaP adenocarcinomas(76). Lipids contribute in different ways to CaP metabolism, either by increasing availability of membrane precursors, energy storage, a steroid hormone synthesis or they can be oxidized for energy production. Lipid metabolism has been studied previously(77) demonstrating that CaP cells exhibit a lipogenic profile regulated through the activity of the androgen receptor (AR)(77). Heemers *et al.*,(78) reported that androgens stimulate the expression of FASN, through activation of the SRBEP pathway. These authors(79) subsequently demonstrated that androgens increased the expression of lipogenic genes in CaP cell lines and mice prostatic tissue, but the degree of the effects depended on the tissue and the enzyme studied. Dasgupta *et al.*(80) reported that the steroid receptor co-activator 2 (SRC-2), one of the main activators of SREBP, promoted activation of glutamine-dependent DNL in an

AR-independent manner, which accelerated tumor growth and metastasis and decreased survival in CaP mouse models. In addition, inhibition of SRC-2 attenuated the proliferative effect(80). These data demonstrated that DNL is a preferential metabolic pathway activated by CaP cells, and that this activation may have an important impact on the ability of CaP cells to recur during androgen deprivation therapy. However, the precise mechanisms associated with this activation in castration-recurrent CaP cells are not well understood.

Little is known about the biological role that fructose may play on lipid metabolism in benign or malignant prostate cells, but studies in other cellular models indicate that DNL can be promoted by fructose. For example, fructose has been shown to up-regulate FASN and glycerol-3-phosphate acyltransferase expression in adipocytes(81). Fructose has been shown to promote the conversion of pyruvate to acetyl-CoA by an increase in pyruvate dehydrogenase and a decrease in pyruvate kinase activities in fructose-fed rats(82). Moreover, fructose was shown to increase the activity of the sterol regulatory element binding protein 1c, SREBP1, a core transcription factor of enzymes involved in DNL(83).

The role of fructose consumption in the development of non-alcoholic fatty acid disease (NAFLD) is a well-documented example mechanism of how dietary fructose can influence gene expression, metabolic reprogramming and disease development in liver. The consumption of fructose-, but not glucose-, sweetened drinks has been associated with increased visceral adiposity, insulin resistance and increased hepatic DNL(59, 84, 85). Previous studies in wild type mice fed high fructose diet (HFD) or high sucrose diet increased the incidence of NAFLD compared to control animals. This effect was prevented when KHK was knocked-out, which suggests a key role for fructose metabolism in NAFLD development(86). Fructose has shown to increase the level of expression of the DNL enzymes, acetyl-CoA carboxylase (ACC1), FAS

and stearoyl-CoA desaturase (SCD1) in mice fed chow or HFD, supplemented with 30% fructose in the drinking water(87). Taken together, these data support a direct effect of consumed fructose in the promotion of DNL in hepatic tissue. Although a potential effect of fructose has not been established in benign or CaP tissue yet, these data suggest that activation and promotion by fructose uptake in the DNL pathway could be a key step in tumor initiation, growth, progression and/or therapy-resistance in CaP.

Conclusions and projections to the clinic

This review article presented previous published and experimental data to suggest a crucial role for fructose in the biology of CaP. As it has been established in this review article, there is a large gap in terms of defining the role of fructose in the biology of cancer, including CaP. Therefore, it is increasingly evident that defining the molecular nature of the fructose transport, how this sugar is metabolized by cancer cells, and the impact of these processes in the biology of CaP represents innovative/provocative questions in the field. Certainly, identifying and functionally characterizing the specific fructose transporter/s and the way fructose is metabolized in benign and malignant human prostate epithelial cells could support the concept that the type of sugar consumed may be just as important as the amount consumed, and that limiting the dietary factors that can accelerate prostate cancer cell proliferation can provide vital time for treating these tumors. Both concepts have begun to be explored in other types of neoplasms such as breast and pancreatic cancer.

The utility of fructose transport/metabolism in the clinical setting could be assessed in at least three different aspects: 1) As a biomarker: Understanding the molecular mechanisms that govern fructose uptake and metabolism in prostate cells/tissues could provide the opportunity to discover new biomarkers with the potential to predict clinical significance in all

stages of CaP. The current tendency in the treatment of CaP patients increases the need for reliable biomarkers that help in the clinical decision-making process, especially biomarkers that could help in the refinement of the selection criteria for potential active surveillance in patients with low-risk CaP as well as in predicting advanced CaP. Fructose transport/metabolism may be higher in CaP with high Gleason score (>7), and possible even higher in metastatic disease, which could be used to differentiate between truly localized CaP versus potential metastatic disease. This could provide a useful tool to define the need for standard therapy for high-risk disease or eventually the use of a more aggressive treatment, such as abiraterone, enzalutamide or chemotherapy for a man with “localized” high risk CaP. 2) As a tracer for imaging related staging and recurrence of prostate cancer: The study of fructose uptake and metabolism could provide the molecular basis to support the use of fructose derivatives as more efficient radiotracers for imaging primary or metastatic CaP, which could improve CaP staging and monitoring of treatments. The methodology of PET using ^{18}F -FDG has been used successfully for this purpose in a large variety of tumors, however, it has not proven to be sensitive enough in CaP, probably because prostate tumors use fructose instead of glucose to maintain their metabolism. Currently, there are new tracers for the PET technique that address different molecular mechanisms to label tumor epithelial cells. One of those ways is focused on the metabolism of essential amino acids such as choline, which can be labeled with carbon-11 or with fluorine-18. Even though these tracers have been used clinically in CaP, their utility has been limited to the evaluation of tumors of high risk and the determination of recurrence against the elevation of PSA. Recently, other forms of labeling CaP cells have appeared; one is through the use of a ligand for a prostate-specific antigen of the plasma membrane of tumor epithelial cells, known as PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen). Although this PET-PSMA

technique is currently one of the most utilized because of its high sensitivity and specificity for detecting metastatic and recurrent disease, especially in men with PSA above 0.5 ng/ml, there is a percentage of CaPs that do not express PSMA. Therefore, it could be of special interest to investigate whether or not using fructose as radiotracer may improve accuracy of PET imaging in this special situation. The great variety of PET imaging techniques in use (and others currently under development), in conjunction with traditional imaging techniques, such as nuclear magnetic resonance and computed axial tomography, does nothing but confirm the critical situation that there is not a single technique with sufficiently good performance to achieve adequate staging in patients with CaP. Further studies in this field could provide the molecular basis to support the use of fructose derivatives as more efficient radiotracer for imaging primary prostate cancer and/or metastases, which could beneficially impact early detection, staging, and monitoring of treatments. 3) As a therapeutic target candidate: Fructose transporters are very attractive therapeutic target candidates due to their localization at the level of the plasma membrane of the human cells, which makes pharmacological inhibition of these molecules more feasible. In the same sense, interdiction of fructose transport could represent a more attractive therapeutic strategy than the interdiction of glucose transport, for inhibition of cell/tumor growth/spread of CaP. This is especially true when considering that the expression of fructose transporters (i.e., Glut-5) is not as ubiquitous as the expression of the glucose transporters (i.e., Glut-1) and is confined to a few organs in the human body.

In summary, further studies on this field will forward prostate cancer research in that it will provide basic and preclinical information to support a unique biological role for fructose uptake/metabolism in prostate cancer initiation and progression, and more importantly, these studies could help to potentiate therapeutic strategies/imaging modalities currently in use.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Dr. James L. Mohler's critical review and editing. This review article was supported by the Department of Defense (W81XWH-12-1-0341) and FONDECYT (1161115) grants to A.G., Basal Center of Excellence in Aging and Regeneration (CONICYT-PFB 12/2007) and FONDECYT (1160724) grants to N.C.I., FONDECYT (11140255) and Interno Regular UNAB (DI-37-17/RG) grant to P.S., FONDECYT (11160651) grant to P.C., FONDECYT Post-Doctoral Fellowship (3160717) to D.C., and CONICYT Ph.D. Fellowship to 10 VTE (22140138) and NCA (21171084).

References

1. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
2. Bray GA. How bad is fructose? *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(4):895-6.
3. Gaby AR. Adverse effects of dietary fructose. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2005;10(4):294-306.
4. Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2006;9(4):469-75.
5. Gross LS, Li L, Ford ES, Liu S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):774-9.
6. Bizeau ME, Pagliassotti MJ. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism: clinical and experimental*. 2005;54(9):1189-201.
7. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition reviews*. 2005;63(5):133-57.
8. Montonen J, Jarvinen R, Knekt P, Heliovaara M, Reunanen A. Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. *The Journal of nutrition*. 2007;137(6):1447-54.
9. Darakhshan F, Kristiansen S, Richter E, Hundal HS. GLUT5 and fructose transport in human skeletal muscle. *Biochemical Society transactions*. 1997;25(3):473S.
10. Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, et al. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(15):5434-8.
11. Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, et al. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(22):13276-82.

12. Li Q, Manolescu A, Ritzel M, Yao S, Slugoski M, Young JD, et al. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;287(1): G236-42.
13. Liu H, Huang D, McArthur DL, Boros LG, Nissen N, Heaney AP. Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer research*. 2010;70(15):6368-76.
14. Giovannucci E, Rimm EB, Wolk A, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium and fructose intake in relation to risk of prostate cancer. *Cancer research*. 1998;58(3):442-7.
15. Makarem N, Bandera EV, Lin Y, Jacques PF, Hayes RB, Parekh N. Consumption of Sugars, Sugary Foods, and Sugary Beverages in Relation to Adiposity-Related Cancer Risk in the Framingham Offspring Cohort (1991-2013). *Cancer Prev Res (Phila)*. 2018;11(6):347-58.
16. Makarem N, Bandera EV, Nicholson JM, Parekh N. Consumption of Sugars, Sugary Foods, and Sugary Beverages in Relation to Cancer Risk: A Systematic Review of Longitudinal Studies. *Annu Rev Nutr*. 2018.
17. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985;229(4717):941-5.
18. Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *International journal of endocrinology*. 2010;2010.
19. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis, and treatment. *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(2):124-39.
20. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):121-38.
21. Garcia M, Millan C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, et al. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(3):709-24.
22. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*. 1988;333(6169):183-5.

23. Wu X, Freeze HH. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*. 2002;80(6):553-7.
24. Hundal HS, Darakhshan F, Kristiansen S, Blakemore SJ, Richter EA. GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Advances in experimental medicine and biology*. 1998;441:35-45.
25. Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(16):16229-36.
26. Bibert S, Hess SK, Firsov D, Thorens B, Geering K, Horisberger JD, et al. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;297(3):F612-9.
27. Witkowska K, Smith KM, Yao SY, Ng AM, O'Neill D, Karpinski E, et al. Human SLC2A9a and SLC2A9b isoforms mediate electrogenic transport of urate with different characteristics in the presence of hexoses. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;303(4): F527-39.
28. Pujol-Gimenez J, Perez A, Reyes AM, Loo DD, Lostao MP. Functional characterization of the human facilitative glucose transporter 12 (GLUT12) by electrophysiological methods. *American journal of physiology Cell physiology*. 2015;308(12):C1008-22.
29. Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, et al. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;282(3): E733-8.
30. Watanabe T, Nagamatsu S, Matsushima S, Kondo K, Motobu H, Hirosawa K, et al. Developmental expression of GLUT2 in the rat retina. *Cell and tissue research*. 1999;298(2):217-23.
31. Concha, II, Velasquez FV, Martinez JM, Angulo C, Droppelmann A, Reyes AM, et al. Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood*. 1997;89(11):4190-5.
32. Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, Cheeseman CI, Bell A, Zahn C, et al. Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function,

expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Molecular membrane biology*. 2005;22(4):339-51.

33. Nualart F, Los Angeles Garcia M, Medina RA, Owen GI. Glucose Transporters in Sex Steroid Hormone Related Cancer. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009.

34. Nieweg OE, Kim EE, Wong WH, Broussard WF, Singletary SE, Hortobagyi GN, et al. Positron emission tomography with fluorine-18-deoxyglucose in the detection and staging of breast cancer. *Cancer*. 1993;71(12):3920-5.

35. Tse NY, Hoh CK, Hawkins RA, Zinner MJ, Dahlbom M, Choi Y, et al. The application of positron emission tomographic imaging with fluorodeoxyglucose to the evaluation of breast disease. *Annals of surgery*. 1992;216(1):27-34.

36. Wahl RL, Zasadny K, Helvie M, Hutchins GD, Weber B, Cody R. Metabolic monitoring of breast cancer chemohormonotherapy using positron emission tomography: initial evaluation. *J Clin Oncol*. 1993;11(11):2101-11.

37. Bender H, Schomburg A, Albers P, Ruhlmann J, Biersack HJ. Possible role of FDG-PET in the evaluation of urologic malignancies. *Anticancer research*. 1997;17(3B):1655-60.

38. Salminen E, Hogg A, Binns D, Frydenberg M, Hicks R. Investigations with FDG-PET Scanning in prostate cancer show limited value for clinical practice. *Acta oncologica*. 2002;41(5):425-9.

39. Singh G, Lakkis CL, Laucirica R, Epner DE. Regulation of prostate cancer cell division by glucose. *Journal of cellular physiology*. 1999;180(3):431-8.

40. Godoy A, Ulloa V, Rodriguez F, Reinicke K, Yanez AJ, Garcia Mde L, et al. 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*. 2006;207(3):614-27.

41. Younes M, Lechago LV, Lechago J. Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases. *Clin Cancer Res*. 1996;2(7):1151-4.

42. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaiba MM, Begnami MD, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(6):965-72.

43. Chandler JD, Williams ED, Slavin JL, Best JD, Rogers S. Expression and localization of GLUT1 and GLUT12 in prostate carcinoma. *Cancer*. 2003;97(8):2035-42.
44. Effert P, Beniers AJ, Tamimi Y, Handt S, Jakse G. Expression of glucose transporter 1 (Glut-1) in cell lines and clinical specimens from human prostate adenocarcinoma. *Anticancer research*. 2004;24(5A):3057-63.
45. Stewart GD, Gray K, Pennington CJ, Edwards DR, Riddick AC, Ross JA, et al. Analysis of hypoxia-associated gene expression in prostate cancer: lysyl oxidase and glucose transporter-1 expression correlate with Gleason score. *Oncology reports*. 2008;20(6):1561-7.
46. Reinicke K, Sotomayor P, Cisterna P, Delgado C, Nualart F, Godoy A. Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in benign and malignant human prostate tissue. *J Cell Biochem*. 2012;113(2):553-62.
47. Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:14523-6.
48. Jiang L, David ES, Espina N, Ferraris RP. GLUT-5 expression in neonatal rats: crypt-villus location and age-dependent regulation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2001;281:G666-74.
49. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:35-54.
50. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition*. 2010;26(11-12):1044-9.
51. Le MT, Frye RF, Rivard CJ, Cheng J, McFann KK, Segal MS, et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(5):641-51.
52. Hui H, Huang D, McArthur D, Nissen N, Boros LG, Heaney AP. Direct spectrophotometric determination of serum fructose in pancreatic cancer patients. *Pancreas*. 2009;38(6):706-12.

53. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive diseases and sciences*. 2016;61:1282-93.
54. Putkonen L, Yao CK, Gibson PR. Fructose malabsorption syndrome. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2013;16:473-7.
55. Kedar E, Simkin PA. A perspective on diet and gout. *Advances in chronic kidney disease*. 2012;19:392-7.
56. Monzavi-Karbassi B, Hine RJ, Stanley JS, Ramani VP, Carcel-Trullols J, Whitehead TL, et al. Fructose as a carbon source induces an aggressive phenotype in MDA-MB-468 breast tumor cells. *International journal of oncology*. 2010;37:615-22.
57. Johnson RJ, Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T. The effect of fructose on renal biology and disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21:2036-9.
58. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. *The Journal of nutrition*. 2009;139(6):1236S-41S.
59. Cox CL, Stanhope KL, Schwarz JM, Graham JL, Hatcher B, Griffen SC, et al. Consumption of fructose- but not glucose-sweetened beverages for 10 weeks increases circulating concentrations of uric acid, retinol binding protein-4, and gamma-glutamyl transferase activity in overweight/obese humans. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):68.
60. Norat T, Scoccianti C, Boutron-Ruault M-C, Anderson A, Berrino F, Cecchini M, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiology*. 2015;39:S56-S66.
61. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene*. 2004;23(38):6365-78.
62. Key TJ, Spencer EA. Carbohydrates and cancer: an overview of the epidemiological evidence. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007;61:S112-S21.
63. Aune D, Chan DSM, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, et al. Dietary fructose, carbohydrates, glycemic indices and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Oncology*. 2012;23:2536-46.

64. Gnagnarella P, Gandini S, La Vecchia C, Maisonneuve P. Glycemic index, glycemic load, and cancer risk: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87:1793-801.
65. Jiang Y, Pan Y, Rhea PR, Tan L, Gagea M, Cohen L, et al. A Sucrose-Enriched Diet Promotes Tumorigenesis in Mammary Gland in Part through the 12-Lipoxygenase Pathway. *Cancer research*. 2016;76(1):24-9.
66. Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P, et al. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk--a meta-analysis of observational studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87:627-37.
67. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer letters*. 2014;355(2):176-83.
68. Douard V, Ferraris RP. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *The Journal of physiology*. 2013;591(2):401-14.
69. Liu H, Heaney AP. Refined fructose and cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15:1049-59.
70. Chan KK, Chan JY, Chung KK, Fung KP. Inhibition of cell proliferation in human breast tumor cells by antisense oligonucleotides against facilitative glucose transporter 5. *J Cell Biochem*. 2004;93(6):1134-42.
71. Wuest M, Trayner BJ, Grant TN, Jans HS, Mercer JR, Murray D, et al. Radiopharmacological evaluation of 6-deoxy-6-[18F]-fluoro-D-fructose as a radiotracer for PET imaging of GLUT5 in breast cancer. *Nuclear medicine and biology*. 2011;38(4):461-75.
72. Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Gross SC, Hirota S, Hosobe S, et al. FAS expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene*. 2005;24(34):5389-95.
73. Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Esquenet M, Heyns W, Verhoeven G. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology*. 1996;137(10):4468-74.
74. Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, et al. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2005;24(22):3574-82.

75. Zaytseva YY, Rychahou PG, Gulhati P, Elliott VA, Mustain WC, O'Connor K, et al. Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2012;72(6):1504-17.
76. Benedettini E, Nguyen P, Loda M. The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations. *Diagnostic histopathology.* 2008;14(5):195-201.
77. Swinnen JV, Heemers H, van de Sande T, de Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, et al. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2004;92(4):273-9.
78. Heemers H, Maes B, Foulfelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Molecular endocrinology.* 2001;15(10):1817-28.
79. Heemers H, Vanderhoydonc F, Roskams T, Shechter I, Heyns W, Verhoeven G, et al. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. *Molecular and cellular endocrinology.* 2003;205(1-2):21-31.
80. Dasgupta S, Putluri N, Long W, Zhang B, Wang J, Kaushik AK, et al. Coactivator SRC-2-dependent metabolic reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *The Journal of clinical investigation.* 2015;125(3):1174-88.
81. Robubi A, Huber KR, Krugluger W. Extra fructose in the growth medium fuels lipogenesis of adipocytes. *Journal of obesity.* 2014;2014:647034.
82. Park OJ, Cesar D, Faix D, Wu K, Shackleton CH, Hellerstein MK. Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridaemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. *The Biochemical journal.* 1992;282 (Pt3):753-7.
83. Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell metabolism.* 2009;9(3):252-64.
84. Silbernagel G, Machann J, Unmuth S, Schick F, Stefan N, Haring HU, et al. Effects of 4-week very-high-fructose/glucose diets on insulin sensitivity, visceral fat and intrahepatic lipids: an exploratory trial. *Br J Nutr.* 2011;106(1):79-86.

85. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(5):1322-34.
86. Ishimoto T, Lanaspá MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology*. 2013;58(5):1632-43.
87. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1282-93.
88. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(30):18982-9.
89. Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett*. 2002;524(1-3):199-203.
90. Colville CA, Seatter MJ, Jess TJ, Gould GW, Thomas HM. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J*. 1993;290 (Pt 3):701-6.
91. Kasahara T, Kasahara M. Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1324(1):111-9.
92. Phay JE, Hussain HB, Moley JF. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*. 2000;66(2):217-20.
93. Ibberson M, Uldry M, Thorens B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):4607-12.
94. Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, Cheeseman C. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:234-40.

95. Vitart V, Rudan I, Hayward C, Gray NK, Floyd J, Palmer CN, et al. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet.* 2008;40(4):437-42.
96. Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab.* 2001;74(1-2):186-99.

Table 1. Summary table of hexose transporter localization and substrate specificity

Isoform	Major sites of expression	Substrates (K_m)	References
Glut-1	Ubiquitously expressed, erythrocytes, blood-brain barrier	Glucose (K_m 3 mM) Glucosamine (K_m 2.1 mM) DHA (K_m 1.1 mM)	(88, 89)
Glut-2	Liver, retina, kidney, erythrocytes	Glucosamine (K_m 0.8 mM) Glucose (K_m 17mM) Galactose (k_m 85mM) Fructose (K_m 67mM)	(89, 90)
Glut-3	Neurons, placenta, testis	DHA (K_m 1.1 mM) Glucose (K_m 1.4 mM) Galactose (K_m 8.5mM)	(88, 90)
Glut-4	Skeletal and cardiac muscle	Glucose (K_m 5.2mM) DHA (K_m 0.98 mM) Glucosamine (K_m 3.9mM)	(88, 91)
Glut-5	Prostate, erythrocytes, kidney, small intestine	Fructose (K_m 6mM)	(47)
Glut-6	Brain, spleen, smooth muscle cells	Glucose (K_m 5mM)	(92)

Glut-7	Small intestine, colon, testis	Glucose (K_m 0.3mM) Fructose (K_m 0.2mM)	(12)
Glut-8	Testis, neurons, adipose cells	Glucose (K_m 2 mM)	(93)
Glut-9	Kidney, lung, liver	Glucose (K_m 0.61 mM) Fructose (K_m 0.42 mM) Urate (K_m 0.890 mM)	(94, 95)
Glut-10	Liver, pancreas, placenta, kidney	2-deoxy-D-glucose (K_m 0.3mM)	(96)
Glut-11	Heart, skeletal muscle, kidney	Glucose (K_m 0.16mM) Fructose (K_m 0.06mM)	(94)
Glut-12	Heart, skeletal muscle, prostate	Glucose, α -methyl-D- glucopyranoside, 2- deoxy-D-glucose, fructose, galactose	(28)
HMIT	Brain, adipocyte tissue	Myoinositol (K_m 0.1mM)	(89)
Glut-14	Testis	N/A	(23)

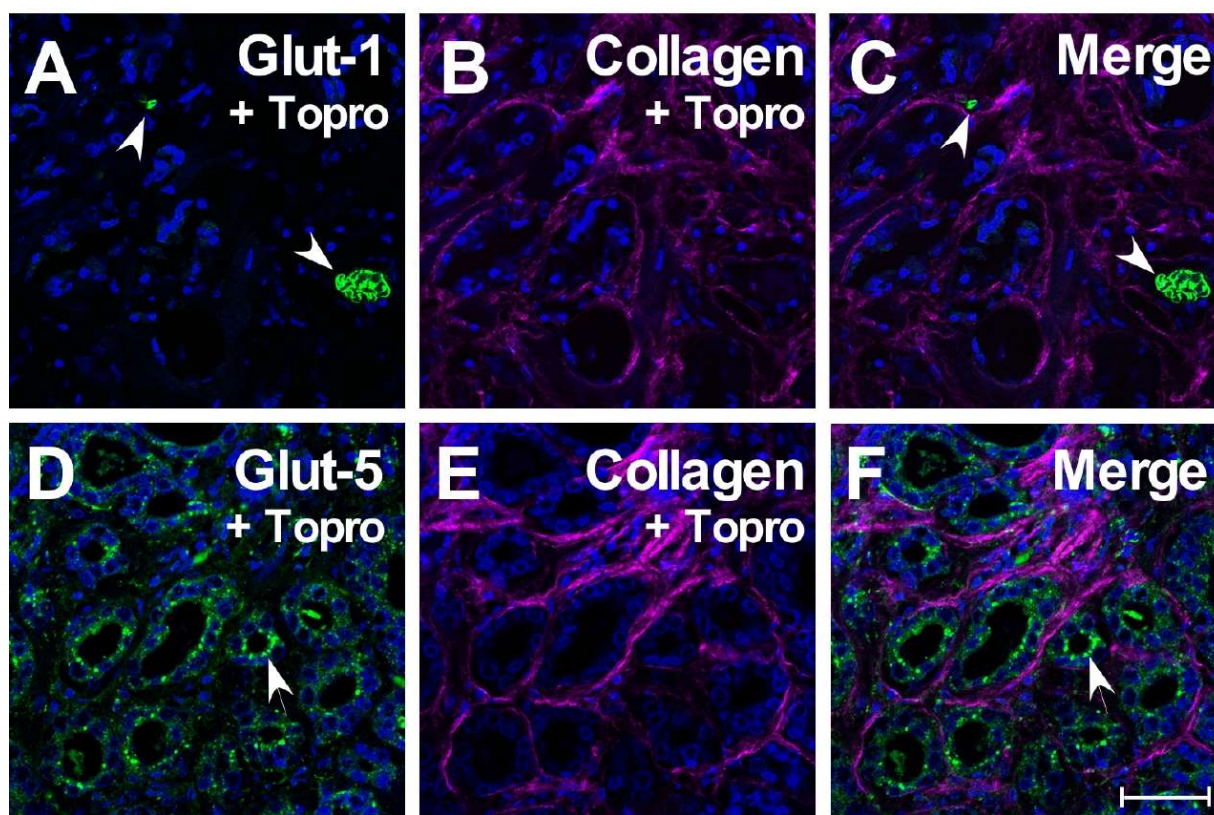
Figure Legends

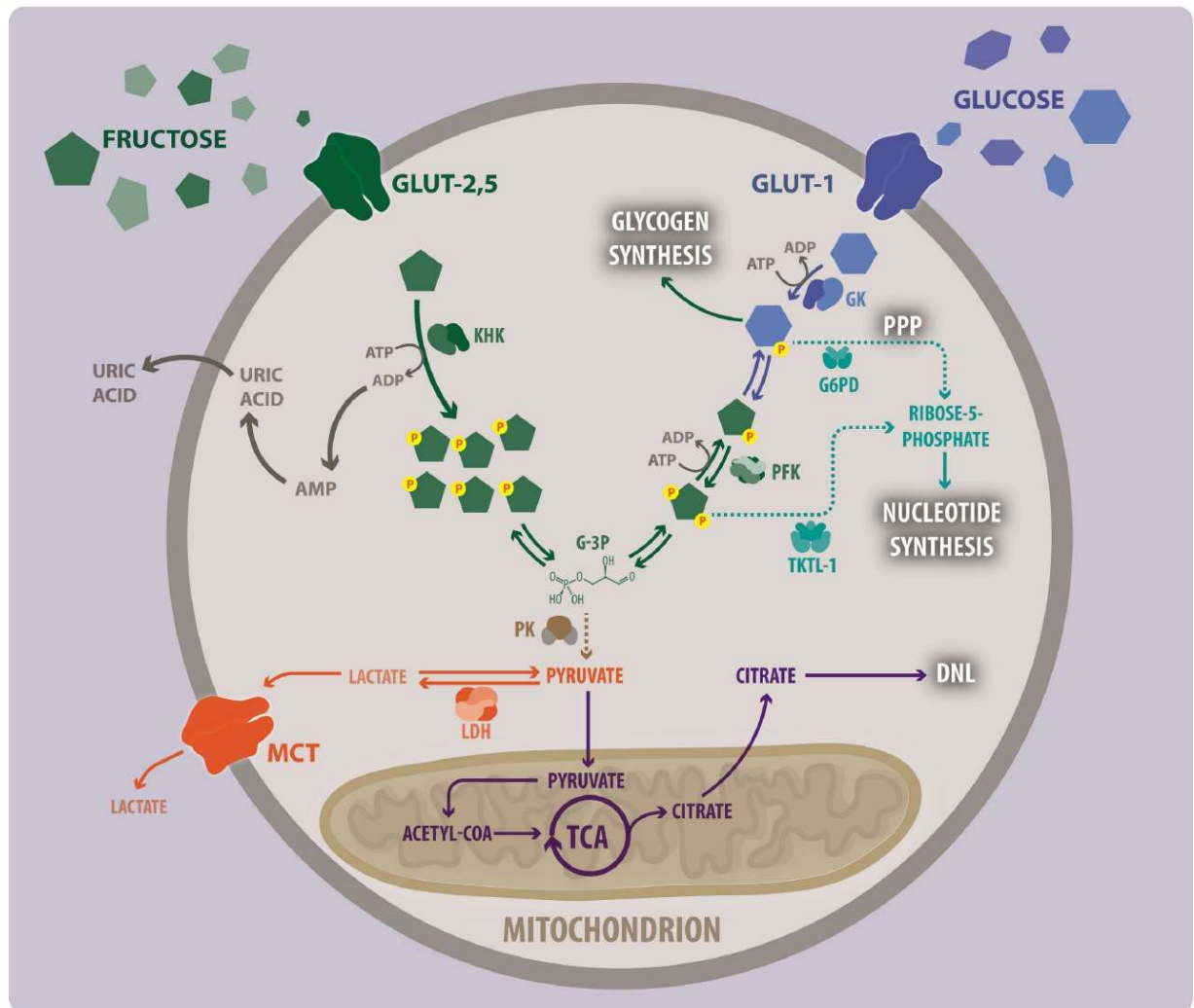
Figure 1. Immunostaining analysis of Glut-1 and Glut-5 expression in malignant human prostate tissues Levels of expression of Glut-1 and Glut-5 in clinical specimens of CaP were analyzed using two-photon laser scanning microscopy (A-F). Anti-Glut-1 (A-C) or anti-Glut-5 (D-F) primary antibodies were detected using anti-rabbit secondary antibodies coupled to green fluorescent protein (GFP, green). Topro staining (blue) was used to visualize nuclei. Collagen fibers were detected using the generation of the second harmonic (pink). Arrowheads on panels D and F indicate clusters of Glut-5 expression in CaP. Arrowheads on panels A and C indicate positive immunostaining for Glut-1 on erythrocytes. Black and white bars: 50 μ m

Figure 2. Schematic representation of glucose and fructose metabolism in human cells Once inside the cell, glucose or fructose are phosphorylated rapidly by glucokinase (GK) or ketohexokinase (KHK), respectively. Glucose-6-phosphate is metabolized to fructose-6-phosphate and continues through the glycolytic pathway Fructose-1-phosphate (F-1-P) is split directly to triose-phosphates isomers like glyceraldehyde-3-phosphate (G-3P) and joins glycolysis at this point. KHK has no regulated feedback, so continuous formation of F-1-P could cause excessive use of ATP and subsequent AMP metabolization to uric acid. Triose- phosphate isomers may be redirected to other pathways involved in biosynthesis of macromolecules, such as nucleotides or triglycerides, or converted to pyruvate using several metabolic steps. Pyruvate can be utilized for energy production (ATP) through oxidative phosphorylation into mitochondria or metabolized to lactate by the non-oxidative pathway (Warburg effect) and extruded from the cell by monocarboxylate transporters (MCT). Abbreviations: GLUT: Glucose Transporter, GK: Glucokinase, PFK: Phosphofructokinase, G- 3P: glyceraldehyde-3-phosphate, KHK: Ketohexokinase, PK: Pyruvate kinase, LDH: Lactate

Carreño *et al.*, Figure 1

Human Prostate Cancer



Carreño *et al.*, Figure 2

4.1.2. Publicación 2: Dietary Fructose Promotes Prostate Cancer Growth.

Daniela V. Carreño^{1, ‡}, Néstor B. Corro^{1, ‡}, Javier F. Cerda-Infante^{2, ‡}, Carolina E. Echeverría^{6,7}, Catalina A. Asencio-Barría¹, Verónica A. Torres-Estay⁵, Gonzalo A. Mayorga-Weber^{9,10}, Pablo A. Rojas³, Loreto P. Véliz¹, Pedro A. Cisternas^{4,11}, Viviana P. Montecinos², Ignacio F. San Francisco³, Manuel A. Varas-Godoy⁶, Paula C. Sotomayor³, Maite A. Castro^{9,10,12}, Francisco J. Nualart⁸, Nibaldo C. Inestrosa⁴ and Alejandro S. Godoy^{6,13, *}

Departments of Physiology¹, Hematology-Oncology², Urology³, and Centro de Envejecimiento y Regeneración (CARE)⁴, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas⁵, Universidad Bernardo O'Higgins, Santiago, Chile; Centro de Biología Celular y Biomedicina (CEBICEM)⁶, Universidad San Sebastián, Santiago, Chile; Centro de Investigación e Innovación Biomédica⁷, Universidad de los Andes, Santiago, Chile; Centro de Microscopía Avanzada (CMA)⁸, Concepción, Chile; Instituto de Bioquímica y Microbiología⁹ and Center for Interdisciplinary Studies on Nervous System (CISNe)¹⁰, Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile; Instituto de Ciencias de la Salud¹¹, Universidad de O'Higgins, Rancagua, Chile; Janelia Research Campus¹², HHMI, Ashburn, VA; Department of Urology¹³, Roswell Park Comprehensive Cancer Center, Buffalo, NY.

‡These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author:** Alejandro Samuel Godoy, Ph.D. Centro de Biología Celular y Biomedicina (CEBICEM), Universidad San Sebastián. Carmen Sylva 2444, Providencia, Santiago de Chile, zip code: 7510156. E-mail: alejandro.godoy@uss.cl

Conflicts of interest: “The authors declare no potential conflicts of interest.”

Abstract

Clinical localization of primary tumors and sites of metastasis by positron emission tomography (PET) is based on the enhanced cellular uptake of 2-deoxy-2-[18F]-fluoro- D-glucose (FDG). In prostate cancer (PCa), however, PET-FDG imaging has shown limited clinical applicability, suggesting that PCa cells may utilize hexoses other than glucose, such as fructose, as the preferred energy source. Our previous studies suggested that PCa cells overexpress fructose transporters but not glucose transporters compared to benign cells. Here we focused on validating the functional expression of fructose transporters and determining whether fructose can modulate the biology of PCa cells *in vitro* and *in vivo*. Fructose transporters Glut-5 and Glut-9 were significantly upregulated in clinical specimens of PCa when compared to their benign counterparts. Fructose levels in the serum of patients with PCa were significantly higher than healthy subjects. Functional expression of fructose transporters was confirmed in PCa cell lines. A detailed kinetic characterization indicated that Glut-5 represents the main functional contributor in mediating fructose transport in PCa cells. Fructose stimulated proliferation and invasion of PCa cells *in vitro*. In addition, dietary fructose increased the growth of PCa cell line-derived xenograft tumors and promoted PCa cell proliferation in patient-derived xenografts. Gene set enrichment analysis confirmed that fructose stimulation enriched for proliferation-related pathways in PCa cells. These results demonstrate that fructose promotes PCa cell growth

and aggressiveness *in vitro* and *in vivo* and may represent an alternative energy source for PCa cells.

Statement of significance: This study identifies increased expression of fructose transporters in prostate cancer and demonstrates a role for fructose as a key metabolic substrate supporting prostate cancer cells, revealing potential therapeutic targets and biomarkers.

Keywords: Fructose, Prostate Cancer, Metabolism.

Introduction

Prostate Cancer (PCa) represents the second leading cause of cancer-related deaths in adult men in the United States(1). The most characterized risk factors for PCa are advanced age, black race/ethnicity, and family history of the disease. Other modifiable risk factors such as lifestyle, have been under study in recent years. Western diet has been linked to an increase in incidence of pathologies such as obesity, metabolic syndrome, and cancer. Sweeteners have become one of the principal sources of carbohydrates in the Western diet and can be found in processed foods, beverages, and fruit juices. High Fructose Corn Syrup (HFCS, 10-53% glucose, 42-90% fructose) is one of the most used sweetener in the food industry and represents more than 40% of total sweeteners consumed in the USA(2). The idea that dietary fructose is metabolized almost completely in the liver has been challenged. It has been reported that after consumption of beverages containing HFCS, fructose can enter and reach a steady level in the bloodstream and maintain it for hours(3).

Hexose uptake in human cells is primarily mediated by the glucose transporter family (Gluts), from which fourteen members (Glut-1 to Glut-14) have been described(4). Gluts exhibit both tissue specificity and multi-functional transport capacity(4). Glut-1 is the most ubiquitous isoform, and it transports glucose and galactose. Fructose can be transported by Glut-2 (K_m 76 mmol/l), Glut-5 (K_m 6 mmol/l), Glut-9 (K_m 0.42 mmol/l) and Glut-11 (K_m 0.06 mM), with Glut-5 being an obligate fructose transporter(4).

Activation of Glut gene expression, specifically Glut-1, increases glucose transport/metabolism and is a molecular feature of the malignant phenotype in cancer. The high level of glucose uptake represents the biological basis for the clinical localization of primary cancers and sites of metastasis using positron emission tomography (PET), based on the use of 2-deoxy-2-[^{18}F]-

fluoro-D-glucose ([¹⁸F]-FDG). Unlike most human neoplasms, PET-FDG has shown limited clinical applicability in PCa(5,6), which suggests: 1) A low metabolic activity of PCa cells or 2) PCa cells use hexoses other than glucose, such as fructose, as an energy source to maintain their metabolic requirements.

Epidemiological studies(7,8) have established a positive correlation between the incidence/progression of PCa and western diet. A recent study(9) indicated a direct relationship between the increase in the consumption of dietary sugar, particularly HFCS, and a higher risk of developing symptomatic PCa. Fructose has been involved in accelerating pancreatic and breast cancer cell proliferation and incidence of metastasis, respectively(10,11). In addition, fructose enhanced tumor growth and grade in a murine model of intestinal cancer(12). The characteristics observed in other human neoplasms could be exacerbated in PCa due to low level of Glut-1 and the demonstration that PET-FDG has limited clinical applicability for imaging/detection of PCa, which reflects the lack of functional glucose transporters.

Materials and Methods

Blood samples and clinical specimens

Serum samples were collected from venous blood of 65 healthy and 65 PCa diagnosed patients. All healthy subjects did not have any background related to PCa and had PSA levels significantly lower than PCa patients. PCa diagnosed patients were determined by needle transrectal biopsies. Human benign and malignant tissue sections were obtained commercially at Roswell Park Comprehensive Cancer Center through de-identified clinical specimens of PCa patients. For PDX analysis, surgically resected prostate tissue was collected from PCa patients during radical prostatectomy. Tissue specimens were collected at the operating room,

submerged immediately in ice-cold ViaSpan solution (Barr Laboratories Inc., Pomona, NY) and transported on ice for transplantation. All blood and tissue specimens were collected after obtaining a written informed consent from the patients. All studies were conducted in accordance with recognized international ethical guidelines (Declaration of Helsinki, CIOMS, and Belmont Report) and approved by the institutional review board at Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC).

Immunohistochemistry

Antigen retrieval was performed using 0.01M sodium citrate buffer pH 6.0 for 30 min. Endogenous peroxidase activity was inhibited using 3% H₂O₂ in methanol and nonspecific binding of antibodies was blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) for 20 min. Tissue sections were incubated with anti-Glut-1, -Glut-2, -Glut-5, -Glut-7, -Glut-9 or -Glut-11 (1:100-1:1.000 dilution, Alpha Diagnostic International) and anti-Ki67 (1:500 dilution, Abcam) antibody for 12 h. Tissue sections were then incubated with a HRP-conjugated secondary antibody (1:100, Dako) for 1h at RT (room temperature). Peroxidase activity was developed using 3,3'-Diaminobenzidine (Dako) and H₂O₂. Hematoxylin was used to counterstain nuclei. Slides were dehydrated through graded alcohol to xylene and mounted with coverslips. For human clinical specimens, quantitation of the immunostaining was performed in 10 images from each specimen, which were scored blindly by 3 independent observers who scored the immunostaining on a scale ranging from 0 (no staining) to 3 (strong staining) in 100 epithelial cells from each image. For tumor tissues obtained from cell line-derived and patient-derived xenografts, immunostaining was quantified using ImageJ 1.52k software (National Institutes of Health) and reported as integrated density or percentage of positive cells. The results were averaged from 10 image fields for each sample.

Fructose and glucose determination

Serum fructose and glucose levels from patients were measured using a commercially available kit (Abcam). Free fructose was enzymatically converted to β -glucose and then converted to a product that reacts with OxiRed Probe to emit fluorescence (Ex/Em=535/587nm). Concentrations of fructose and glucose were calculated by extrapolating the sample readings from a standard curve.

Cell culture

All human PCa cell lines, LNCaP (androgen-sensitive) and PC-3 (metastatic), and the benign human prostate epithelial cell line, RWPE-1, were commercially obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and used for no more than 20 passages. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and cultured in RPMI-1640 medium (Gibco-Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, (Gibco-Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin. All cell lines were tested every two weeks for the presence of mycoplasma using the EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries).

Western blot

Cells were lysed in RIPA lysis buffer (50mM Tris [pH 8], 1% Triton x-100, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 5mM EDTA [pH 8], and 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with 1x protease inhibitor cocktail and separated by centrifugation. 50 μ g of protein (determined by the Lowry's method) was subjected to electrophoresis in 10% SDS PAGE. The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and blocked with 5% BSA in 1X TBS-Tween. The blot was incubated overnight with anti-Glut-1, -Glut-2, -Glut-5, -Glut-7, -Glut-9, -Glut-11 (1:500-1:1,000 dilution, Alpha Diagnostic International), -tubulin (1:3,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology) and -GAPDH (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology) antibody. Membranes were

then incubated with an HRP-conjugated secondary antibody (1:500, Dako) for 1h at RT. The reaction was revealed by the ECL Western Blot Analysis System kit (Thermo Scientific Pierce).

Transport assays

Cell lines were incubated at 37°C in incubation buffer containing 0,1 mCi/mL of D-[U-14C]-fructose or 1 mCi/mL of 2-[1,2-3H]-deoxy-D-[3H] glucose (American Radiolabeled Chemicals). To establish the initial velocity of fructose transport in LNCaP and PC-3 PCa cell lines, time-course (2-60 sec) analyses were performed using the radioactive tracer D-[U-14C]-fructose. Subsequently, based on the initial velocity data, dose-response (Michaelis-Menten) analyses were developed by incubation of PCa cells with increasing concentrations (0.01-50 mM) of radioactive fructose under initial velocity conditions (6 seconds). Transport reactions were stopped with ice-cold stopping solution (1X PBS containing 10M HgCl₂). Cells were washed twice with stopping solution and radioactivity was determined by scintillation counting. The kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) associated with fructose transport were determined using the Michaelis-Menten equation and the double reciprocal (Lineweaver-Burk) plot.

Proliferation rate determination

Cells were seeded in 12-well plates (4,000 cells/well) in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. After that, cells were incubated with glucose-free RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies) supplemented with 5mM glucose, fructose or galactose. Cell growth was measured every day for a total of 7-10 days by direct counting of cell number using the trypan blue exclusion assay.

Immunofluorescence

Cells were seeded on a glass coverslip (12mm) into a 24-well plate in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. After that, cells were incubated with glucose-free RPMI 1640 medium supplemented with 5mM glucose or 5mM fructose for 6 days and cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at RT. Cell permeabilization was performed using 0.1% Triton X-100 in Tris-HCl pH 7.8 for 15 minutes. Subsequently, cells were incubated overnight with anti-Ki67 primary antibody (1:500 dilution, Abcam) at RT. An Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (1:100, Molecular Probes) was used as a secondary antibody. Nuclei were visualized using 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in Tris-HCl pH 7.8 (1:5.000) for 5 min at room temperature. Images were acquired using a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Scope.A1).

Migration and invasion assays

Migration and invasion capacities were measured using Cell Biolabs Cytoselect 96-well Cell Migration and Invasion Assay (Cell Biolabs, Inc.). LNCaP and PC-3 cells were cultured in 100 mm plates until 50-60% confluence and then treated with 5mM glucose or 5mM fructose in serum free RPMI media for 48 hours. After treatment, 5×10^4 (for migration assays) or 2×10^5 (for invasion assays) cells were seeded on the upper chamber of each transwell assay in serum-free RPMI medium supplemented with 5mM glucose or 5mM fructose, while lower chambers were filled with RPMI medium supplemented with 5mM glucose or 5mM fructose and 10% FBS to create a chemotaxis gradient. Cells were incubated for 24 h (for migration) or 48 h (for invasion) at 37°C, and their migration/invasion capacities were assessed by quantifying the number of cells that migrate or invade into the lower chamber using a fluorescent probe provided by the kit and a fluorescent multiplate reader Synergy2 (BioTek) (Ex/Em=480/520nm).

Migration or invasion values were reported as the ratio between the signal of cells treated with fructose compared to glucose as mean $\pm$ SD of triplicate biological samples. Analyses using the Synergy2 reader were performed with the technical support of the Advanced Microscopy Facility (UMA) from PUC.

siRNA analysis

The PC-3 PCa cell line was transiently transfected with targeting human Glut-5 and non-targeting siRNAs (75 nM, Santa Cruz Biotechnology) using TransIT-siQUEST® Transfection Reagent (Mirus Bio LLC) according to the manufacturer's instructions. Down-regulation of the expression of Glut-5 in the PC-3 PCa cell line was confirmed using Western blot analyses 72 h after transfection.

Xenograft models

Six weeks-old male NOD-scid IL2R γ manull(NSG) mice (Jackson Laboratories) were separated into three experimental groups (n=8 per group): 1) a control group, which received regular diet and normal water, 2) a glucose-treated group that received regular diet and water supplemented with 15% w/v glucose and 3) a fructose-treated group, which received regular diet and water supplemented with 15% w/v fructose. For cell line-derived xenografts, 2×10^6 PC-3 cells were injected into the flank of male NSG mice. Tumor volume was measured for up to 8 weeks or until tumor reached a volume of 2 cm³ using a caliper and the tumors were weighed upon excision. For patient-derived xenografts (PDX), PCa tissue specimens were cut into wedge-shaped pieces of 2 mm³. 4 to 6 pieces of tissue were dipped into Matrigel and transplanted individually into the subcutaneous compartment through a 10-gauge trocar device into the flank of male NSG mice. 21 days post-implantation, the pieces of tissue were surgically removed and processed for histological analyses. All animal experimentation was conducted

with the approval and under the supervision of the Institutional Animal Care and Use Committee of PUC.

RNA sequencing for transcriptome analysis

Sequencing libraries were prepared with the RNA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR) kit (Roche Sequencing Solutions), from 500 ng total RNA obtained using the PureLink RNA Mini kit-Ambion (Invitrogen) following ribosomal depletion. The libraries were quantitated using KAPA Biosystems qPCR kit, and were pooled together in an equimolar fashion, following experimental design criteria. Each pool was denatured and diluted to 350pM with 1% PhiX control library added. The resulting pool was loaded into the appropriate NovaSeq Reagent cartridge for 100 cycle paired end sequencing, performed on a NovaSeq6000 per the manufacturer's protocol (Illumina Inc.). For the bioinformatic analysis, raw reads passed quality filter from Illumina RTA were mapped to the hg38 human reference genomes and corresponding GENCODE (v25) annotation databases using STAR. The mapped bam files were further QCed using RSeQC, a quality control toolbox for RNASeq data, to identify potential RNASeq library preparation problems. From the mapping results, the read counts for genes were obtained by feature Counts from Subread. Data normalization and differentially expression analysis were performed using DESeq2, a variance-analysis package developed to infer the statically significant difference in RNA-seq data. Genes with an adjusted p-value of less than 0.05 and a fold change of greater than 1.5 in expression were considered differentially expressed. Pathway analysis was done by GSEA pre-ranked mode using ranked gene list based on test statistics from DE analysis against MSigDB's (v7.2) gene sets: hallmark (h), curated (c2.cp) and selected Ontology (c5).

Statistical analysis

All statistical data analysis was performed using Graphpad Prism 8.0 through unpaired student t-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA as was appropriate. P-value < 0.05 was set as threshold for significant results. Linear and non-linear regressions were calculated using Graphpad Prism 8.0 software (only correlations >0.9 were accepted).

Results and Discussion

The fructose transporters, Glut-5 and Glut-9 are overexpressed in human PCa specimens.

Immunostaining analyses of Glut-1, Glut-2, Glut-5, Glut-7, Glut-9, and Glut-11 were performed in 25-matched clinical specimens of non-tumor and tumor human prostate tissues. Glut-1 was not detected in non-tumor and tumor tissues (Fig.1A-B). Glut-5 and Glut-9 were significantly over-expressed in tumor tissues when compared to non-tumor tissues (Fig.1A-B). Glut-2 and Glut-7 were undetected or detected at very low levels in non-tumor and tumor tissues (Fig.1A-B). For Glut-11, although not statistically significant, we observed an increased expression in tumor tissues compared to non-tumor tissues. These results indicated that Glut-5, Glut-9, and probably Glut-11, could have a potential role to mediate fructose uptake in benign and malignant human prostate epithelial cells. These results confirmed our previous research(13) indicating that Glut-1 was not detected or detected at very low levels in PCa. Although expression of Glut-1 has been studied to some extent in human clinical specimens of PCa, until now the presence/functionality of this transporter remains controversial. An immunohistochemistry(14) analysis of Glut-1 in 195 clinical specimens of malignant prostate tissues indicated that 47% of the specimens showed positive immunostaining and 53% were negative. Among positive cases, Glut-1 immunostaining showed mostly cytoplasmic localization. A similar pattern of expression of Glut-1 was reported

by Xiao *et al.*(15), and by Gasinska *et al.*(16). Low levels of expression, or cytoplasmic/intracellular localization of Glut-1 could partially explain the limited clinical applicability of PET-FDG for imaging PCa. Together, this evidence suggests that uptake of fructose through a mixture of different Gluts could be a favored mechanism to fuel metabolic demands in PCa cells. We examined fasting serum fructose and glucose levels in 65 non-diabetic benign patients and 65 non-diabetic PCa patients (Fig.1C and Supp. Table 1). Clinical parameters like age and PSA levels were analyzed in benign and PCa patients, while Gleason score was analyzed only in PCa patients (Supp. Table 1). Gleason scores were consistent with patients with PCa, and PSA levels were significantly higher ($p=0.0448$) in PCa compared to benign patients. Fructose, but not glucose, levels were significantly higher ($p=0.0030$) in PCa compared to benign patients (Fig.1C). High levels of fructose were also reported in the serum of patients with pancreatic cancer(17). Even though the biological significance of this observation is not fully understood, it indicates that the relationship between fructose metabolism and development/progression of cancer might be broader than expected. Although the patients selected for this analysis were not diabetic, we cannot completely rule out the possibility of alterations in liver and/or kidney function, the possible effect of diet, among other parameters that could have a significant impact on the global and/or specific metabolism of hexoses. Therefore, more studies are required to validate the presence of fructose in the blood as a potential biomarker of malignancy of the prostate or any other tissue.

Glut-5 represents the main functional contributor to the fructose transport in PCa cells.

Levels of expression of Glut-1, Glut-2, Glut-5, Glut-7, Glut-9 and Glut-11 were analyzed in benign (RWPE-1) and malignant (LNCaP and PC-3) human prostate cell lines (Fig.2A). Glut-5 and Glut-9 were overexpressed in LNCaP and PC-3 cell lines when compared to RWPE-1 cell

line (Fig.2A). Glut-2 was not detected in benign and malignant human prostate cell lines, while Glut-7 and Glut-11 were detected at similar levels of expression (Fig.2A). Glut-1 was highly expressed in benign and malignant human prostate cell lines at similar level of expression (Fig.2A). This observation is consistent with the cell immortalization process being intrinsically associated with re-expression of isoform Glut-1(18). Cell immortalization process together with selective culture conditions (high glucose concentration in the culture medium) could at least partially explain the high level of expression of Glut-1 observed in PCa cell lines when compared to cancer epithelial cells from human prostate tissue. In order to validate *in vitro* the functionality of fructose and glucose transporters in benign and malignant human prostate cell lines, we performed basic uptake analyses of D-[U-14C]- fructose or 2-[1,2-3H]-deoxy-D-[3H] glucose (Fig.2B-C). Fructose uptake was significantly higher in LNCaP and PC-3 cells when compared to RWPE-1 cells (Fig.2C), reaching a maximum fructose uptake of ~ 40 pmol/ 10^6 cells in LNCaP and ~ 50 pmol/ 10^6 cells in PC3 cells compared to a maximum of ~ 5 pmol/ 10^6 cells in RWPE-1 cells. Therefore, PCa cell lines showed a 10-fold higher fructose uptake capacity when compared to benign cells. Consistently with the high level of expression of Glut-1, glucose uptake reached similar levels (~ 2 -3 pmol/ 10^6 cells) in benign and malignant human prostate cell lines (Fig.2B). To functionally identify the kinetic component(s) associated with the transport of fructose in PCa cells and determine the contribution of each component to the total fructose transport capacity, we performed time-course and Michaelis-Menten analyses in LNCaP and PC-3 cell lines (Fig.2D). Time-course analyses indicated that LNCaP and PC-3 cells take up fructose at a constant rate (initial velocity) of 1,11 pmol/ 10^6 cells/sec and 1,62 pmol/ 10^6 cells/sec for approximately 10 seconds, respectively (Fig.2D, uptake 0-8 sec). Michaelis-Menten analyses were performed under initial velocity conditions. For LNCaP cells, fructose transport approached

saturation at ~ 240 pmol/ 10^6 cells/min (Fig.2D, LNCaP, Michaelis-Menten). Linear transformation of the transport data through the Lineweaver-Burk plot indicated the presence of a single kinetic component with an apparent Michaelis constant (K_m) of 6.8mM. For PC-3 cells, fructose transport approached saturation at ~ 80 pmol/ 10^6 cells/min (Fig.2D, PC-3, Michaelis-Menten). Linear transformation of the transport data through the Lineweaver-Burk plot indicated the presence of a single kinetic component with an apparent K_m of 7.1mM. The apparent K_m for the transport of fructose in LNCaP (6.8 mM) and PC-3 (7.1 mM) cell lines are fully compatible with the isoform Glut-5 ($K_m \sim 6$ mM), which represented the highest functional contributor in PCa cells.

Fructose supports proliferative rate and invasion capacity in PCa cells.

Growth curve analyses showed that, in RWPE-1 cell line, glucose was more effective than fructose or galactose to stimulate proliferation (Fig. 3A). In PCa cells, however, fructose stimulated proliferation at comparable levels to glucose (Fig.3A). Galactose was less effective than fructose or glucose to stimulate PCa cell proliferation (Fig.3A), which indicates that PCa cells may be preferentially sensitive to either fructose or glucose *in vitro*. This observation was confirmed using an immunofluorescence analysis of Ki67 in PCa cells (Fig.3B). Our immunostaining data showed no significant differences in Ki67 expression in LNCaP and PC3 cell lines in the presence of glucose or fructose (Fig.3B). In addition, we analyzed the effect of fructose in comparison to glucose on migration and invasion capacities. Fructose or glucose were maintained in both the upper and lower chambers. FBS was utilized as a chemoattractant (Fig.3C-D, schematic representations). While migration capacity (Fig.3C) was not altered by fructose, invasion capacity (Fig.3D) was significantly enhanced in the presence of fructose when compared to glucose in both PCa cell lines. Previous reports indicated that invasion capacity of PCa cells

can be suppressed by downregulating GTPases like Rab7(19) or Rab23(20), which are required for the transport of proteases-containing vesicles. An increase in GTP pools could lead to increased activity of these GTPases, and consequently, an enhanced invasion capacity of cancer cells. Fructose metabolism has been proven to stimulate nucleotide biosynthesis in pancreatic cancer(10). In addition, fructose administration in the drinking water can enhance metastatic sites in breast cancer(11). Together, our results suggest that fructose transport/metabolism can promote invasion capacity/metastatic stage of PCa cells probably through an increase in GTP pools. Further studies are needed to prove this hypothesis. In order to provide a proof-of-concept that transport of fructose was required to promote the biological impact of this hexose on PCa cells, PC-3 cells were transiently transfected with a specific Glut-5-targeting siRNA (Supp. Fig. 1A-B). Down regulation of the expression of Glut-5 in PC-3 cells significantly reduced (~50%) fructose-stimulated cell proliferation *in vitro*, an effect that was not observed on wild-type PC-3 cells nor in PC-3 cells transiently transfected with a non-targeting siRNA (Supp. Fig. 1C-D).

Dietary fructose boosts tumor growth/proliferation of human PCa xenograft models and promote proliferation/cell cycle and carcinogenesis/progression pathways *in vitro* in PCa cells. The effect of fructose on *in vivo* tumor growth/PCa cell proliferation was evaluated by injecting PC-3 cells or transplanting human PCa tissues subcutaneously into the flank of NSG mice. For PC-3 cell line-derived xenografts, tumor volume was monitored weekly for 8 weeks (Fig.4A). Four weeks after cell injection, differences between fructose and control condition were observed, reached significance 7 weeks post-injection and were maintained throughout the experiment. No significant differences in tumor growth were observed between glucose and control condition (Fig.4A). Tumors dissected from fructose condition were visually larger in size (Fig.4B) and significantly higher in weight (Fig.4C) when compared to tumors dissected from

glucose or control condition. Size (Fig.4B) and weight (Fig.4C) of tumors dissected from glucose condition did not differ significantly from control condition. This apparent contradictory effect of glucose on *in vitro* versus *in vivo* analyses on PC-3 cell growth may be the result of a metabolic adaptation of PC-3 cells grown *in vivo*. Consequently, we analyzed the expression of Glut-1, Glut-2, Glut-5, Glut-7, Glut-9, and Glut-11 in tissue specimens of PC-3 cell line-derived xenograft tumors (Supp. Fig.2A). Our results indicated that Glut-5 and Glut-9 were significantly up-regulated in fructose when compared to both, glucose and control conditions (Supp. Fig.2B). Although not statistically significant, Glut-1 was down-regulated in fructose condition when compared to both, glucose and control condition (Supp. Fig.2A-B). Lack of statistical significance in Glut-1 expression could be attributable to the masking effect caused by the high level of expression of this isoform in hypoxic/peri-necrotic areas observed in all treatment conditions. In parallel, we utilized a patient-derived xenograft model (PDX) in which tissue integrity and architecture remained constant throughout the experiment (Fig.4D, H&E). Immunostaining analysis of Ki67 in tissue sections from PDX showed a significant increase in the percentage of Ki67-positive PCa cells in fructose when compared to both, glucose and control conditions (Fig.4D). In addition, Glut-5 and Glut-9 expression were significantly increased in fructose when compared to control condition (Fig.4D). No significant differences in Glut-5 and Glut-9 expression were observed between fructose and glucose or between glucose and control condition (Fig.4D). Stimulatory effect of fructose on tumor growth also was reported in certain subtypes of breast(11) and intestinal(12) cancers. In PCa, however, these findings become more relevant, since PCa cells express very low or intracellular levels of Glut-1(13) and PCa tumors are not efficiently imaged using PET-FDG(6).

To get insights into the long-term effect of fructose on gene pathways that drive proliferation in PCa cells, we performed a transcriptome analysis of PC-3 cells stimulated *in vitro* with either 5 mM fructose or 5 mM glucose. Interestingly, and according with our *in vitro* and *in vivo* data, gene set enrichment analysis (GSEA) performed on the RNA sequencing data showed that fructose stimulation significantly enriched (p-value=0.0004) for cell proliferation- related genes (GO_CELL_PROLIFERATION, <https://www.gsea-msigdb.org>) when compared to glucose stimulation (Supp. Fig. 3A). Among the top 10 fructose-upregulated genes included in this pathway, our study found over-expression of classic pro-tumorigenic/proliferation cytokines/paracrine factors such as the transforming growth factor beta-2 (TGFβ2), ligand for the receptor-type protein-tyrosine kinase (KITLG), wingless-type MMTV integration site family-4 (WNT4), and fibroblast growth factor 5 (FGF5), among others (Supp. Fig. 3B). Further *in vitro* and *in vivo* knocked-down analyses on some of these genes might provide potential target genes through which fructose or fructose metabolites promote proliferation of PCa cells and probably other cancer cell types as well.

Altogether, our findings provide compelling evidence to support a key role for fructose as a potential metabolic substrate capable of increasing PCa cell proliferation and aggressiveness. Further expression and functional studies of Glut-5 in PCa may provide clinical and therapeutic opportunities, such as the validation of Glut-5 as a potential biomarker and a therapeutic target.

Acknowledgements

Supported by grants from the Department of Defense (W81XWH-12-1-0341) to A. Godoy, HHMI Janelia Visitor Program (JVS0028700) to M. Castro, FONDECYT 1161115 to A. Godoy, FONDECYT 1160724 to N. Inestrosa, FONDECYT 11140255 to P. Sotomayor, FONDECYT 11160651 to P. Cisternas, FONDECYT 1191620 to M. Castro, FONDECYT 1150397 to V.

Montecinos, CMA BIO BIO PIA-Conicyt ECM-12 to F. Nualart, Basal Center of Excellence in Aging and Regeneration (CONICYT-PFB12/2007) to N. Inestrosa, and fellowships from FONDECYT-Post-Doctoral (3160717) to D. Carreño, CONICYT-PhD 22140138 to V. Torres-Estay, CONICYT-PhD 21171084 to N. Corro, PhD Scholarship FAI-Universidad de los Andes-Chile to C. Echeverría.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69:7-34
2. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 2010;26:1044-9
3. Le MT, Frye RF, Rivard CJ, Cheng J, McFann KK, Segal MS, et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolism* 2012;61:641-51
4. Echeverria C, Nualart F, Ferrada L, Smith GJ, Godoy AS. Hexose Transporters in Cancer: From Multifunctionality to Diagnosis and Therapy. *Trends Endocrinol Metab* 2021
5. Bender H, Schomburg A, Albers P, Ruhlmann J, Biersack HJ. Possible role of FDG-PET in the evaluation of urologic malignancies. *Anticancer Res* 1997;17:1655-60
6. Salminen E, Hogg A, Binns D, Frydenberg M, Hicks R. Investigations with FDG-PET scanning in prostate cancer show limited value for clinical practice. *Acta Oncol* 14 2002;41:425-9
7. Fabiani R, Minelli L, Bertarelli G, Bacci S. A Western Dietary Pattern Increases Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2016;8
8. Lin PH, Aronson W, Freedland SJ. Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence. *BMC Med* 2015;13:3
9. Makarem N, Bandera EV, Lin Y, Jacques PF, Hayes RB, Parekh N. Consumption of Sugars, Sugary Foods, and Sugary Beverages in Relation to Adiposity-Related Cancer Risk in the Framingham Offspring Cohort (1991-2013). *Cancer Prev Res (Phila)* 2018;11:347-58
10. Liu H, Huang D, McArthur DL, Boros LG, Nissen N, Heaney AP. Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer Res* 2010;70:6368-76
11. Fan X, Liu H, Liu M, Wang Y, Qiu L, Cui Y. Increased utilization of fructose has a positive effect on the development of breast cancer. *PeerJ* 2017;5:e3804
12. Goncalves MD, Lu C, Tutnauer J, Hartman TE, Hwang SK, Murphy CJ, et al. High-fructose corn syrup enhances intestinal tumor growth in mice. *Science* 2019;363:1345-9

13. Reinicke K, Sotomayor P, Cisterna P, Delgado C, Nualart F, Godoy A. Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in benign and malignant human prostate tissue. *J Cell Biochem* 30 2012;113:553-62
14. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaiba MM, Begnami MD, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66:965-72
15. Xiao H, Wang J, Yan W, Cui Y, Chen Z, Gao X, et al. GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer. *Prostate* 2018;78:86-94
16. Gasinska A, Jaszczynski J, Rychlik U, Luczynska E, Pogodzinski M, Palaczynski M. Prognostic Significance of Serum PSA Level and Telomerase, VEGF and GLUT-1 Protein Expression for the Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy. *Pathol Oncol Res* 2019
17. Hui H, Huang D, McArthur D, Nissen N, Boros LG, Heaney AP. Direct spectrophotometric determination of serum fructose in pancreatic cancer patients. *Pancreas* 2009;38:706-12
18. Regina A, Roux F, Revest PA. Glucose transport in immortalized rat brain capillary endothelial cells in vitro: transport activity and GLUT1 expression. *Biochim Biophys Acta* 3 1997;1335:135-43
19. Steffan JJ, Dykes SS, Coleman DT, Adams LK, Rogers D, Carroll JL, et al. Supporting a role for the GTPase Rab7 in prostate cancer progression. *PLoS One* 2014;9:e87882
20. Chang J, Xu W, Liu G, Du X, Li X. Downregulation of Rab23 in Prostate Cancer Inhibits Tumor Growth In Vitro and In Vivo. *Oncol Res* 2017;25:241-8

Figure Legends

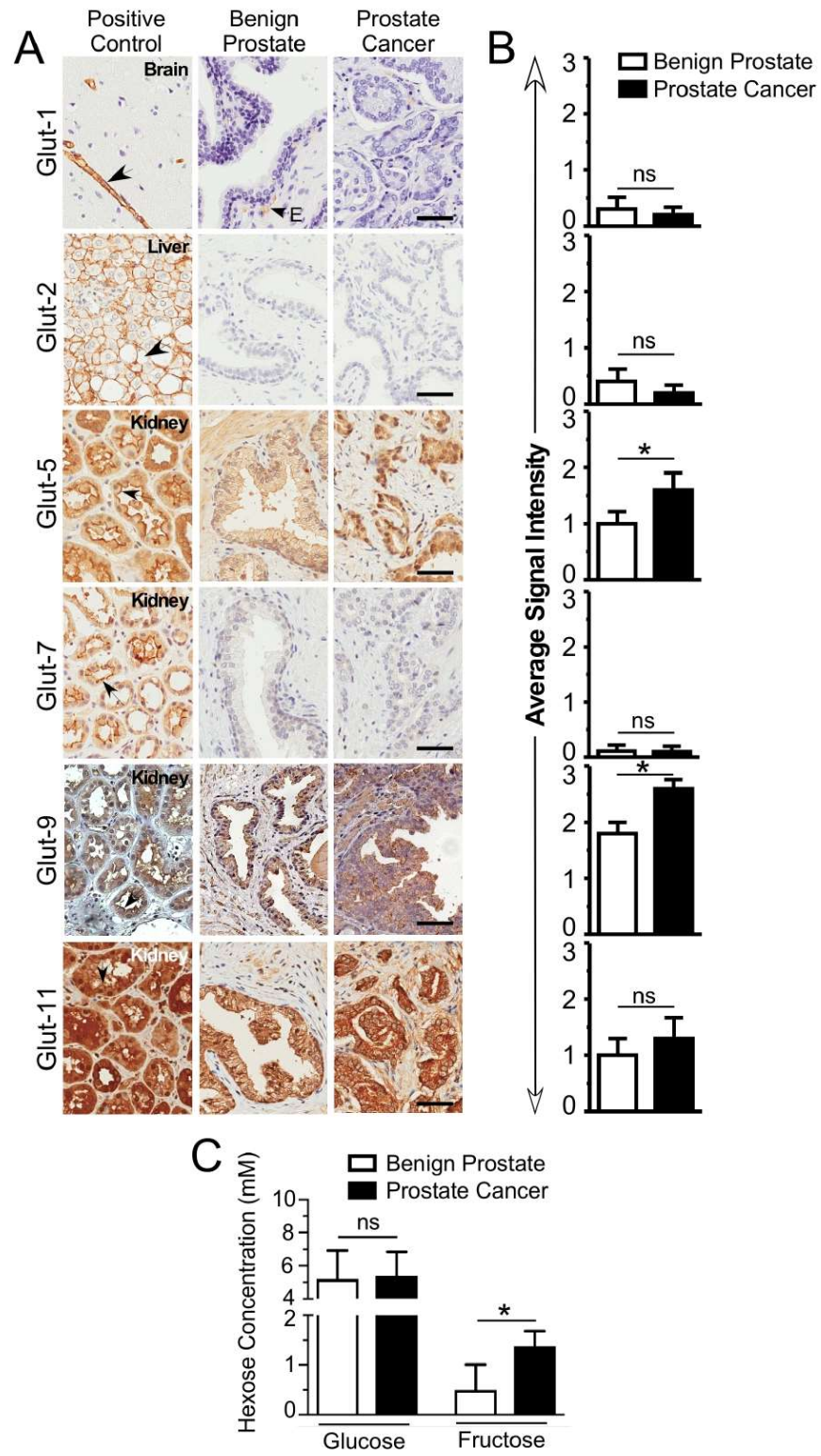
Figure 1. Glut(s) expression in benign and malignant human prostate tissues. (A) Immunohistochemical analyses of Glut(s) in 25 matched clinical specimens of benign and malignant human prostate tissues. Human brain (Glut-1), liver (Glut-2) and kidney (Glut-5, 7, 9 and 11) tissues were utilized as positive controls. Black bars: 50 μ m. (B) Average score of the immunostaining analysis. (C) Glucose and fructose serum determination in benign and PCa patients. ns: not statistically significant. *, $p < 0.05$ (t-test).

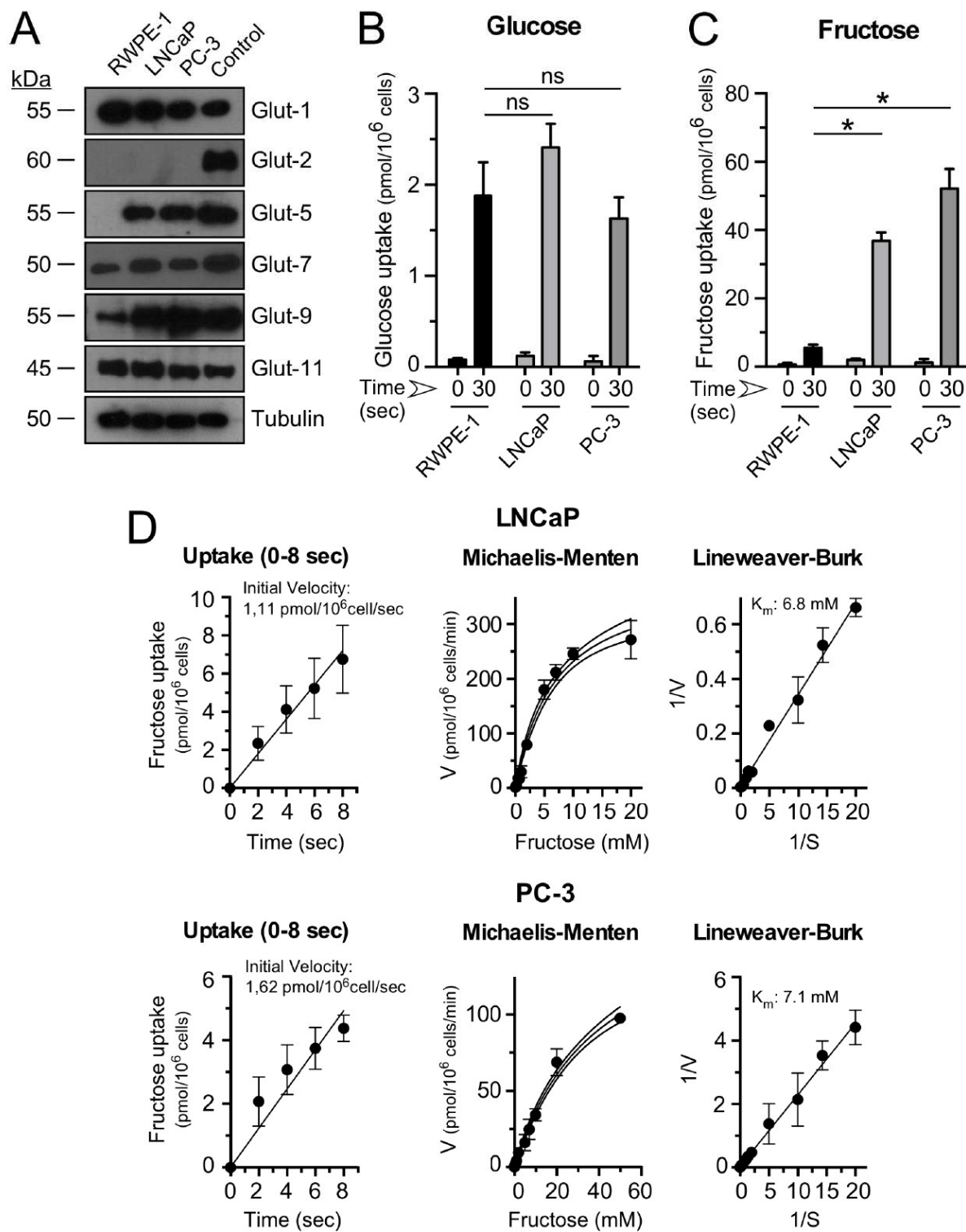
Figure 2. Glut(s) expression and functionality in benign and malignant human prostate cell lines. (A) Western blot analyses for the expression of Glut(s) in benign (RWPE-1) and malignant (LNCaP and PC-3) human prostate cell lines. Erythrocytes membranes (Glut-1), Caco-2 (Glut-2) and HEK-293 (Glut-5, Glut-7, Glut-9 and Glut-11) cells were utilized as positive controls. Tubulin was used as loading control. (B-C) Radiolabeled glucose and fructose uptake analyses at 0 and 30 seconds in RPWE-1, LNCaP and PC-3 cell lines. (D) Uptake (0-8 sec), Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk analyses for the transport of fructose in LNCaP and PC-3 cell lines. $1/V$: 1/transport velocity, $1/S$: 1/substrate concentration, K_m : Michaelis-Menten constant. ns: not statistically significant. *, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

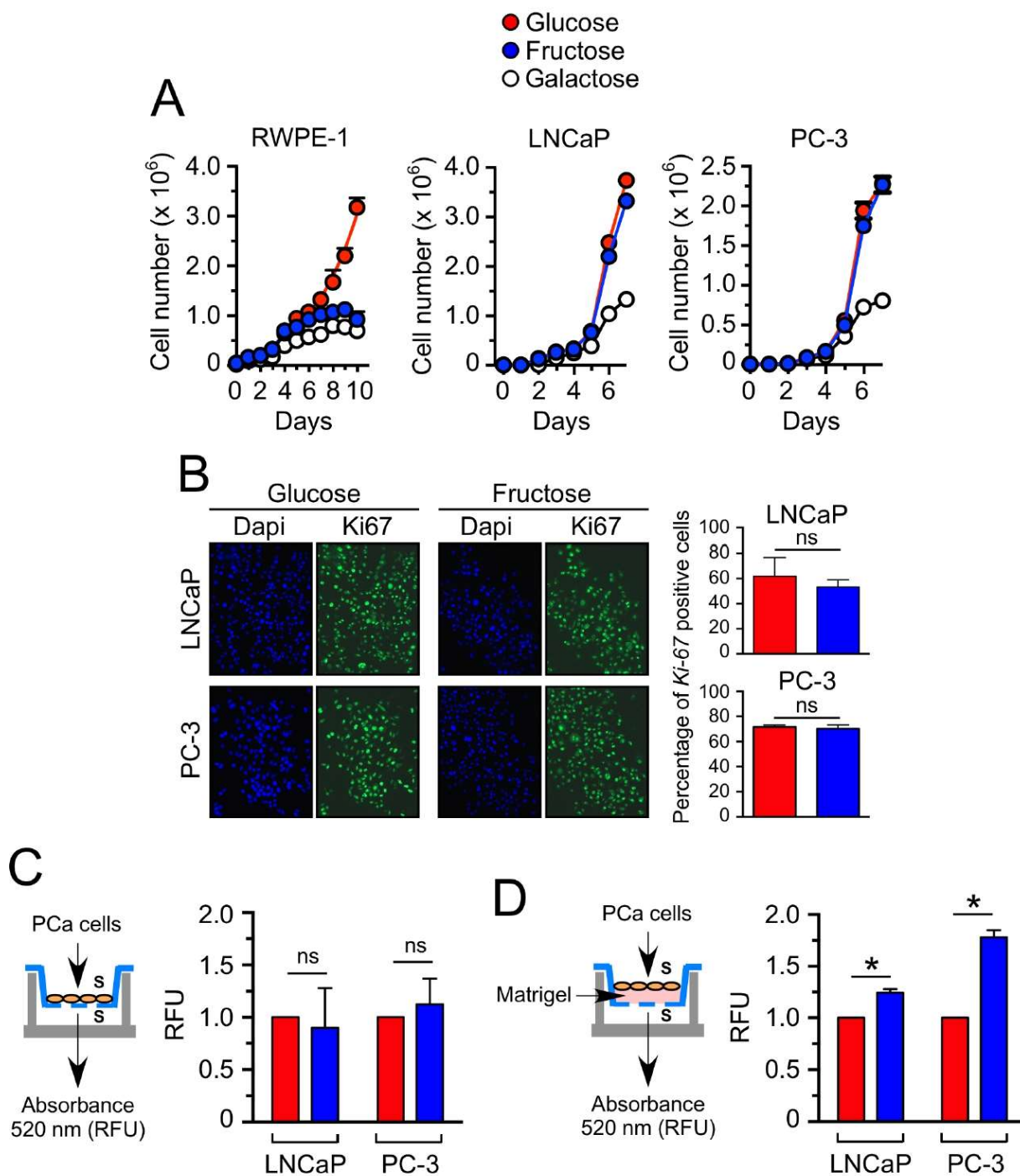
Figure 3. *In vitro* effects of fructose on proliferation, migration and invasion capacities in PCa cells. (A) Growth curves of RWPE-1, LNCaP and PC-3 cell lines exposed to 5 mM fructose, glucose or galactose. (B) Ki67 immunofluorescence in LNCaP and PC-3 cells exposed to 5 mM fructose or glucose (6 days of incubation). Red (glucose) and blue (fructose) bars represent quantitation of the immunostaining analyses in each cell line. (C-D) Migration (C) and invasion (D) capacities were measured using the CytoSelect™ Migration and Invasion Assay. Glucose or fructose treatment (sugars, s) were applied to upper and lower chambers (C-D, schematic representations). The number of migrating/invading cells was quantified in the lower chamber using a fluorescent dye in a Synergy Plate Reader ($P < 0.001$, t-test). ns: not statistically significant (t-test).

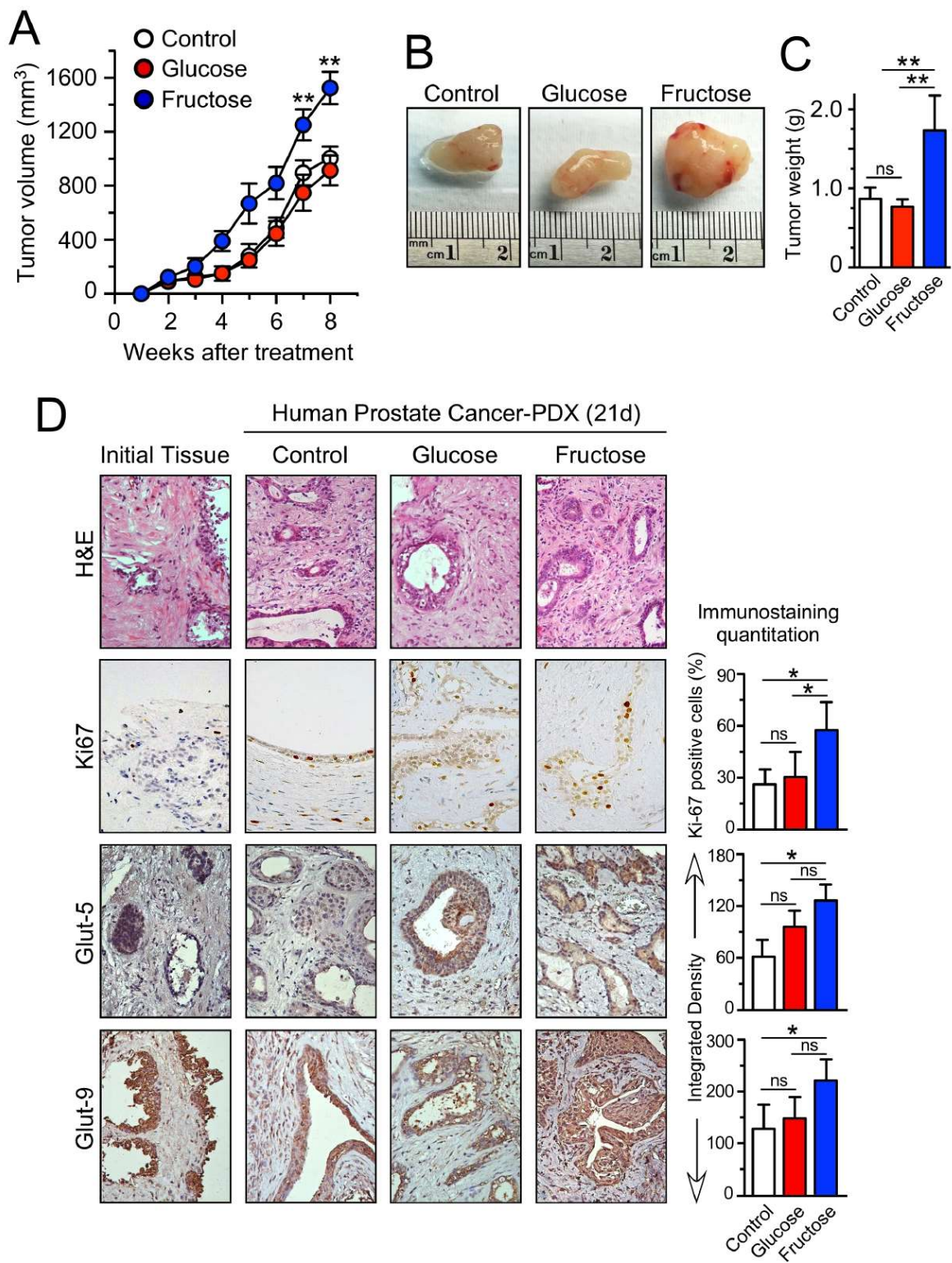
Figure 4. Effect of fructose oral administration on preclinical models of human PCa. (A) Tumor growth of PC-3 cell line-derived xenografts was measured every week for a total of 8 weeks. (B) Representative images of PC-3 cell line-derived xenograft tumors and (C) tumor weight (g, grams) of dissected tumors. (D) Histochemical and immunohistochemical analyses of PDXs (n=3). Representative images of hematoxylin-eosin staining (H&E) and immunohistochemical analyses for Ki67, Glut-5, and Glut-9 in tissue sections from PDXs. Initial tissue obtained from human PCa specimens before transplantation was used as control of prostate tissue architecture. Plots represent immunostaining quantitation of 10 images from each specimen using the ImageJ software. ns: not statistically significant. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$, (two-ways ANOVA).

Carreño *et al.*, Figure 1



Carreño *et al.*, Figure 2

Carreño *et al.*, Figure 3

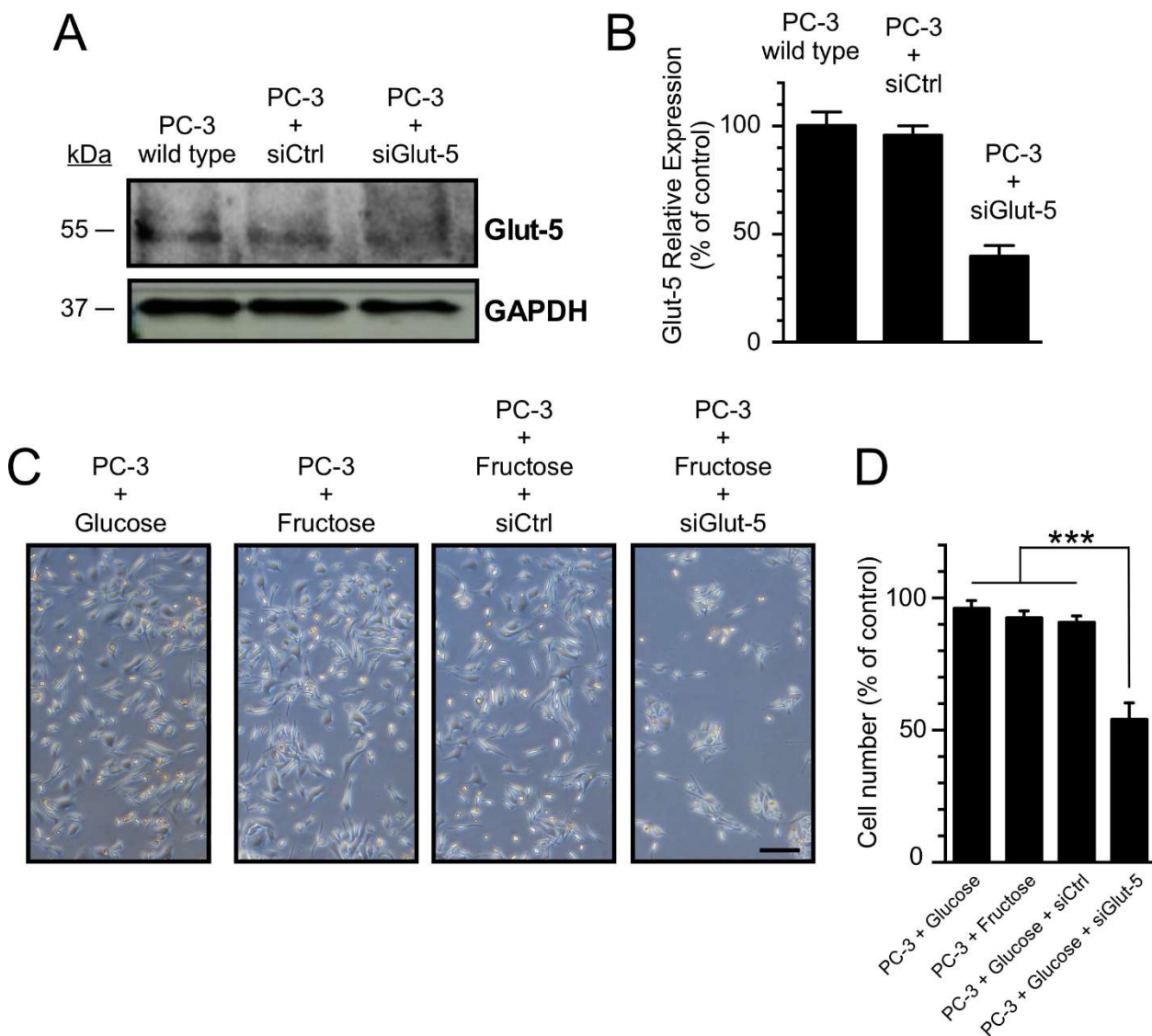
Carreño *et al.*, Figure 4

4.1.3. Material complementario Publicación 2.

Carreño *et al.*, Supplementary Table 1

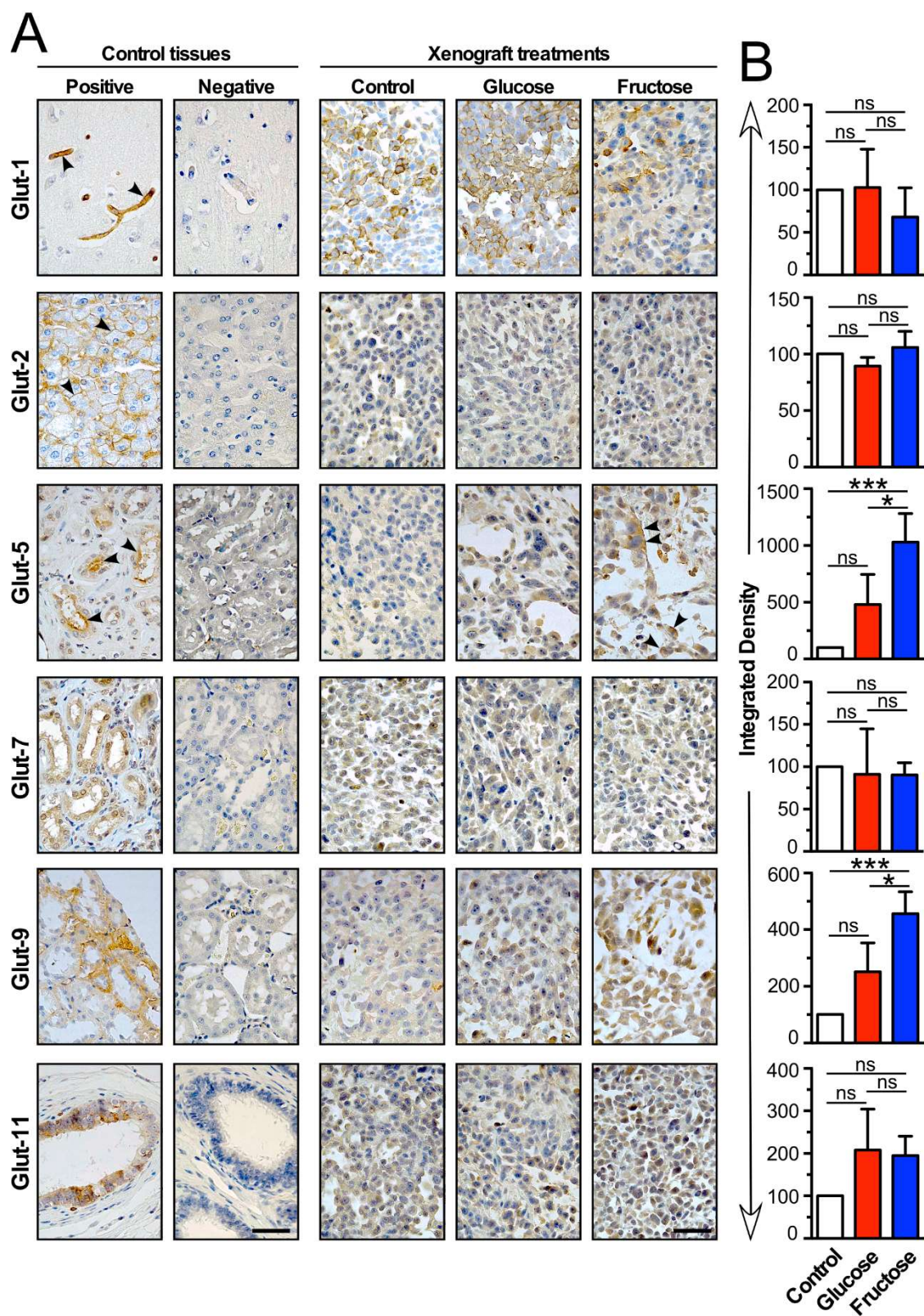
	Benign (n=65)	Cancer (n=65)	<i>p-value</i>
Age	65.8±8.8	62.5±7.5	0.2545
PSA (ng/mL)	9.5±1.5	14.9±2.6	0.0448
Glucose (mM)	5.2±1.7	5.4±1.5	0.6341
Fructose (mM)	0.49±0.5	1.37±0.3	0.0030
Gleason	-	7.34±0.98	

Supplementary Table 1. Biological/clinical parameters (patient age, PSA levels, Gleason score) and glucose and fructose levels in benign and PCa patients. Data is presented as mean ± standard deviation and significant p-value was determined by t-test. PSA and serum fructose levels were significantly higher ($p < 0.05$, t-test) in PCa compared to benign patients. No significant differences were observed in serum glucose levels ($p > 0.05$, t-test).

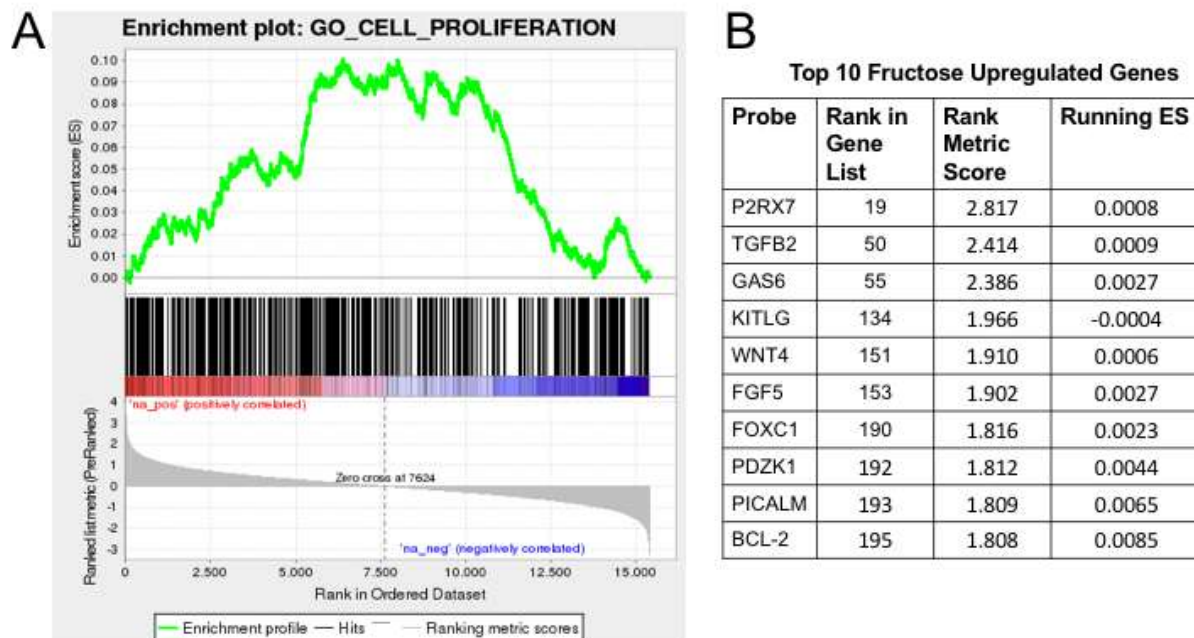
Carreño *et al.*, Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1. Downregulation of Glut-5 expression in PC-3 cells using the siRNA methodology. (A) Western blot analyses for the expression of Glut-5 in PC-3 PCa cells under control condition (wild type) or exposed to a non-targeting siRNA (siCtrl) or a Glut-5-targeting siRNA (siGlut-5). GAPDH was used as a loading control. (B) Quantitation of the western blot data from panel A. Glut-5 expression was normalized to GAPDH expression and represented as percentage of the control condition (wild type). (C) Representative phase contrast images of PC-3 cells exposed to 5 mM glucose (PC-3 + Glucose), 5 mM fructose (PC-3 + Fructose), 5 mM fructose plus a non-targeting siRNA (PC-3 + Fructose + siCtrl) and 5 mM fructose plus a Glut-5-targeting siRNA (PC-3 + Fructose + siGlut-5). Black bar: 40 μ m. (D) The plot represents the number of viable PC-3 cells exposed to the experimental conditions

specified in panel C using the MTS assay. Data is expressed as percentage of the PC-3 + Glucose condition.
***, $p < 0.001$ (two-ways ANOVA).

Carreño *et al.*, Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2. Glut(s) expression PC-3 cell line-derived xenograft model. (A) Immunostaining analysis for the expression of Glut-1, Glut-2, Glut-5, Glut-7, Glut-9 and Glut-11 in tissue sections from PC-3 cell line-derived xenografts. Human brain (Glut-1), liver (Glut-2), kidney (Glut-5, Glut-7, and Glut-9) and epididymis (Glut-11) tissues were utilized as positive controls. Immunohistochemical analyses in the absence of primary antibody provided negative controls (negative). Black bars: 50 μ m. (B) Plots represent immunostaining quantitation in 10 images from each specimen using the Image J software. ns: not statistically significant. *, $p < 0.05$. ***, $p < 0.001$. (two-ways ANOVA).

Carreño *et al.*, Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 3. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) from RNA sequencing data of PC3 cells stimulated with fructose or glucose. A) Enrichment plot: GO_CELL_PROLIFERATION profile of the running ES score and positions of gene set members on the rank ordered list. (B) Top 10 differentially expressed (upregulated) genes of the GO_CELL_PROLIFERATION profile.

4.2. Objetivo 3.

Objetivo 3. Analizar el efecto *in vitro* de la incubación con fructosa sobre parámetros de actividad metabólica y sobre los niveles de expresión de las principales enzimas glucolíticas, de la vía de las Pentosas Fosfato y Lipogénesis de novo en modelos celulares de cáncer prostático humano.

Racional

El estudio del efecto de fructosa en distintos modelos de cáncer ha mostrado que su captación y posterior metabolización varía de un tipo tumoral a otro. Por ejemplo, mientras en células de carcinoma hepático se promueve su metabolización en la vía de la lipogénesis de novo, en cáncer de páncreas esta es utilizada preferentemente en la vía de las pentosas fosfato. En general, se ha reportado que la utilización de fructosa por parte de estas células puede alterar distintos equilibrios como la de generación/degradación de ATP o de lactato. Por otro lado, se ha reportado que también influye en distintos actores moleculares como enzimas, cofactores o receptores que influyen en promover su metabolismo y potenciar factores de agresividad en estas células. Dado que la información respecto a su efecto en las células de CaP es desconocido, hemos decidido analizar el efecto agudo que tiene la incubación con fructosa sobre los niveles de ATP intracelular y lactato intracelular, así como analizar si existe algún efecto sobre los niveles de expresión de genes asociados a algunas enzimas claves del metabolismo energético como hexoquinasa-2 (HK-2, metaboliza el paso de glucosa a glucosa-6-fosfato), cetohecoquinasa-2 (KHK-2, metaboliza el paso de fructosa a fructosa-1-fosfato), lactato deshidrogenasa (LDHA, cataliza el paso de piruvato a L-lactato), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, cataliza el paso de glucosa-6-fosfato a 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona, primer paso de la vía oxidativa de la PPP), aconitasa 2 (ACO2, que cataliza el paso de citrato a isocitrato en el TCA y tiene un rol

clave en la carcinogénesis de lesiones HGPIN a células de CaP) y la sintasa de ácidos grasos (FASN; cuya función principal es la de sintetizar palmitato y malonil-CoA en la vía de síntesis de ácidos grasos) (Ameer *et al.*, 2014; Boroughs y DeBerardinis, 2015; Stincone *et al.*, 2015; Pavlova y Thompson, 2016; Cutruzzolà *et al.*, 2017). Los resultados de estos análisis nos ayudarán a comprender de qué manera el efecto de la incorporación de fructosa al metabolismo de las células de CaP altera su metabolismo respecto a glucosa, así como proveer datos que ayuden a dilucidar actores moleculares que median los efectos biológicos de fructosa en células de CaP descritos en el punto 4.1.2 de este capítulo.

4.2.1. Metodología.

- **Cultivo celular**

Todas las líneas celulares de CaP, LNCaP (andrógeno-dependiente), DU145 y PC3 (andrógeno-independiente), y la línea de células prostáticas benignas RWPE-1 fueron obtenidas desde la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés) y usados hasta un número de pasajes no mayor a 20. Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y cultivadas en medio RPMI1640 (Gibco-Life Technologies) suplementadas con 10% de suero fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 1nM DHT (para células LNCaP) y 1% de penicilina/estreptomicina. La presencia de micoplasmas en todas las líneas celulares fue analizada cada 2 semanas mediante un kit EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries).

- **Diseño Experimental Objetivo 3**

Para determinar el efecto de fructosa en los niveles de ATP intracelular, lactato intracelular (LNCaP y PC3) y niveles de expresión de enzimas metabólicas, se realizó el siguiente esquema de incubación ilustrado en la Fig.1. Brevemente, 20.000 células RWPE-1 y 10.000 células LNCaP, DU145 o PC3 fueron sembradas en placas de 6 pocillos utilizando el medio de cultivo RPMI1640 (Gibco-Life Technologies), que contiene 11mM de glucosa. Al alcanzar una confluencia del 50-60%, fueron sometidas a incubación durante 24hrs con medio RPMI1640-GluFree (sin glucosa; Gibco-Life Technologies), pero al que se le adicionó 5mM glucosa y 1nM DHT; esta incubación se definió como *t₀*. Luego, todas las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con medio RPMI1640-GluFree, 1nM DHT con 5mM glucosa o fructosa y según correspondiese, se extrajeron las respectivas muestras de ATP, lactato o mRNA total a

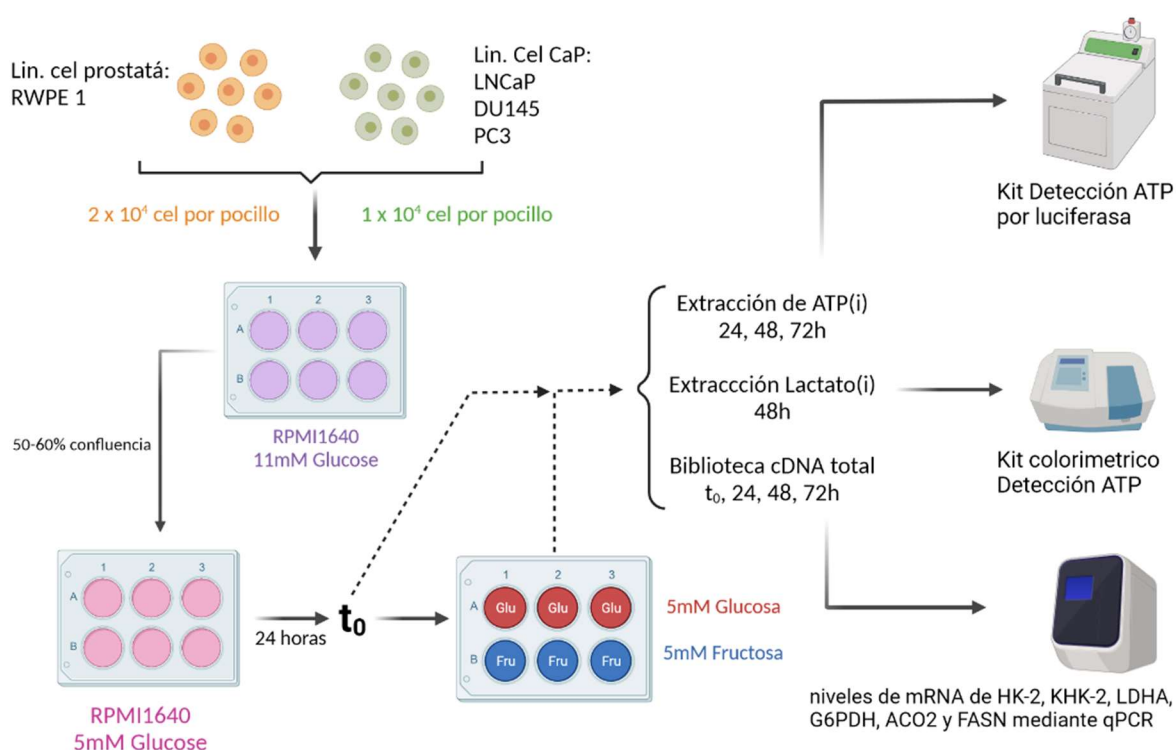


Figura 2. Esquema de Diseño Experimental usado para el Objetivo 3.

Para determinar el efecto de la incubación de fructosa con respecto a glucosa en células de CaP en el tiempo, se diseñó el siguiente procedimiento experimental. Brevemente, células RWPE-1, LNCaP, DU145 o PC3 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar un 50-60% de confluencia. Luego fueron sometidas a una pre-incubación de 5mM de glucosa por 24 horas, siendo el punto final de esta pre-incubación denominada como t₀ (todas las comparaciones se realizan respecto a este punto). Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y sometidas a 24, 48 o 72 horas de incubación con glucosa o fructosa 5mM. En cada punto a analizar se extrajo ATP (intracel.) (RWPE-1, LNCaP, DU145 y PC3), Lactato (intracel., LNCaP y PC3) y mRNA total (LNCaP, DU145 y PC3).

las 24, 48 o 72 horas, realizando un cambio de medio a las 48 horas.

- **Determinación de niveles de ATP intracelular**

Se determinaron los niveles de ATP intracelulares mediante el uso de kit luminiscente ENLITEN ATP Assay (Promega). Células incubadas en t_0 , y a las 24, 48 y 72 horas de incubación, fueron lavadas con PBS e incubadas con una solución de lisis conteniendo Tritón X-100 al 0,5%, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA durante 30 minutos en hielo. Luego de la remoción del debris celular, se calculó la concentración de proteínas mediante método de Lowry y 10 μ L del lisado celular fueron utilizados para la medición de ATP según instrucciones del fabricante en un lumimetro Luminoskan Ascent 2.5 (Thermo Labsystems). Los niveles de ATP fueron calculados utilizando un control interno y la data fue normalizada en función del total de proteínas como concentración de ATP (nM) por μ g de proteínas totales.

- **Ensayo Lactato intracelular**

Para determinar los niveles de lactato intracelular, se utilizó un kit L-Lactate Assay Kit (ab65330, abcam) según las instrucciones del fabricante. Se recolectaron 2 x 10⁶ células LNCaP y PC3 tanto en tiempo 0hrs (t_0) como luego de 48hrs con glucosa 5mM o fructosa 5mM. Luego, fueron lavadas con PBS frío, y centrifugadas a 1.800 rpm por 6 minutos, y posteriormente el pellet fue resuspendido en 200 μ L de buffer de ensayo del kit a 4°C y lisado utilizando una micropipeta. Finalmente, se centrifugaron por 5 minutos a 13.000 x g a 4°C y el sobrenadante transferido a un tubo limpio. Las proteínas en las muestras fueron eliminadas mediante precipitación con ácido perclórico (HClO₄), agregándolo a cada muestra hasta obtener una concentración de 1M e incubando por 5 minutos en hielo, seguido por una centrifugación a 13.000 x g por 2 minutos a 4°C y transferencia del sobrenadante a un tubo limpio. Se precipitó

el exceso de HClO_4 agregando hidróxido de potasio 2M (KOH) frío hasta que este igualara el 34% del volumen del sobrenadante, neutralizando la muestra. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a $13.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante recolectado para análisis. En una placa de 96 pocillos, se agregó $50\mu\text{l}$ de muestra o estándar y $50\mu\text{l}$ de mix de reacción, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se utilizó un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek) midiendo la densidad óptica a 570nm . Los valores obtenidos fueron transformados a nmoles de lactato utilizando una curva estándar, transformadas a μg (peso molecular lactato: $90,08 \text{ g/mol}$) y normalizados por μg de proteínas totales de células LNCaP y PC3 cultivadas en paralelo a las analizadas y que fueron sometidas al mismo diseño experimental.

- **Diseño de partidores qPCR**

Para el análisis de expresión de mRNA de enzimas metabólicas, se diseñaron partidores específicos para ser utilizados en qPCR que cumplieran las siguientes características: Capaces de reconocer todas las variantes de splicing alojadas en la base de datos de nucleótidos de la NCBI donde correspondiese, cuyo producto de PCR no fuera menor a 80 ni mayor a 200 pares de bases, cuyo %GC no sea mayor al 60% y cuya temperatura de melting (T_M) no fuera distinta a un valor de $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Las enzimas para analizar (y su respectivo número de ascenso de la secuencia nucleotídica utilizada) fueron: Hexoquinasa 2 (HK-2; NM_000189.4), Cetohehexoquinasa C (KHK-2; NM_000221.2), Lactato Deshidrogenasa A (LDHA; NM_001165414.1), Aconitasa 2 (ACO-2; NM_001098.2), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; NM_001042351.2) y Sintasa de ácidos grasos (FASN; NM_004104.4). Los partidores fueron diseñados utilizando la herramienta PrimerBLAST del sitio de la NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) bajo criterios definidos previamente. Los partidores definidos fueron enviados a síntesis en IDT (Integrated DNA Technologies, Corea), resuspendidos en agua libre de nucleasas hasta alcanzar la concentración de 100nM y almacenados a -80°C hasta su uso. Posterior a este se determinó la eficiencia de estos partidores en PCR-tiempo real, cuyos datos se pueden revisar en la Tabla N° 2.

- **Análisis de niveles de mRNA mediante qPCRs**

Se extrajo el RNA total de las células LNCaP, DU145 y PC3 en condiciones a las 0, 24, 48 y 72 horas de incubación con fructosa o glucosa 5mM, utilizando un kit de extracción RNAzol (Sigma). Las extracciones de RNA total fueron cuantificadas en un lector multiplacas Epoch 2 (Biotek) y convertidas a cDNA total mediante un kit la retrotranscripción reversa MMLV (Promega). Finalmente, se evaluaron los niveles relativos de las enzimas seleccionadas utilizando los partidores previamente diseñados, en un equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher). Los niveles fueron normalizados utilizando beta-actina como gen housekeeping para los niveles de mRNA en LNCaP y DU145, mientras que para PC3 se usó la expresión del gen ribosomal 18S. Los niveles relativos de expresión fueron calculados utilizando el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

- **Estadística**

Todos los datos fueron recolectados mediante planillas Excel y los análisis estadísticos fueron realizados en el software Graphad Prism 8. Los resultados se graficaron como el promedio de 3 réplicas biológicas $\pm$ desviación estándar o como datos individuales, mientras que las comparaciones entre grupos experimentales de una misma línea celular se realizaron midiendo el efecto de glucosa o fructosa a 24, 48 o 72 horas sobre 0 horas mediante análisis de

TABLA N°2

Secuencias de partidores diseñados para análisis de expresión de mRNA por qPCR de enzimas metabólicas.

Enzima	Nombre	Tipo	Secuencia	Eficiencia
Hexoquinasa 2	HK-2	Forward	CCCTGAGGACATCATGCGAG	101,40%
		Reverse	GGTCCATGAGACCAGGAAACT	
Cetohexoquinasa C	KHK-2	Forward	CCCTAAGGAGGACTCGGAGA	90,70%
		Reverse	GTAGGTCCACAGAATAGCGGC	
Lactato Deshidrogenasa A	LDHA	Forward	GCACCACTGCCAATGCTGTA	98,80%
		Reverse	CAGTGAAGGAGCCAGGAAGTT	
Aconitasa 2	Aco2	Forward	CTTTGAGCCCAACGAGTACA	108,70%
		Reverse	CAGGTACGACTTGCCTCGC	
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6PDH	Forward	AGAGAAGTCTGAGTCCGCCAG	103,50%
		Reverse	GTATCCGACTGATGGAAGGCA	
Sintasa de Ácidos Grasos	FASN	Forward	TATGAAGCCATCGTGGACGG	93%
		Reverse	GAAGAAGGAGAGCCGGTTGG	

varianza multifactorial (ANOVA) y prueba post hoc de Dunnet en resultados de ATP y Tukey en resultados de lactato y qPCR. En los casos donde el análisis con ANOVA multifactorial demostrara interacción entre las variables de tiempo y tratamiento, se simplificó el modelo experimental analizando el efecto de los tratamientos en el tiempo por separado mediante ANOVA simple y prueba post hoc de Tukey. Para todos los análisis estadísticos, se consideró como diferencia estadísticamente significativa a aquellos valores de $P < 0,05$.

4.2.2. La incubación con glucosa o fructosa 5mM en líneas celulares de CaP incrementan los niveles de ATP intracelular en el tiempo, pero bajo un mecanismo dependiente del tipo celular y el tipo de hexosa.

Se midieron los niveles de ATP intracelular (ATPi) en líneas celulares de próstata benigna (RWPE-1; Fig.3 A), de CaP andrógeno dependiente (LNCaP; Fig.3 B) y CaP andrógeno independiente (DU145 y PC3; Fig.3 C y D respectivamente) luego de la incubación con 5mM glucosa o fructosa por 24, 48 y 72 horas. Se analizaron los niveles de ATPi mediante ANOVA multifactorial en cada línea celular por separado, comparando los niveles de ATPi por unidad de tiempo y por tratamiento respecto a sus niveles basales (t_0). Dicho análisis reportó que en las células RWPE-1 (Fig.3 A) existe una influencia significativa del tiempo sobre los niveles de ATPi (valor-P: 0,0021) pero no del tipo de tratamiento (valor-P: 0,4702), lo que se comprueba al comparar los niveles de ATPi entre tratamientos (glucosa vs. fructosa) a las 72 horas de incubación, en donde no se encontraron diferencias significativas entre dichos niveles (Fig.3 A, línea punteada roja). Al comparar el efecto de los tratamientos por separado en el tiempo, solo se encontró que el tratamiento de 72 horas con fructosa 5mM incrementa en un 63% los niveles de ATPi con respecto a los niveles basales. Estos datos sugieren que al tratar células RWPE-1 con glucosa o fructosa 5mM, el tipo de hexosa utilizado no influye significativamente sobre los niveles de ATPi, pero exposiciones mayores a 72 horas con fructosa podrían exhibir un aumento en los niveles de ATPi con respecto a su nivel basal a tiempo 0hrs.

En las líneas celulares de CaP (Fig.3 B, C y D), el análisis por ANOVA multifactorial reportó que ambas variables (tiempo de incubación y tipo de hexosa) influyen significativamente sobre los niveles de ATPi. Al no ser posible diferenciar en que proporción

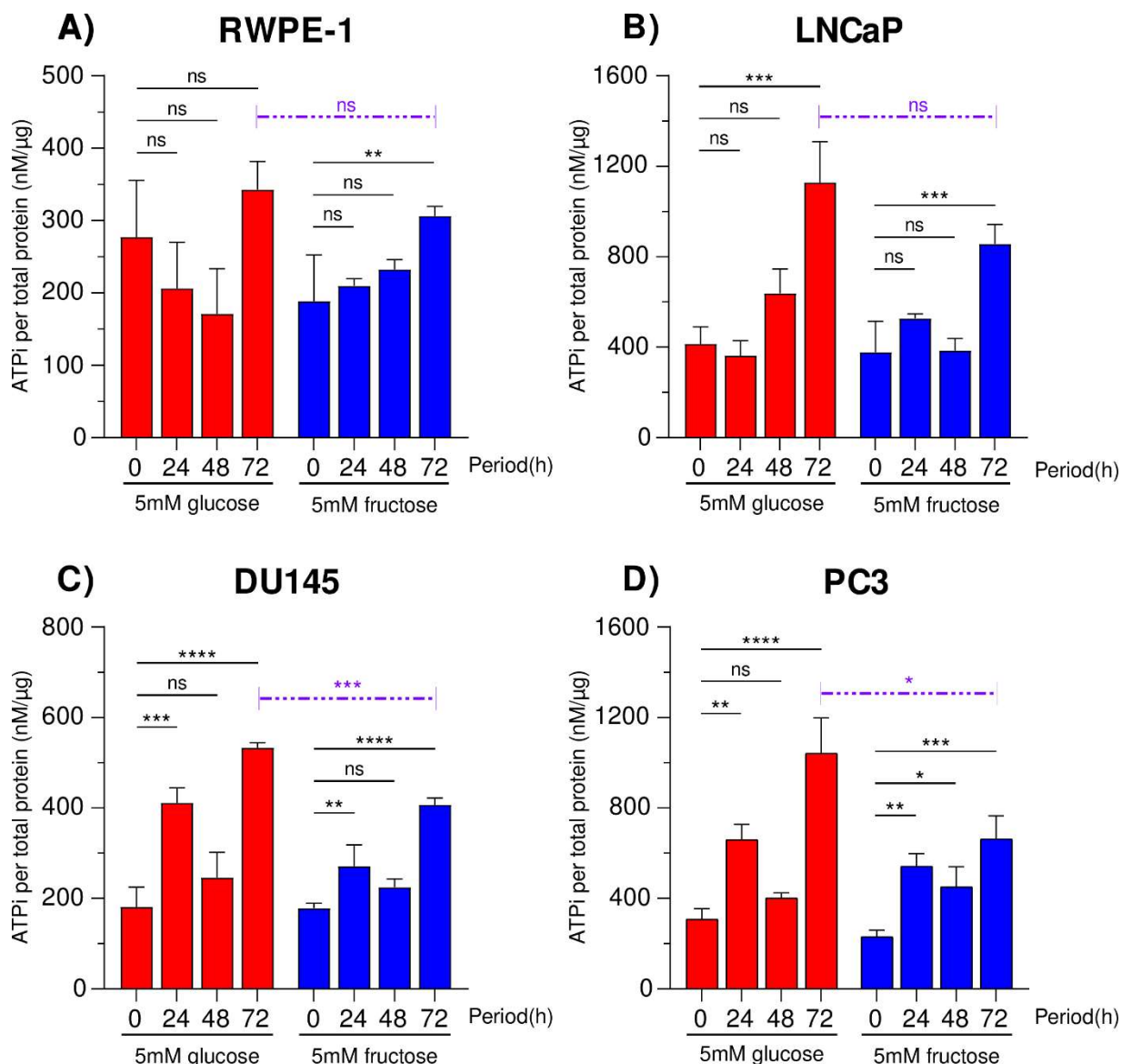


Figura 3. Niveles de ATP intracelular en células RWPE-1 (A), LNCaP (B), DU145 (C) y PC3 (D) a 0, 24, 48 y 72 horas de incubación con glucosa o fructosa.

Las barras representan los niveles de ATP_i de células benignas y de CaP incubadas en 5mM glucosa (barras rojas) y 5mM fructosa (barras azules) por 0, 24, 48 y 72 horas. Los niveles de ATP_i fueron normalizados respecto a los μg proteínas totales en cada grupo experimental. Las barras representan la media de 3n biológico, el error graficado es desviación estándar. Se comparó mediante t-test el nivel promedio de ATP_i entre tratamientos a las 0 y a las 72 horas en cada línea celular, sin encontrar diferencias significativas a tiempo inicial (glu₀ vs fru₀; RWPE-1, p-valor: 0,2041; LNCaP, p-valor: 0,7035; DU145, p-valor: 0,9371; PC3, p-valor:

0,0652) pero con diferencias entre medias a las 72 horas en DU145 y PC3 (línea segmentada violeta). Posteriormente, se realizaron análisis estadísticos mediante ANOVA simple comparando el promedio de ATPi en cada intervalo de tiempo con respecto al basal (0 vs 24, 48 y 72 horas), realizando dicho análisis por separado en cada tratamiento y línea celular. Las diferencias significativas entre cada nivel evaluado se determinaron mediante prueba post-hoc de Dunnett, (“ns”: no significativo; *: p-valor < 0,05; ***: p-valor < 0,001; ****: p-valor < 0,0001).

ambas variables influyen sobre la respuesta del modelo experimental (ATPi) debido a la naturaleza de la ANOVA multifactorial, se analizó cada tratamiento por separado mediante ANOVA simple, encontrando diferencias significativas en algunos tramos respecto al nivel basal (t_0). En LNCaP (Fig.3 B), se reportaron aumentos significativos de los niveles de ATPi al tratar por 72 horas con glucosa 5mM (2,73 veces el inicial) o fructosa 5mM (2,28 veces el inicial), pero no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de ATPi entre glucosa o fructosa las 72 horas de tratamiento (Fig. 3 B; línea punteada roja; valor-P: 0,0782). Estos datos indican que la incubación de células LNCaP con glucosa o fructosa 5mM incrementan los niveles de ATPi a las 72 horas de manera independiente al tipo hexosa utilizado.

Al analizar los niveles de ATPi en las células CaP andrógeno-independientes DU145 (Fig.3 C) y PC3 (Fig.3 D) se encontraron aumentos significativos en casi todas las unidades de tiempo analizadas respecto a t_0 , siendo los mayores obtenidos a las 72 horas de incubación con glucosa o fructosa 5mM en ambas líneas celulares. En DU145, los niveles de ATPi se incrementaron en 2,95 veces con glucosa y en 2,28 veces con fructosa, siendo el aumento con glucosa significativamente mayor que con fructosa (Fig. 3C, línea roja punteada; valor-P: 0,0003). Es importante destacar que no se exhibieron diferencias significativas al comparar los niveles basales de ATPi entre tratamientos en DU145 (valor-P: 0,9371). Mismo fenómeno se puede apreciar al analizar los niveles de ATPi en células PC3, donde el tratamiento con glucosa 5mM a las 72 horas incrementó los niveles de esta molécula en 3,38 veces el nivel basal, mientras el tratamiento con fructosa 5mM logró aumentarlo en 2,89 veces. Nuevamente, al comparar los niveles de ATPi a las 72 horas entre tratamientos se reveló que los niveles con glucosa 5mM son mayores significativamente a los de fructosa (Fig. 3D, línea roja punteada: valor-P: 0,0251), mientras que los niveles basales entre tratamientos no se obtuvieron

diferencias significativas (valor-P: 0,0652). Estos datos sugieren que ambas hexosas inciden significativamente en aumentar los niveles de ATPi en líneas celulares de CaP, pero no en células de próstata benigna (RWPE-1), al menos dentro del margen de tiempo analizado en este experimento, (72 horas). Dicho incremento se obtendrían bajo mecanismos que son dependientes de; 1) el tipo celular, debido a que el incremento en LNCaP no discierne entre glucosa o fructosa como si ocurre en DU145 o PC3, 2) del tiempo, ya que todos los niveles de ATPi a 72 horas de incubación fueron significativamente mayores a los basales, al menos en las líneas celulares de CaP (LNCaP, DU145 y PC3) y 3) del tipo de hexosa al que estas células son expuestas, al observar que los niveles de ATPi son menores a las 72 horas de incubación con fructosa versus glucosa en comparación a sus respectivos niveles basales.

4.2.3. Los niveles de lactato intracelular disminuyen significativamente en células de CaP al incubar con fructosa por 48 horas respecto a glucosa.

Posteriormente se midieron los niveles de lactato intracelular al incubar células LNCaP y PC3 por 48 horas con glucosa o fructosa 5mM (Fig.4). Los valores obtenidos fueron comparados utilizando un análisis de ANOVA multifactorial en donde se evaluó la influencia del tratamiento y del tiempo de incubación sobre los niveles de lactato intracelular respecto al inicial (t_0). Tanto en LNCaP como en PC3, el análisis estadístico arrojó que existe una influencia significativa del tipo de hexosa utilizado (valor-P (LNCaP): 0,0034; valor-P (PC3) < 0,0001), pero no del periodo de incubación sobre la respuesta del modelo experimental (niveles de lactato intracelular). En LNCaP, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de lactato entre el tratamiento con glucosa 5mM (Fig. 4A, barra roja), con respecto al basal (valor-P: 0,4654) pero si se identificó una disminución del 46,97% de dichos niveles al incubar

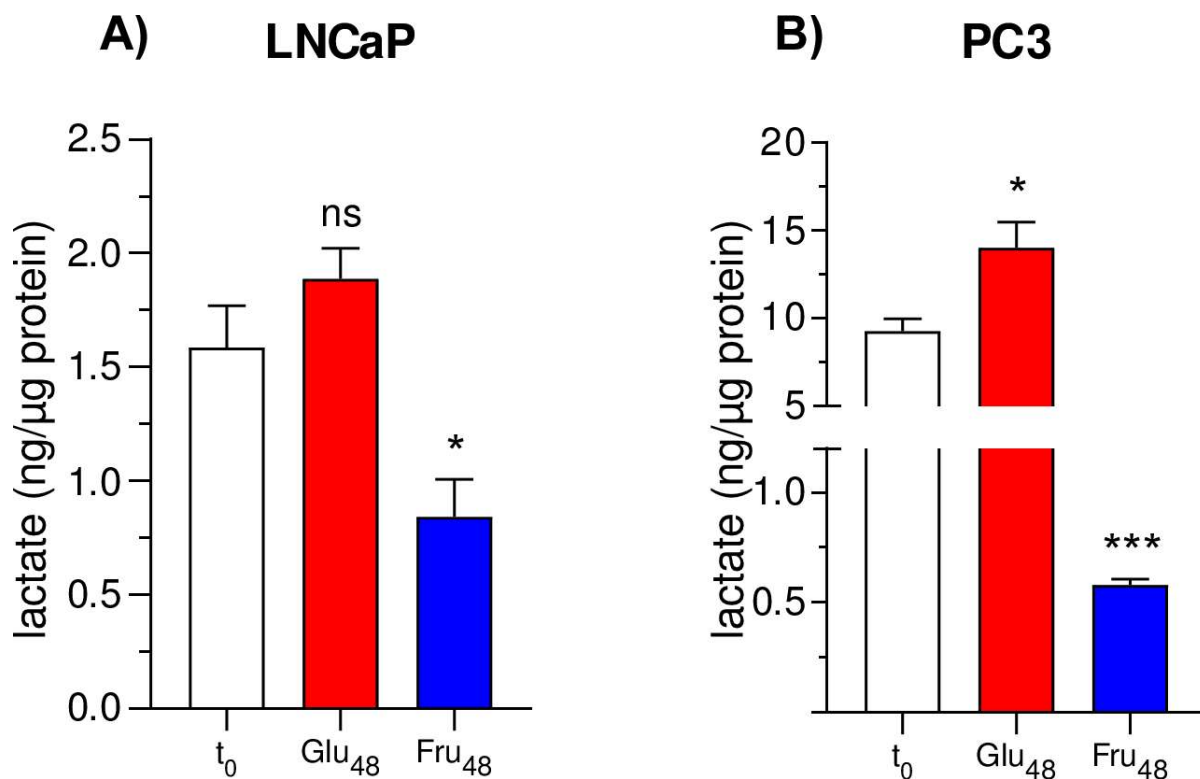


Figura 4. Niveles de lactato intracelular en células LNCaP (A) y PC3 (B) antes y después de incubación con glucosa o fructosa por 48 horas.

Los niveles de lactato se reportan como ng de lactato normalizados por μg proteínas totales en cada cultivo a tiempo inicial (t_0 , 5mM glucosa; blanco), y 48 horas después en 5mM glucosa (Glu₄₈; rojo) o 5mM fructosa (Fru₄₈; azul). Las barras representan la media de 3 réplicas biológicas, la barra de error corresponde a su desviación estándar. Análisis mediante ANOVA multifactorial determinó diferencias significativas en el tratamiento con fructosa respecto a t_0 en ambos casos (“ns”: no significativo; *: valor- $p < 0,05$; ***: valor- $p < 0,001$).

por 48 horas con fructosa 5mM (Fig.4 A, barra azul) respecto al nivel inicial (Fig.4 A, barra blanca; valor-P: 0,0275). Dicha disminución es también significativa respecto a los obtenidos en el tratamiento con glucosa 5mM (Fig.4 A, barra roja; valor-P: 0,0031). Este fenómeno es más dramático al analizar los niveles de lactato intracelular en PC3 (Fig. 4B). Al comparar el efecto del tratamiento con glucosa 5mM (Fig. 4B, barra roja) respecto al basal (Fig. 4B, barra blanca), se observa un aumento significativo del 51,57% del nivel de lactato (valor-P: 0,0357), mientras que el tratamiento con fructosa (Fig. 4B, barra azul) reveló una disminución significativa de dicho nivel en un 93,73% respecto al basal (valor-P: <0,0001), siendo este también significativamente menor al obtenido con glucosa 5mM (valor-P: 0,0006). Es destacable notar que a pesar de que los niveles basales de lactato intracelular son casi 6 veces mayores en PC3 con respecto a LNCaP, la disminución observada al tratar con fructosa 5mM en PC3 cae a niveles comparables a los obtenidos en LNCaP.

En conclusión, la incubación por 48 horas con glucosa 5mM aumenta significativamente los niveles de lactato intracelular en PC3 a diferencia de LNCaP donde no se aprecia una alteración observable. El tiempo de incubación en este experimento no permite inferir una tendencia al aumento o estabilización de los niveles de lactato en LNCaP al incubar con glucosa en tiempos mayores a 48 horas, pero es sugerible que estos niveles no deberían disminuir respecto al basal en mayores unidades de tiempo. Por otro lado, la incubación con fructosa 5mM disminuye significativamente los niveles de lactato intracelular en ambas líneas celulares, siendo este fenómeno mucho más drástico en PC3 que en LNCaP, lo que sugiere que mientras la incubación con glucosa promueve y/o mantiene los niveles de lactato intracelular, posiblemente debido a la fermentación de esta en un metabolismo tipo Warburg hacia la generación de lactato, fructosa es posiblemente metabolizada hacia otras rutas distintas a la

fermentación láctica, evidenciado por una notable disminución de los niveles de lactato intracelular en tan solo 48 horas de incubación, siendo este efecto más notorio en células de CaP más agresivas o altamente proliferativas como PC3.

4.2.4. Incubaciones con glucosa o fructosa 5mM promueven la sobreexpresión relativa de mRNA de distintas enzimas metabólicas en líneas celulares de CaP.

Se midió el efecto de la incubación de 24, 48 y 72 horas con glucosa o fructosa 5mM sobre los niveles relativos de RNA mensajero (mRNA) de las enzimas metabólicas HK-2, KHK-2, LDHA, ACO-2, G6PDH y FASN en líneas celulares de LNCaP, DU145 y PC3 mediante análisis de qPCR utilizando los partidores definidos en la Tabla N^o2 (Fig. 5 y 6). Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA multifactorial para evaluar la influencia del tipo de hexosa y/o del tiempo de incubación con cada tratamiento por enzima y línea celular por separado. En LNCaP, el análisis estadístico reportó que los niveles relativos de mRNA de las enzimas KHK-2 (Fig.5), LDHA (B), Aco2 (C) y G6PDH (D) no se ven afectadas en función del tipo de hexosa o tiempo de incubación expuestos, pero sí se reportó un efecto significativo del tiempo de incubación sobre los niveles de mRNA de las enzimas HK-2 y FASN. Se advirtió un aumento significativo de los niveles de expresión relativa de HK-2 (Fig.6 A) a las 24 horas (2,10 veces) y 48 horas (3.20 veces) de incubación con glucosa 5mM (barras rojas) respecto al nivel basal (t_0). La comparación a 72 horas demostró una importante dispersión de los datos, pero es sugerible que aumentar el número de replicas biológicas o el tiempo de incubación podría permitir observar un aumento o estabilización de los valores relativos de expresión de HK-2 en periodos más largos de tiempo. Por otra parte, no se apreció dicho efecto al incubar con 5mM

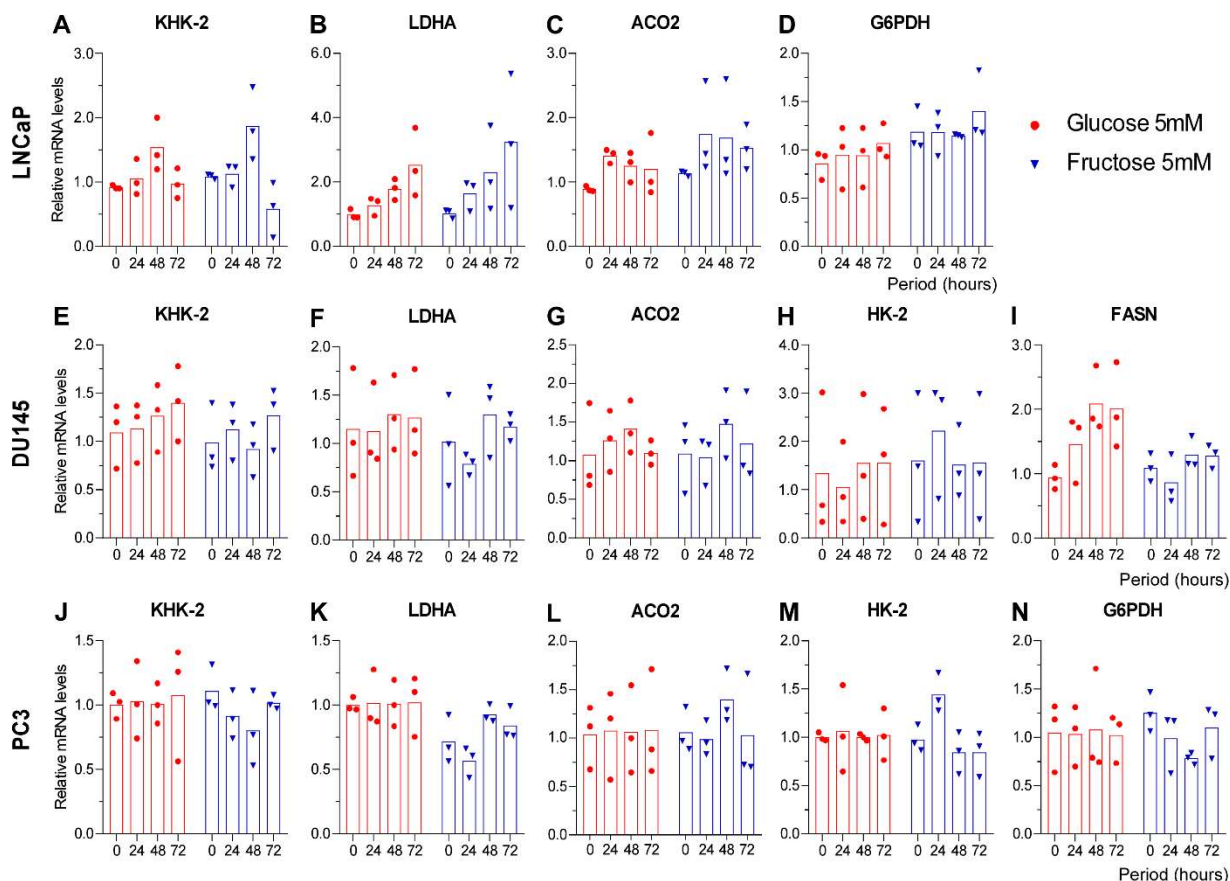


Figura 5. Análisis de niveles de mRNA de enzimas metabólicas en células LNCaP, DU145 y PC3 luego de incubación de 24, 48 y 72 horas con glucosa o fructosa 5mM (sin diferencias significativas).

La expresión de mRNA de las enzimas KHK-2, HK-2, LDHA, ACO2, G6PDH y FASN en células LNCaP, DU145 y PC3 fue medida mediante qPCR, sus valores se reportan como niveles de expresión de mRNA relativo a la expresión de β -actina en LNCaP y DU145, y de 18S en PC3. Se muestran los valores individuales de cada grupo biológico por tratamiento (puntos y triángulos) y su promedio como grupo experimental (3n biológico) se representa por su respectiva barra. Para cada enzima en cada línea celular, se analizó el efecto del tipo de tratamiento (rojo: Glucosa 5mM; azul, fructosa 5mM) en el tiempo (0, 24, 48 y 72 horas), mediante análisis de ANOVA multifactorial. Todos los grupos analizados en esta figura (A – N) no reportaron efectos estadísticos significativos del tipo de tratamiento y del tiempo de incubación sobre los niveles de mRNA de las enzimas analizadas.

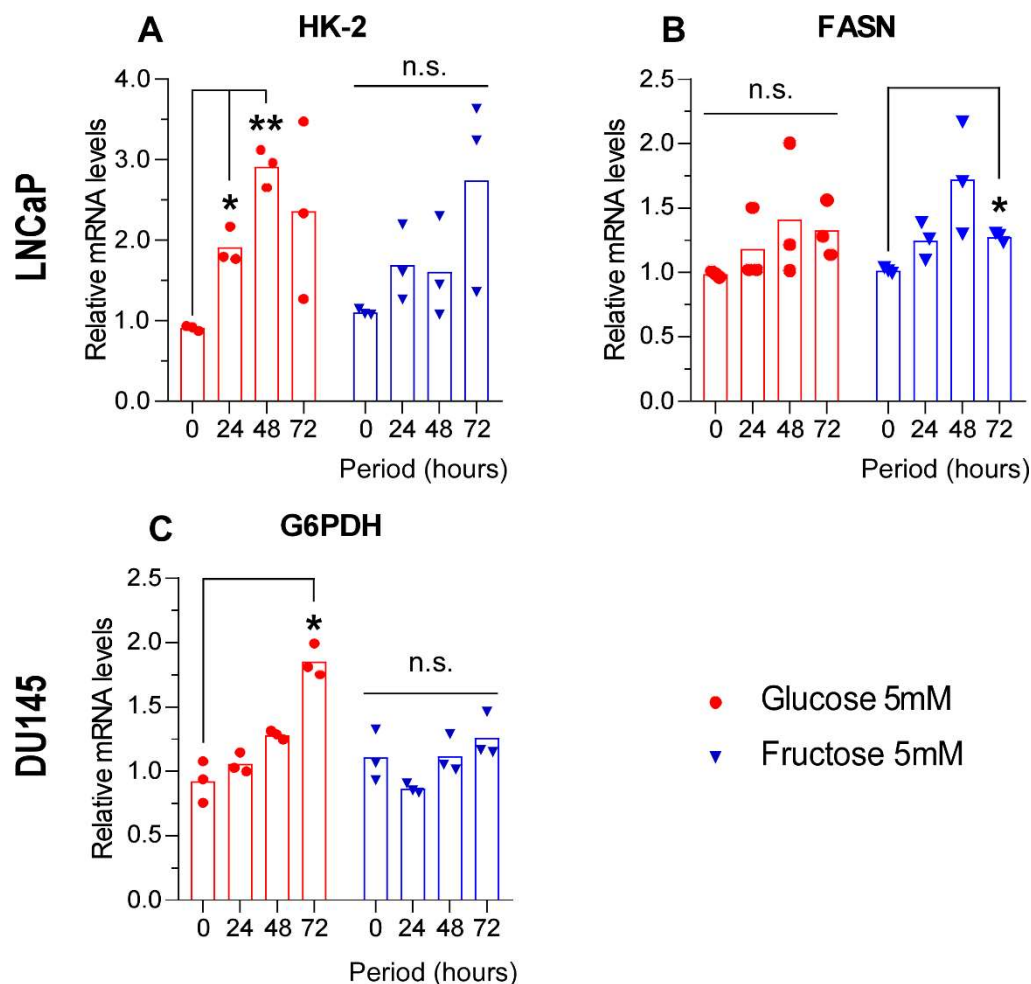


Figura 6. Análisis de niveles de mRNA de enzimas metabólicas en células LNCaP, DU145 y PC3 luego de incubación de 24, 48 y 72 horas con glucosa o fructosa 5mM (con diferencias estadísticas).

La expresión de mRNA de las enzimas HK-2 y FASN en células LNCaP, y de G6PDH en células DU145 fue medida mediante qPCR y sus valores se reportan como niveles de expresión de mRNA relativos al nivel de expresión de β -actina. Se muestran los valores individuales de cada grupo biológico por tratamiento y su promedio como grupo experimental (3n biológico) se representa por su respectiva barra. Para cada enzima en cada línea celular, se analizó el efecto del tipo de tratamiento (círculo rojo: Glucosa 5mM, triángulo azul, Fructosa 5mM) en el tiempo (0, 24, 48 y 72 horas), mediante un análisis de ANOVA multifactorial. Dicho análisis encontró un efecto significativo de los tratamientos en estos grupos encontrando diferencias significativas al comparar cada tiempo con su respectivo t_0 según prueba Post Hoc de Tukey (“ns”: no significativo; *: valor- $p < 0,05$; **: valor- $p < 0,01$).

fructosa (barras azules) en el mismo rango de tiempo. Opuesto es el caso de la enzima FASN (Fig.6 B) en donde se reportó un aumento significativo (de un 25,6% respecto a t_0) de su expresión relativa al incubar con 5mM fructosa por 72 horas, mientras no se encontró algún cambio significativo en los niveles de mRNA de esta enzima al incubar con glucosa 5mM.

El análisis estadístico realizado sobre los niveles de expresión de mRNA de estas enzimas en la línea celular DU145 arrojó un fenómeno similar, al no encontrar efecto significativo del tiempo de incubación y/o el tipo de hexosa utilizado para modificar los niveles de mRNA de las enzimas KHK-2 (Fig.5 E), LDHA (F), Aco2 (G), HK-2 (H) y FASN (I). Si se reportó un efecto tanto del tiempo como del tipo de hexosa sobre los niveles de expresión de G6PDH en DU145. Al no poder dilucidar el aporte de cada variable sobre el nivel de expresión relativa, se realizó un ANOVA simple sobre los niveles de mRNA en función del tiempo de incubación en cada tratamiento por separado. Este análisis reportó un aumento significativo (2,00 veces respecto a t_0) de los niveles de G6PDH al incubar por 72 horas con glucosa 5mM en DU145 (Fig. 6 C, barras rojas). Es apreciable que, aunque no significativos, se observa un aumento constante del valor medio de expresión a 24 y 48 horas. Por otra parte, no se encontraron efectos significativos del tiempo de incubación con fructosa 5mM sobre los niveles de G6PDH en células DU145 (Fig. 6 C, barras azules). Finalmente, el análisis de ANOVA multifactorial en células PC3 no encontró efectos significativos del tipo de hexosa o del tiempo de incubación sobre los niveles de expresión relativa de mRNA de las enzimas KHK-2 (Fig.5 J) LDHA (K), Aco2 (L), HK-2 (M) o G6PDH (N). El efecto de estos tratamientos sobre los niveles de mRNA de FASN no fue evaluado.

Estos datos sugieren que tanto glucosa como fructosa pueden modular los niveles de mRNA de algunas enzimas metabólicas cuyo rol en la vía glucolítica o en vías de biosíntesis las

posiciona como claves para la respuesta de las células de CaP a la exposición a estas hexosas. Dicha respuesta es dependiente de la línea celular analizada y del tratamiento utilizado ya que en ningún caso se observó un cambio significativo del nivel de expresión relativa de mRNA de alguna de las enzimas analizadas en respuesta a ambos tratamientos. En los casos específicos donde si se encontró algún efecto significativo, los cambios fueron reportados como sobreexpresión de las enzimas LNCaP/HK-2 (Fig. 6A) y G6PDH/DU145 (Fig.6 C) en respuesta a la incubación con glucosa 5mM, mientras que la incubación con fructosa 5mM expuso una sobreexpresión los niveles de FASN en LNCaP (Fig. 6B).

5. Discusión

El estudio del metabolismo tumoral ha permitido nivelar las complejas características que las células de cáncer exponen durante su génesis y desarrollo. Por ejemplo, las células tumorales tienden a exacerbar el metabolismo glucolítico para poder satisfacer sus demandas proliferativas, pero dicho incremento debe ir acompañado de un aumento en la capacidad de transporte de glucosa mediada por transportadores como GLUT-1. Del mismo modo, la forma en que glucosa es metabolizada en estas células suele favorecer vías de biosíntesis, generación de lactato y ATP sin oxidación mediante el efecto Warburg o desregulación de vías de señalización como PI3K/Akt/mTOR entre otras características (Vander Heiden *et al.*, 2011; DeBerardinis y Chandel, 2016). Pero no todas las células tumorales responden a este paradigma de la misma manera, y el caso de las células de CaP, es un ejemplo de ello. Nuestro laboratorio previamente había reportado la expresión de transportadores de fructosa, pero no de glucosa, en tejidos prostáticos malignos comparados con benignos (Godoy *et al.*, 2006; Reinicke *et al.*, 2012; Carreño *et al.*, 2019). De los transportadores de fructosa descritos en la literatura, GLUT-5 se ha descrito como un transportador exclusivo de fructosa lo que abre preguntas sobre el putativo rol de esta hexosa, así como de su metabolismo sobre el proceso carcinogénico y de desarrollo temprano del CaP en desmedro de la prácticamente nula sobreexpresión de GLUT-1 y, por ende, baja tasa glucolítica presente en estas células.

En este trabajo de tesis hemos estudiado el posible rol biológico que fructosa puede ejercer sobre la proliferación y/o agresividad tumoral en células de CaP validando primero, la expresión funcional de transportadores de fructosa como GLUT-5, 7, 9 y 11 tanto en especímenes benignos y malignos como en modelos celulares de CaP, segundo, determinando

si fructosa puede modelar la biología de las células de CaP tanto *in vitro* como *in vivo* (Carreño *et al.*, 2021) y tercero, evaluando los efectos de la incubación con fructosa sobre algunos metabolitos y actores moleculares relevantes en el metabolismo tumoral.

5.1. Rol de fructosa en la proliferación de modelos *in vitro* de CaP.

Los resultados de este trabajo muestran que los transportadores GLUT-5 y GLUT-9 se encuentran significativamente sobreexpresados en especímenes clínicos de cáncer prostático comparado con sus respectivas contrapartes benignas, mientras que GLUT-1 fue inmunoquimicamente indetectable corroborando lo previamente descrito (Reinicke *et al.*, 2012). A pesar de que la expresión de GLUT-1 ha sido estudiada por otros autores en especímenes clínicos de CaP, tanto su perfil de expresión como su funcionalidad han mantenido cierta controversia en la literatura. Un estudio de 195 especímenes clínicos de tejidos malignos de CaP mostró que un 47% de ellas presentaba expresión de GLUT-1, pero la inmunotinción en estos casos era principalmente citoplasmática (Carvalho *et al.*, 2011), patrón que ha sido descrito en otros trabajos (Xiao *et al.*, 2018; Gasinska *et al.*, 2020). Aunque la relevancia de la expresión de GLUT-1 intracelular en células de CaP no ha sido estudiada en detalle, los hallazgos recientes pueden explicar en parte la limitada aplicabilidad clínica de métodos de detección basados en el transporte de glucosa como el FDG-PET. Por otra parte, los niveles séricos de fructosa en pacientes con CaP fueron significativamente más altos que pacientes con altos niveles de agresividad tumoral en CaP que aquellos con casos benignos. Aunque este fenómeno también ha sido descrito en pacientes con cáncer pancreático (Hui *et al.*, 2009), la significancia biológica de esta observación no está muy bien comprendida, pero nos sugiere que la relación entre el metabolismo de la fructosa y el desarrollo o progresión del cáncer es más

amplia de lo que se conoce. Trabajos que involucren una perspectiva más amplia del estado metabólico o del tipo de dieta que consumen los pacientes con cáncer puede dar más luces de la forma que las células tumorales se adaptan a metabolitos distintos de la glucosa.

Posteriormente se analizó la funcionalidad del transporte de fructosa en modelos celulares de CaP, en donde un perfil de expresión similar al encontrado en los especímenes clínicos fue detectado en líneas celulares benignas (RWPE-1) y malignas (LNCaP y PC3) de CaP. En resumen, los niveles de GLUT-5 y 9 se encontraron sobreexpresados en células LNCaP y PC3 (malignas) comparado con células RWPE-1 (benigna), mientras que GLUT-2 que no fue detectado en ningún tipo celular estudiado. Por otro lado, la expresión de GLUT-1 fue detectada ampliamente en todas las células. Aunque contradictorio a primera vista, este es un resultado esperado, considerando que el proceso de inmortalización de las líneas celulares es un proceso que intrínsecamente está asociado a la sobreexpresión de este transportador (Regina, Roux y Revest, 1997). Esto sumado a las condiciones de cultivo en donde las cantidades de glucosa alcanzan niveles muy superiores al fisiológico (aproximadamente 11mM), puede generar una presión evolutiva hacia la selección de clones con expresión favorable de GLUT-1, lo que explicaría este patrón de expresión de GLUT-1 en las líneas celulares de CaP comparado lo estudiado en epitelio de tejido prostático humano.

Los ensayos básicos de transporte usando fructosa y glucosa marcada radioactivamente reportaron una capacidad de captación de fructosa 10 veces mayor en las líneas celulares malignas de CaP comparada con células benignas. Posteriormente, se realizó un ensayo de Michaelis-Menten y un ensayo de curso temporal de captación en células PC3 y LNCaP que permitió identificar un solo componente cinético con una K_m cercana a 7mmol/L, siendo esta

completamente compatibles con la K_m descrita para GLUT-5 (6mmol/L), lo que nos sugiere fuertemente que es este transportador es el mayor contribuyente funcional en la captación de fructosa en células de CaP y, por ende, sustenta la hipótesis de un rol del transporte de fructosa y su consecuente metabolismo en células tumorales de CaP. Interesantemente, los análisis *in vitro* demostraron que tanto glucosa como fructosa pueden estimular la proliferación sostenida de células LNCaP y PC3 en el tiempo a niveles comparables con glucosa, mientras que los niveles de Ki-67, un marcador de proliferación celular no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. En conjunto, estos datos nos sugieren que estas células tienen una capacidad intrínseca de captar fructosa y utilizarla para sostener sus altas tasas de proliferación celular. Considerando que la captación de glucosa es artificialmente alta debido a las características propia de las líneas celulares inmortalizadas, el hecho que la proliferación sostenida por fructosa pueda equiparar dicho nivel es remarcable. Estudios en otros modelos preclínicos como organoides o esferoides, en donde los artefactos propios de las líneas celulares no puedan perturbar estas interpretaciones pueden ayudar a validar estas observaciones. Para dar más sustento a estas observaciones, se llevó a cabo un ensayo de pérdida de función en donde células PC3 fueron transfectadas transientemente con un siRNA específico contra GLUT-5. La regulación negativa de la expresión de GLUT-5 alcanzó un 50% de disminución en la proliferación *in vitro*, efecto que no observado tanto en células PC3 sin transfectar o transfectadas con vehículo.

Finalmente, se analizó si fructosa podía sostener capacidades migratorias e invasivas, características analizadas para determinar la agresividad de células tumorales en función de su potencial metastásico. Mientras la capacidad migratoria no fue alterada por fructosa, la capacidad invasiva fue incrementada en presencia de fructosa comparada con glucosa en ambas

líneas celulares. Una posible explicación a este fenómeno puede residir en los mecanismos de transporte de vesículas, necesarias para la liberación de proteasas que se utilizan para romper la matriz extracelular en los procesos invasivos. Estudios previos han indicado que la capacidad invasiva de células de CaP puede ser suprimida al desregular GTPasas, como RAB7 (Steffan *et al.*, 2014) o Rab23 (Chang *et al.*, 2017). Bajo esta lógica, un incremento en el pool de GTP podría promover la actividad de estas GTPasas y consecuentemente una capacidad invasiva incrementada. El metabolismo de la fructosa aumenta la capacidad de biosíntesis de nucleótidos en células de cáncer pancreático (Liu *et al.*, 2010), mientras que la administración de fructosa en el agua de beber puede incrementar los sitios metastásicos de cáncer de mama (Fan *et al.*, 2017). Mas estudios se necesitan para probar esta conjetura.

Por último, y en búsqueda de perspectivas a largo plazo que pudieran dar luz a los mecanismos moleculares que modulan la respuesta biológica a la incubación con fructosa en las células de CaP, evaluamos que vías o genes podrían verse favorecidas en células PC3 estimuladas *in vitro* con 5mM glucosa o fructosa mediante un análisis transcriptómico. Dicho análisis informó que fructosa estimula significativamente genes relacionados a proliferación comparados con la estimulación con glucosa. De los genes estimulados se encontró sobreexpresión de factores protumorigénicos, de proliferación, así como citoquinas paracrinas como TGFb2, WNT-4 y FGF5, entre otros. Más análisis de pérdida de función de estos genes podrían proveer blancos potenciales mediante los cuales fructosa o sus metabolitos promueven proliferación de células de CaP y probablemente de otros tipos de células de cáncer.

5.2. Rol de fructosa en la estimulación del crecimiento tumoral en modelos preclínicos *in vivo* de CaP.

El análisis en modelos *in vivo* de CaP reportó resultados similares a lo observado *in vitro*. Al evaluar el tamaño a punto final de los tumores de xenotransplantes derivados de células PC3, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de glucosa y el control, mientras que los tumores de la condición en fructosa eran visualmente más grandes y significativamente mayores en peso. Es interesante notar que mientras el tratamiento con glucosa era indistinto a lo observado en fructosa al medir la proliferación de células de CaP *in vitro*, observamos que glucosa no se diferencia significativamente del tratamiento control (agua sin aditivos) en los modelos *in vivo*. Esto puede deberse a varias posibilidades; considerando que las células PC3 expresan tanto transportadores de glucosa como de fructosa y el hecho de que la proliferación y por ende el tamaño del tumor se vea favorecido solamente en la condición fructosa indicaría que algún cambio en el metabolismo del animal a causa del consumo de fructosa en la dieta promueva un ambiente en donde PC3 es más preponderante a crecer debido a, por ejemplo, una mayor disponibilidad de fructosa a nivel sistémico u otro metabolito proveniente del metabolismo de la fructosa en otros órganos como el hígado. Otra posibilidad complementaria es que las células PC3 se adapten metabólicamente para sacar mayor provecho al metabolismo fructolítico. Es necesario un estudio en donde se puedan controlar parámetros metabólicos en animales como los niveles de glucosa en suero, consumo y utilización de calorías y/o evaluando parámetros de inflamación podrían dar más luz sobre los efectos sistémicos del consumo de fructosa y su vinculación al aumento de la tasa proliferativa de estos tumores. Con esto en consideración, evaluamos la influencia de la dieta enriquecida en fructosa para estimular

un aumento en la expresión de transportadores de fructosa como GLUT-2, 5, 7, 9 y 11 en especímenes de tejidos de xenografts derivados de PC3. Nuestros resultados indican que GLUT-5 y GLUT-9 están significativamente aumentados en la condición fructosa comparado al control o a glucosa, lo que va acorde a lo obtenido en los resultados de transporte en células de CaP. Considerando que los niveles de fructosa en suero en ratones expuestos a estas dietas no fue medida, no es posible determinar cuál de estos dos transportadores de fructosa media mayormente la estimulación en proliferación celular, pero considerando los niveles de fructosa medidos en suero de pacientes humanos sanos alcanza valores cercanos a los 2mM, y que la capacidad de transporte de fructosa de GLUT-9 se satura en valores cercanos a 0,5mM en comparación a GLUT-5 (5-6mM), es muy probable que sea este último quien media dicho aumento en la proliferación celular. Aunque no significativamente, GLUT-1 tiene una tendencia a la disminución en la condición fructosa, aunque la falta de significancia estadística en GLUT-1 puede ser atribuible a un efecto de enmascarado causado por los altos niveles de expresión de esta isoforma en áreas hipóxicas peri-necróticas observadas en todos los tratamientos.

En paralelo se evaluó el efecto de fructosa en otro modelo murino de CaP utilizando xenotransplantes PDX (xenotransplantes derivados de pacientes) en donde se utilizaron biopsias de pacientes con CaP diagnosticado. Al evaluar el desarrollo tumoral a punto final, encontramos que tanto la arquitectura como la integridad de los tejidos se mantuvieron constantes durante todo el experimento. Análisis de la expresión de Ki-67 en secciones de tejido de PDX mostraron un incremento en el porcentaje de células Ki-67 positivas en la condición fructosa comparada a glucosa y el control. Además, expresión de GLUT-5 y 9 fue significativamente incrementada en fructosa comparado con la condición control, sin diferencias al comparar glucosa y la condición control. Es notable indicar que el efecto estimulante de fructosa sobre el crecimiento

tumoral ha sido reportado en algunos subtipos de cáncer intestinales (Goncalves *et al.*, 2019) y de mama (Fan *et al.*, 2017). Sin embargo, en CaP esto es más relevante debido a los a los bajísimos niveles intracelulares de GLUT-1 y que las células de CaP no son eficientemente observadas mediante FDG-PET.

En resumen, la incorporación de fructosa en la dieta de modelos preclínicos murinos de CaP es capaz de sostener la proliferación celular e incrementar el tamaño de los tumores de xenotrasplante con respecto a lo observado con glucosa, muy probablemente a un efecto directo de su metabolización en las células de CaP. Estos resultados en conjunto confirman que GLUT-5 tiene un rol importante en estimular el crecimiento tumoral en modelos *in vivo* de CaP expuestos a dieta con fructosa enriquecida. Además, dicha exposición incrementa la expresión de GLUT-5 y 9, demostrando sinergia entre la exposición a la fructosa en la dieta y la estimulación en la expresión de transportadores de fructosa.

En otro ámbito, algunos cuestionamientos pueden levantarse sobre si el incremento en el tamaño tumoral es dado por un aumento en los niveles periféricos de fructosa u otro componente sistémico. Se ha descrito que tanto la obesidad como el síndrome metabólico están fuertemente asociados con el cáncer y que podrían compartir un mecanismo en común en torno al consumo y metabolismo de la fructosa (Nakagawa *et al.*, 2020). La enzima KHK, que cataliza la fosforilación de fructosa a fructosa-1-fosfato se expresa principalmente en tejido hepático, por lo que originalmente se pensó que era el hígado el principal sitio de metabolización de la fructosa dietética (Diggle *et al.*, 2009; Ishimoto *et al.*, 2012). Sin embargo, Jang *et al.*, (2018) demostraron que la fructosa dietética es primariamente metabolizada en el intestino delgado, y que dosis suficientemente altas pueden sobrepasar dicha capacidad de metabolización, causando

un aumento de los niveles de fructosa tanto el hígado como a nivel periférico. Tomando en cuenta que la dosis proporcionada en el agua de fructosa (15% p/v) es significativamente mayor a los niveles de sacarosa encontrado en algunas gaseosas comerciales (aprox. 9% p/v), esto sugiere fuertemente que es fructosa en el sistema circulatorio periférico lo que este estimulando el crecimiento tumoral en los modelos preclínicos de CaP.

5.3. Rol de fructosa en la producción de ATP y lactato y su efecto sobre expresión enzimática en células de CaP.

Los efectos biológicos mediados por la incubación de fructosa en células de CaP depende, probablemente, de mecanismos intracelulares que responden a adaptaciones del metabolismo energético de estas células a la disponibilidad de nutrientes. Según lo descrito por DeBerardinis y Chandel, (2016), la reprogramación metabólica involucra un control sobre el flujo de metabolitos secundarios, en particular aquellos que interconectan distintas vías metabólicas, mediante cambios en la actividad enzimática, en las vías de señalización que controlan dichas vías o un conjunto de estas características. Para poder dilucidar como la incubación con fructosa altera el metabolismo energético de células de CaP, evaluamos si fructosa puede alterar los niveles de ATP y lactato intracelular además de medir los niveles de mRNA de algunas enzimas relevantes del metabolismo energético tumoral.

Los resultados obtenidos describen que los niveles de ATPi en células malignas de CaP aumentan significativamente al cabo de 72 horas de incubación con glucosa 5mM, y en menor medida, pero significativamente, con fructosa 5mM, efecto que no se replica en modelos benignos de próstata como RWPE-1. El rol del ATP en la carcinogénesis y la mantención del metabolismo tumoral ha sido descrito desde los trabajos de Otto Warburg (Warburg, Wind y

Negelein, 1927), en donde el ATP es fundamental para mantener los procesos celulares necesarios tanto para la proliferación celular como el balance redox en células tumorales. Lo que ha cambiado en el tiempo es su dependencia respecto a la glucólisis. La bibliografía reciente es clara en determinar que en un desacople entre la actividad del TCA con respecto a la glucólisis es necesaria para la homeostasis celular en cáncer. Esto debido a que además de sintetizar ATP sin depender de oxígeno, la glucólisis es exacerbada para incrementar el flujo de metabolitos hacia vías de biosíntesis (Israelsen *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha descrito que la actividad mitocondrial es necesaria para la proliferación celular y tumorigénesis (Weinberg *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2015; Martínez-Reyes *et al.*, 2016). Bajo estos antecedentes podemos deducir que al menos en los modelos estudiados en este trabajo, el aumento de ATPi en células malignas de CaP mediante incubación con glucosa o fructosa es causado, probablemente, por un aumento en la actividad glucolítica y a la no existente retroalimentación negativa de la vía glucolítica por aumento de los niveles de ATPi. Este aumento en la actividad glucolítica puede ir de la mano tanto de un aumento en la expresión de GLUT-5 y 9 así como de un aumento en la disponibilidad de estos transportadores en membrana, ambos eventos permitirían un aumento en el transporte de fructosa y su consiguiente incremento en los niveles de ATPi en el tiempo.

Por otra parte, es importante notar que los niveles de ATPi en los tratamientos con fructosa fueron menores a 72 horas con respecto a los observados al tratar con glucosa. Esta observación puede deberse a un aumento en la actividad fosforilativa de la enzima KHK y/o un mayor desvío de metabolitos hacia biosíntesis en vez de generar ATP mediante efecto Warburg. Además, el aumento en los niveles de ATPi dado el tratamiento con glucosa puede explicarse debido al aumento artificial en los niveles de GLUT-1 y su consecuente transporte de glucosa (Fig.2 A y B, segunda publicación). Estudios con pérdida de función en GLUT-1, 5 y/o 9 podrían

dar cuenta de que parte del metabolismo de fructosa es responsable del aumento de los niveles de ATPi.

Las células benignas RWPE-1 no ven alteraciones en sus niveles de ATPi en presencia de glucosa o fructosa, esto dado que, al no ser una célula tumoral, la actividad glucolítica y el TCA deben estar trabajando en tándem bajo mecanismos de regulación negativa cuando los niveles de ATP son lo suficientemente altos. Por otro lado, se ha descrito que la entrada constante de fructosa a hepatocitos causa una baja considerable de los niveles de ATP debido a la actividad fosforilativa de KHK (Charrez, Qiao y Hebbard, 2015), por lo que es relevante notar que la disminución de los niveles de ATPi en RWPE-1 con fructosa era un resultado esperado, pero no observado. Si nos referimos a la capacidad proliferativa de las células RWPE-1 (Fig.3, A, segunda publicación), podemos notar que la incubación con fructosa en RWPE-1 no es capaz de sostener la proliferación celular luego de 8 días en presencia de fructosa 5mM en el medio, lo que nos sugiere que de existir una disminución de los niveles de ATPi en las células RWPE-1 en presencia de fructosa, esta ocurra en un rango de tiempo mayor a 72 horas. En resumen, los niveles de ATPi pueden verse incrementados en células malignas de CaP, pero no en células benignas, bajo un mecanismo que depende del tiempo y del tipo de hexosa expuestos en el medio, dicho incremento debe ir de la mano con un aumento en el transporte de fructosa en el tiempo. Considerando que el nivel de ATPi corresponde a un equilibrio entre su síntesis y utilización, es probable que la disminución de los niveles de ATPi en fructosa en comparación a glucosa a las 72 horas, se deban a que fructosa esté siendo utilizada en mayor medida en la síntesis de otras moléculas necesarias para la proliferación celular.

Posteriormente se analizaron los niveles de lactato intracelular en células LNCaP y PC3 en presencia de glucosa o fructosa 5mM por 48 horas. Los datos obtenidos muestran un aumento significativo de dichos niveles en presencia de glucosa en ambos tipos celulares, y una importante disminución de los niveles de lactato intracelular al incubar con fructosa, siendo este fenómeno mucho más drástico en células PC3 que en LNCaP. El lactato se produce a partir de la reducción de piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y ha sido clásicamente vista como un producto de desecho del metabolismo glucolítico. Sin embargo, recientemente ha sido reconocida como un importante mediador de la tumorigénesis en algunos tipos de cáncer (Fidelito, Watt y Taylor, 2021). En CaP, se ha reportado que los niveles de LDH en suero suelen verse aumentados en pacientes con CaP de alto grado y este incremento está asociado a un mayor riesgo de mortalidad y progresión de la enfermedad mediante metástasis (Mori *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Por otra parte, los niveles de expresión del transportador de monocarboxilatos-4 (MCT4), proteína responsable del flujo de salida de lactato en células, está incrementada en tumores localizados y metastásicos de CaP (Pereira-Nunes *et al.*, 2020), sugiriendo que la producción de lactato y su utilización intracelular son importantes en la tumorigénesis de células de CaP. Estos datos muestran concordancia con lo observado en la Fig.4, en donde la incubación con glucosa incrementa los niveles de lactato intracelular, probablemente por un aumento de la tasa glucolítica respecto al tiempo inicial. La disminución de los niveles de lactato mediante tratamiento con fructosa es aún más interesante, ya que, si el nivel de lactato intracelular depende entonces de la actividad glucolítica, esto podría indicar que los metabolitos generados a partir de la fructólisis están siendo atrapados como metabolitos secundarios, probablemente en vías de biosíntesis necesarias para sostener la proliferación celular. Con respecto a la disminución pronunciada de los niveles de lactato intracelular en PC3

respecto a LNCaP, esta puede explicarse, en parte, por la actividad del receptor de andrógenos (AR). Algunos estudios realizados en células AR-negativas (PC3 y DU145) han reportado un incremento en la captación de glucosa y producción de lactato comparado a células AR-positivas (LNCaP y 22Rv1) (Vaz *et al.*, 2012; Pertega-Gomes *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2021). Estas observaciones sugieren que la señalización mediante AR promueve la entrada de piruvato hacia el ciclo TCA y su posterior oxidación, mientras la glucólisis aeróbica promovida por la ausencia de señalización de AR esta incrementada en estas células como PC3 y DU145. Dicho esto, la caída de los niveles de lactato puede verse amortiguada en LNCaP respecto a PC3 por que la actividad del AR empujaría parte del piruvato creado a partir de fructosa hacia lactato, evento que no ocurriría en PC3. Estos datos nos sugiere que la producción de lactato es dependiente del transporte y metabolización de glucosa y de, probablemente, la actividad del AR. Tomando en cuenta que algunos reportes indican que silenciar los transportadores MCT1/4 puede disminuir el crecimiento celular en células de CaP (Pereira-Nunes *et al.*, 2020), se necesita más estudios para dilucidar el real impacto de fructosa sobre la producción de lactato y como ésta es capaz de sostener la proliferación en condiciones de baja producción de lactato.

Finalmente, se analizó el impacto de la incubación con glucosa o fructosa 5mM en los niveles de expresión de enzimas relevantes para el metabolismo tumoral mediante qPCR. En términos generales no se encontraron diferencias significativas en los niveles de mRNA de las enzimas metabólicas seleccionadas salvo algunas excepciones. Este dato nos sugiere que, en el conjunto de enzimas sin diferencias detectables, el tiempo de incubación utilizado (72 horas) podría no ser suficiente para promover incrementos o disminuciones de las enzimas analizadas independiente de la hexosa utilizada. Estudios en tiempos mayores de exposición podrían promover o suprimir la expresión relativa de mRNA de algunas de estas enzimas en células de

CaP. Por otro lado, es importante comentar que, dada la poca información disponible en la bibliografía sobre la modulación de la expresión de enzimas mediada por fructosa, utilizar estudios de mayor espectro como estudios de transcriptómica (Fig. 3, suplementaria, publicación 2) o metabolómica podría entregar más datos respecto a que enzimas o factores que podrían verse afectados por fructosa y que expliquen los fenómenos descritos en proliferación y crecimiento tumoral mencionados en este trabajo de tesis.

Por otra parte, se obtuvieron incrementos en los niveles de HK-2 y G6PDH en células LNCaP y DU145 respectivamente al incubar con glucosa 5mM, mientras que la expresión de FASN en LNCaP se vio estimulada al incubar con fructosa 5mM. Esto nos sugiere que la adaptación a nivel de expresión relativa de mRNA puede ser afectada por la incubación con glucosa o fructosa, y que dicha estimulación es diferencial entre líneas celulares y entre hexosas disponibles. HK-2 cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato y ha sido descrito que sus niveles se promueven en cáncer, acorde al aumento de la tasa glucolítica (Ciscato *et al.*, 2021). Se ha descrito también que la actividad de HK-2 puede verse promovida por la actividad del AR (Moon *et al.*, 2011), lo que explicaría en parte el aumento de esta en LNCaP con respecto a células AR-negativas como DU145 o PC3. En el caso de G6PDH, se ha descrito que sus niveles, así como la actividad de la síntesis de ribosa, dependen de la actividad de AR en células LNCaP y 22Rv1 (Tsouko *et al.*, 2014). Por otra parte, la incubación con fructosa por 48 horas en células de cáncer de páncreas no presentó un aumento en los niveles de G6PDH, si no un incremento en la producción de ribosa-5-fosfato mediante la vía no oxidativa de la PPP mediante un incremento de la enzima transcetolasa (TKL) (Liu *et al.*, 2010). Probablemente sean otras enzimas, aquellas que componen la non ox-PPP las que estén siendo moduladas en respuesta a fructosa en células de CaP.

Con respecto a la enzima FASN, encargada de la síntesis de palmitato necesaria para alimentar la lipogénesis *de novo* (DNL), diversos estudios han vinculado el consumo de fructosa en la dieta con la generación de hígado graso no alcohólico de alto grado (DiStefano, 2020), mediante un mecanismo que involucra una estimulación de la DNL a través de un activador de genes llamado SREBP (Proteína Unida a Elemento Regulatorio Esteroidal, por sus siglas en inglés) (Nomura y Yamanouchi, 2012; Softic, Cohen y Kahn, 2016), que en consecuencia puede incrementar el nivel de varias enzimas, entre ellas FASN. Por otra parte, un estudio describió que dietas altas en grasas promueven el CaP metastásico utilizando modelos de CaP *in vivo*, mediante una activación aberrante del programa lipogénico mediado por SREBP (Chen *et al.*, 2018). También se ha descrito que la señalización de AR en CaP puede promover la expresión de enzimas como FASN (Loda *et al.*, 2009), lo que sugiere un rol importante de la DNL promovida por fructosa en células de CaP.

En resumen, el rol de fructosa en células de CaP es promover la proliferación celular mediante la actividad de un transporte específico, mediado en su mayor parte por el transportador GLUT-5, que puede promover la capacidad invasiva de estas células en desmedro de la incubación con glucosa. En modelos *in vivo*, la incorporación de fructosa en la dieta puede promover el crecimiento tumoral tanto en xenotransplantes derivados de células PC3 como de pacientes, mediante un aumento directo de los niveles de fructosa en la circulación periférica. Finalmente, la incubación con fructosa puede incrementar los niveles de ATPi en menor medida que la incubación con glucosa y disminuir los niveles de lactato en células de CaP, lo que puede indicar que los metabolitos generados a partir de la fructólisis están siendo utilizados en vías de biosíntesis, necesarias para mantener las tasas de proliferación reportadas. Finalmente, la incubación con fructosa puede modular la expresión de algunas enzimas de manera diferencial

a glucosa, así como promover la expresión de genes asociados a mecanismos proliferativos en células de CaP. Estos resultados demuestran que el metabolismo de la fructosa en células de CaP es capaz de promover parámetros celulares asociados a proliferación y agresividad tumoral. Dado que ya hemos descrito la caracterización de transportadores de fructosa en tumores de xenoinjerto y como la incorporación de fructosa en la dieta es capaz de estimular el crecimiento tumoral y la proliferación celular en distintos modelos preclínicos, el siguiente paso es comprender los mecanismos moleculares que median estos procesos. Análisis transcriptómicos y metabolómicos de células de CaP en presencia con fructosa en periodos cortos y largos de tiempo podrían expandir nuestro conocimiento sobre actores moleculares relevantes en mediar este proceso. Por otra parte, es muy importante llevar estas evidencias en un contexto de microambiente tumoral, donde otras células podrían ser partícipes de estos mecanismos, mediante estudios con otros modelos *in vitro* como organoides. Finalmente, estas evidencias también permiten dar más relevancia a los riesgos del sobreconsumo de fructosa en pacientes con riesgo de padecer CaP. Cada vez aumenta el número de reportes que asocian el consumo indiscriminado de esta hexosa sobre el riesgo de padecer un número importante de enfermedades, entre ellas el cáncer, Restringir su consumo puede evitar que tumores de CaP baja importancia clínica se vuelvan peligrosos en el tiempo, la dieta es uno de los pocos factores de riesgo que un paciente puede modificar en busca de disminuir el riesgo de padecer versiones más agresivas de CaP.

6. Conclusiones

Las tasas de incidencia del cáncer prostático se han mantenido estable desde el año 2018 en USA, mientras que, en países en vías de desarrollo, el CaP se ha vuelto el tipo de cáncer más preponderante en la población masculina. Este hecho nos sugiere que: 1), la investigación biomédica en CaP necesita mayores estudios sobre el origen del CaP con objetivo de modernizar las técnicas de detección temprana así como la de crear tratamientos efectivos con menores efectos secundarios y potencialmente curativos y 2), comprender, de mejor manera, como factores de riesgo tales como la dieta, y en específicamente, los componentes de la dieta que inciden sobre capacidades carcinogénicas, proliferativas, metastásicas y de resistencia a tratamientos en el CaP. Bajo esta perspectiva, el estudio del rol de fructosa en la biología del CaP es primero, novedosa y segundo, atingente al impacto de la industria de alimentos procesados y su efecto en la pandemia mundial de obesidad y síndrome metabólico, así como su vínculo con mayor riesgo de padecer cáncer. Este trabajo aporta evidencia contundente sobre como la incorporación de niveles altos de fructosa en la dieta promueve e incrementa la proliferación y agresividad de células de CaP. Futuros estudios que incorporen el efecto del microambiente tumoral que evalúen el impacto de fructosa sobre otros actores celulares como fibroblastos activados por cáncer, o macrófagos pueden dar más luces respecto a la adaptabilidad de las células de CaP ante la disponibilidad de metabolitos distintos de glucosa, como fructosa. Finalmente, el estudio del metabolismo fructolítico, desde su captación hasta su metabolización puede abrir un campo que aporte con nuevos blancos terapéuticos o de diagnósticos que puedan mejorar la identificación temprana de tumores de CaP de alto riesgo.

7. Referencias

- Allott, E.H., Masko, E.M. y Freedland, S.J. (2013) “Obesity and prostate cancer: weighing the evidence”, *European urology*, 63(5), pp. 800–809. doi:10.1016/J.EURURO.2012.11.013.
- Ameer, F., Scandiuizzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. y Zaidi, N. (2014) “De novo lipogenesis in health and disease”, *Metabolism*, 63(7), pp. 895–902. doi:10.1016/j.metabol.2014.04.003.
- Ancey, P.B., Contat, C. y Meylan, E. (2018) “Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment”, *The FEBS Journal*, 285(16), pp. 2926–2943. doi:10.1111/FEBS.14577.
- Augustin, R. (2010) “The protein family of glucose transport facilitators: It’s not only about glucose after all”, *IUBMB Life*, 62(5), pp. 315–333. doi:10.1002/IUB.315.
- Bender, H., Schomburg, A., Albers, P., Ruhlmann, J. y Biersack, H.J. (1997) “Possible role of FDG-PET in the evaluation of urologic malignancies”, *Anticancer research*, 17(3B), pp. 1655–1660. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9179213/> (Accedido: 9 de enero de 2022).
- Berger, C. y Zdzienbło, D. (2020) “Glucose transporters in pancreatic islets”, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2020 472:9, 472(9), pp. 1249–1272. doi:10.1007/S00424-020-02383-4.
- Birnbaum, M.J., Haspel, H.C. y Rosen, O.M. (1987) “Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription”, *Science (New York, N.Y.)*, 235(4795), pp. 1495–1498. doi:10.1126/SCIENCE.3029870.
- Boroughs, L.K. y DeBerardinis, R.J. (2015) “Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth”, *Nature cell biology*, 17(4), p. 351. doi:10.1038/NCB3124.
- Bose, S., Allen, A.E. y Locasale, J.W. (2020) “The Molecular Link from Diet to Cancer Cell Metabolism”, *Molecular Cell*, 78(6), pp. 1034–1044. doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.05.018.
- Brawley, S., Mohan, R. y Nein, C.D. (2018) “Localized Prostate Cancer: Treatment Options”, *American Family Physician*, 97(12), pp. 798–805. Disponible en: <https://www.aafp.org/afp/recommendations/search.htm>. (Accedido: 1 de febrero de 2022).
- Bray, G.A. (2007) “How bad is fructose?”, *The American journal of clinical nutrition*, 86(4), pp. 895–896. doi:10.1093/AJCN/86.4.895.
- Burant, C.F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G.I. y Davidson, N.O. (1992) “Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5.”, *The Journal of biological chemistry*, 267(21), pp. 14523–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1634504> (Accedido: 23 de agosto de 2016).

Carreño, D., Corro, N., Torres-Estay, V., Véliz, L.P., Jaimovich, R., Cisternas, P., San Francisco, I.F., Sotomayor, P.C., Tanasova, M., Inestrosa, N.C. y Godoy, A.S. (2019) “Fructose and prostate cancer: toward an integrated view of cancer cell metabolism”, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 22(1), pp. 49–58. doi:10.1038/s41391-018-0072-7.

Carreño, D. V., Corro, N.B., Cerda-Infante, J.F., Echeverría, C.E., Asencio-Barría, C.A., Torres-Estay, V.A., Mayorga-Weber, G.A., Rojas, P.A., Veliz, L.P., Cisternas, P.A., Montecinos, V.P., San Francisco, I.F., Varas-Godoy, M.A., Sotomayor, P.C., Castro, M.A., Nualart, F.J., Inestrosa, N.C. y Godoy, A.S. (2021) “Dietary Fructose Promotes Prostate Cancer Growth”, *Cancer Research*, 81(11), pp. 2824–2832. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0456.

Carvalho, K.C., Cunha, I.W., Rocha, R.M., Ayala, F.R., Cajaíba, M.M., Begnami, M.D., Vilela, R.S., Paiva, G.R., Andrade, R.G. y Soares, F.A. (2011) “GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker”, *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(6), pp. 965–972. doi:10.1590/S1807-59322011000600008.

Cerhan, J.R., Torner, J.C., Lynch, C.F., Rubenstein, L.M., Lemke, J.H., Cohen, M.B., Lubaroff, D.M. y Wallace, R.B. (1997) “Association of smoking, body mass, and physical activity with risk of prostate cancer in the Iowa 65+ Rural Health Study (United States)”, *Cancer causes & control : CCC*, 8(2), pp. 229–238. doi:10.1023/A:1018428531619.

Chang, J., Xu, W., Liu, G., Du, X. y Li, X. (2017) “Downregulation of Rab23 in Prostate Cancer Inhibits Tumor Growth In Vitro and In Vivo”, *Oncology research*, 25(2), pp. 241–248. doi:10.3727/096504016X14742891049118.

Charrez, B., Qiao, L. y Hebbard, L. (2015) “The role of fructose in metabolism and cancer”, *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 22(2), pp. 79–89. doi:10.1515/hmbci-2015-0009.

Chen, M., Zhang, J., Sampieri, K., Clohessy, J.G., Mendez, L., Gonzalez-Billalabeitia, E., Liu, X.S., Lee, Y.R., Fung, J., Katon, J.M., Menon, A.V., Webster, K.A., Ng, C., Palumbieri, M.D., DiIombi, M.S., Breitkopf, S.B., Teruya-Feldstein, J., Signoretti, S., Bronson, R.T., Asara, J.M., Castillo-Martin, M., Cordon-Cardo, C. y Pandolfi, P.P. (2018) “An aberrant SREBP-dependent lipogenic program promotes metastatic prostate cancer”, *Nature genetics*, 50(2), pp. 206–218. doi:10.1038/S41588-017-0027-2.

Chen, W.L., Wang, Y.Y., Zhao, A., Xia, L., Xie, G., Su, M., Zhao, L., Liu, J., Qu, C., Wei, R., Rajani, C., Ni, Y., Cheng, Z., Chen, Z., Chen, S.J. y Jia, W. (2016) “Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential”, *Cancer Cell*, 30(5), pp. 779–791. doi:10.1016/J.CCELL.2016.09.006.

Cheson, B.D. (2018) “PET/CT in Lymphoma: Current Overview and Future Directions”, *Seminars in nuclear medicine*, 48(1), pp. 76–81. doi:10.1053/J.SEMNUCLMED.2017.09.007.

Ciscato, F., Ferrone, L., Masgras, I., Laquatra, C. y Rasola, A. (2021) “Hexokinase 2 in Cancer: A Prima Donna Playing Multiple Characters”, *International Journal of Molecular Sciences*,

22(9), p. 4716. doi:10.3390/IJMS22094716.

Crimi, F., Valeggia, S., Baffoni, L., Stramare, R., Lacognata, C., Spolverato, G., Albertoni, L., Spimpolo, A., Evangelista, L., Zucchetta, P., Cecchin, D. y Pucciarelli, S. (2021) “[18F]FDG PET/MRI in rectal cancer”, *Annals of nuclear medicine*, 35(3), pp. 281–290. doi:10.1007/S12149-021-01580-0.

Cutruzzolà, F., Giardina, G., Marani, M., Macone, A., Paiardini, A., Rinaldo, S. y Paone, A. (2017) “Glucose metabolism in the progression of prostate cancer”, *Frontiers in Physiology*, 8(FEB). doi:10.3389/FPHYS.2017.00097.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G. y Thompson, C.B. (2008) “The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation.”, *Cell metabolism*, 7(1), pp. 11–20. doi:10.1016/J.CMET.2007.10.002.

DeBerardinis, R.J. y Chandel, N.S. (2016) “Fundamentals of cancer metabolism.”, *Science advances*, 2(5), p. e1600200. doi:10.1126/sciadv.1600200.

Diggie, C.P., Shires, M., Leitch, D., Brooke, D., Carr, I.M., Markham, A.F., Hayward, B.E., Asipu, A. y Bonthron, D.T. (2009) “Ketohehexokinase: Expression and Localization of the Principal Fructose-metabolizing Enzyme”, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(8), p. 763. doi:10.1369/JHC.2009.953190.

DiStefano, J.K. (2020) “Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis”, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(11), p. 2079. doi:10.1007/S00018-019-03390-0.

Doldi, V., Callari, M., Giannoni, E., D’Aiuto, F., Maffezzini, M., Valdagni, R., Chiarugi, P., Gandellini, P. y Zaffaroni, N. (2015) “Integrated gene and miRNA expression analysis of prostate cancer associated fibroblasts supports a prominent role for interleukin-6 in fibroblast activation”, *Oncotarget*, 6(31), pp. 31441–31460. doi:10.18632/ONCOTARGET.5056.

Echeverría, C., Nualart, F., Ferrada, L., Smith, G.J. y Godoy, A.S. (2021) “Hexose Transporters in Cancer: From Multifunctionality to Diagnosis and Therapy”, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 32(4), pp. 198–211. doi:10.1016/J.TEM.2020.12.006.

Effert, P., Beniers, A.J., Tamimi, Y., Handt, S. y Jakse, G. (2004) “Expression of Glucose Transporter 1 (Glut-1) in Cell Lines and Clinical Specimens from Human Prostate Adenocarcinoma”, *Anticancer Research*, 24(5A), pp. 3057–3064. Disponible en: <https://ar.iijournals.org/content/24/5A/3057> (Accedido: 8 de enero de 2022).

Fan, X., Liu, H., Liu, M., Wang, Y., Qiu, L. y Cui, Y. (2017) “Increased utilization of fructose has a positive effect on the development of breast cancer.”, *PeerJ*, 5, p. e3804. doi:10.7717/peerj.3804.

Fidelito, G., Watt, M.J. y Taylor, R.A. (2021) “Personalized Medicine for Prostate Cancer: Is Targeting Metabolism a Reality?”, *Frontiers in Oncology*, 11.

doi:10.3389/FONC.2021.778761.

Flier, J.S., Mueckler, M.M., Usher, P. y Lodish, H.F. (1987) “Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes”, *Science (New York, N.Y.)*, 235(4795), pp. 1492–1495. doi:10.1126/SCIENCE.3103217.

Freedland, S.J., Mavropoulos, J., Wang, A., Darshan, M., Demark-Wahnefried, W., Aronson, W.J., Cohen, P., Hwang, D., Peterson, B., Fields, T., Pizzo, S. V. y Isaacs, W.B. (2008) “Carbohydrate restriction, prostate cancer growth, and the insulin-like growth factor axis”, *The Prostate*, 68(1), pp. 11–19. doi:10.1002/PROS.20683.

Fujita, K., Hayashi, T., Matsushita, M., Uemura, M. y Nonomura, N. (2019) “Obesity, Inflammation, and Prostate Cancer”, *Journal of clinical medicine*, 8(2). doi:10.3390/JCM8020201.

Gandy, N., Arshad, M.A., Park, W.H.E., Rockall, A.G. y Barwick, T.D. (2019) “FDG-PET Imaging in Cervical Cancer”, *Seminars in nuclear medicine*, 49(6), pp. 461–470. doi:10.1053/J.SEMNUCLMED.2019.06.007.

Gao, W., Li, N., Li, Z., Xu, J. y Su, C. (2018) “Ketohehexokinase is involved in fructose utilization and promotes tumor progression in glioma”, *Biochemical and biophysical research communications*, 503(3), pp. 1298–1306. doi:10.1016/J.BBRC.2018.07.040.

Gasinska, A., Jaszczynski, J., Rychlik, U., Łuczynska, E., Pogodzinski, M. y Palaczynski, M. (2020) “Prognostic Significance of Serum PSA Level and Telomerase, VEGF and GLUT-1 Protein Expression for the Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy”, *Pathology oncology research: POR*, 26(2), pp. 1049–1056. doi:10.1007/S12253-019-00659-4.

Gathirua-Mwangi, W.G. y Zhang, J. (2014) “Dietary Factors and Risk of Advanced Prostate Cancer”, *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 23(2), p. 96. doi:10.1097/CEJ.0B013E3283647394.

Godoy, A., Ulloa, V., Rodríguez, F., Reinicke, K., Yañez, A.J., García, M. de los A., Medina, R.A., Carrasco, M., Barberis, S., Castro, T., Martínez, F., Koch, X., Vera, J.C., Poblete, M.T., Figueroa, C.D., Peruzzo, B., Pérez, F. y 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), pp. 614–27. doi:10.1002/jcp.20606.

Goncalves, M.D., Lu, C., Tutnauer, J., Hartman, T.E., Hwang, S.K., Murphy, C.J., Pauli, C., Morris, R., Taylor, S., Bosch, K. y al., et (2019) “High-fructose corn syrup enhances intestinal tumor growth in mice”, *Science*, 363, pp. 1345–1349.

Gonzalez-Menendez, P., Hevia, D., Alonso-Arias, R., Alvarez-Artme, A., Rodriguez-Garcia, A., Kinet, S., Gonzalez-Pola, I., Taylor, N., Mayo, J.C. y Sainz, R.M. (2018) “GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress”, *Redox biology*, 17, pp.

112–127. doi:10.1016/J.REDOX.2018.03.017.

Groheux, D., Cochet, A., Humbert, O., Alberini, J.L., Hindié, E. y Mankoff, D. (2016) “¹⁸F-FDG PET/CT for Staging and Restaging of Breast Cancer”, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 57 Suppl 1, pp. 17S-26S. doi:10.2967/JNUMED.115.157859.

Hanahan, D. y Weinberg, R.A.R. (2011) “Hallmarks of cancer: the next generation.”, *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hannou, S.A., Haslam, D.E., McKeown, N.M. y Herman, M.A. (2018) “Fructose metabolism and metabolic disease”, *The Journal of clinical investigation*, 128(2), pp. 545–555. doi:10.1172/JCI96702.

Vander Heiden, M.G., Lunt, S.Y., Dayton, T.L., Fiske, B.P., Israelsen, W.J., Mattaini, K.R., Vokes, N.I., Stephanopoulos, G., Cantley, L.C., Metallo, C.M. y Locasale, J.W. (2011) “Metabolic pathway alterations that support cell proliferation.”, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 76, pp. 325–34. doi:10.1101/sqb.2012.76.010900.

Vander Heiden, M.G. y DeBerardinis, R.J. (2017) “Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology”, *Cell*, 168(4), pp. 657–669. doi:10.1016/J.CELL.2016.12.039.

Higgins, L.H., Withers, H.G., Garbens, A., Love, H.D., Magnoni, L., Hayward, S.W. y Moyes, C.D. (2009) “Hypoxia and the metabolic phenotype of prostate cancer cells”, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(12), pp. 1433–1443. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.06.003.

Hsu, P.P. y Sabatini, D.M. (2008) “Cancer cell metabolism: Warburg and beyond.”, *Cell*, 134(5). doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.

Hui, H., Huang, D., McArthur, D., Nissen, N., Boros, L.G. y Heaney, A.P. (2009) “Direct spectrophotometric determination of serum fructose in pancreatic cancer patients.”, *Pancreas*, 38(6), pp. 706–12. doi:10.1097/MPA.0b013e3181a7c6e5.

Humphrey, P.A. (2012) “Histological variants of prostatic carcinoma and their significance”, *Histopathology*, 60(1), pp. 59–74. doi:10.1111/J.1365-2559.2011.04039.X.

Humphrey, P.A. (2017) “Histopathology of Prostate Cancer”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(10). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A030411.

Ishimoto, T., Lanaspa, M.A., Le, M.P.T., Garcia, G.E., Diggle, C.P., MacLean, P.S., Jackman, M.R., Asipu, A., Roncal-Jimenez, C.A., Kosugia, T., Rivarda, C.J., Maruyamad, S., Rodriguez-Iturbe, B., Sánchez-Lozada, L.G., Bonthron, D.T., Sauting, Y.Y. y Johnson, R.J. (2012) “Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), pp. 4320–4325. doi:10.1073/PNAS.1119908109/-/DCSUPPLEMENTAL.

- Israelsen, W.J., Dayton, T.L., Davidson, S.M., Fiske, B.P., Hosios, A.M., Bellinger, G., Li, J., Yu, Y., Sasaki, M., Horner, J.W., Burga, L.N., Xie, J., Jurczak, M.J., DePinho, R.A., Clish, C.B., Jacks, T., Kibbey, R.G., Wulf, G.M., Di Vizio, D., Mills, G.B., Cantley, L.C. y Vander Heiden, M.G. (2013) “PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells.”, *Cell*, 155(2), pp. 397–409. doi:10.1016/j.cell.2013.09.025.
- Jamroze, A., Chatta, G. y Tang, D.G. (2021) “Androgen receptor (AR) heterogeneity in prostate cancer and therapy resistance”, *Cancer letters*, 518, pp. 1–9. doi:10.1016/J.CANLET.2021.06.006.
- Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A.J., Morscher, R.J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G.J., Birnbaum, M.J. y Rabinowitz, J.D. (2018) “The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids”, *Cell metabolism*, 27(2), p. 351. doi:10.1016/J.CMET.2017.12.016.
- Jones, R.G. y Thompson, C.B. (2009) “Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth.”, *Genes & development*, 23(5), pp. 537–48. doi:10.1101/gad.1756509.
- Joshi, S., Tolkunov, D., Aviv, H., Hakimi, A.A., Yao, M., Hsieh, J.J., Ganesan, S., Chan, C.S. y White, E. (2015) “The Genomic Landscape of Renal Oncocytoma Identifies a Metabolic Barrier to Tumorigenesis”, *Cell reports*, 13(9), p. 1895. doi:10.1016/J.CELREP.2015.10.059.
- Kaida, H., Azuma, K., Kawahara, A., Takamori, S., Akiba, J., Fujimoto, K., Ishii, K. y Ishibashi, M. (2020) “Prognostic value of dual-point fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET imaging, partial volume correction and glucose transporter-1 expression in resected nonsmall cell lung cancer patients”, *Nuclear medicine communications*, 41(1), pp. 48–57. doi:10.1097/MNM.0000000000001118.
- Koh, Y.W., Lee, S.J. y Park, S.Y. (2017) “Differential expression and prognostic significance of GLUT1 according to histologic type of non-small-cell lung cancer and its association with volume-dependent parameters”, *Lung Cancer*, 104, pp. 31–37. doi:10.1016/J.LUNGCAN.2016.12.003.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L. y Dang, C. V. (2011) “Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism”, *Nature reviews. Cancer*, 11(5), pp. 325–337. doi:10.1038/NRC3038.
- Li, F., Xiang, H., Pang, Z., Chen, Z., Dai, J., Chen, S., Xu, B. y Zhang, T. (2020) “Association between lactate dehydrogenase levels and oncologic outcomes in metastatic prostate cancer: A meta-analysis”, *Cancer Medicine*, 9(19), p. 7341. doi:10.1002/CAM4.3108.
- Liu, H., Huang, D., McArthur, D.L., Boros, L.G., Nissen, N. y Heaney, A.P. (2010) “Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth.”, *Cancer research*, 70(15), pp. 6368–76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4615.
- Loda, M., Migita, T., Ruiz, S., Fornari, A., Fiorentino, M., Priolo, C., Zadra, G., Inazuka, F., Grisanzio, C., Palescandolo, E., Shin, E., Fiore, C., Xie, W., Kung, A.L., Febbo, P.G., Subramanian, A., Mucci, L., Ma, J., Signoretti, S., Stampfer, M., Hahn, W.C. y Finn, S. (2009)

“Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer”, *Journal of the National Cancer Institute*, 101(7), pp. 519–532. doi:10.1093/JNCI/DJP030.

Luczynska, E., Gasinska, A. y Wilk, W. (2012) “Expression of Ki-67 (MIB-1) and GLUT-1 proteins in non-advanced prostatic cancer”, *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, 63(4), pp. 272–277. doi:10.5114/PJP.2012.32480.

Lunt, S.Y. y Vander Heiden, M.G. (2011) “Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation”, *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp. 441–464. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154237.

Makarem, N., Bandera, E. V., Lin, Y., Jacques, P.F., Hayes, R.B. y Parekh, N. (2017) “Carbohydrate nutrition and risk of adiposity-related cancers: results from the Framingham Offspring cohort (1991-2013)”, *The British journal of nutrition*, 117(11), pp. 1603–1614. doi:10.1017/S0007114517001489.

Makarem, N., Bandera, E. V., Lin, Y., Jacques, P.F., Hayes, R.B. y Parekh, N. (2018) “Consumption of Sugars, Sugary Foods, and Sugary Beverages in Relation to Adiposity-Related Cancer Risk in the Framingham Offspring Cohort (1991-2013)”, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 11(6), pp. 347–358. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-17-0218.

Martínez-Reyes, I., Diebold, L.P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C.T., Mehta, M.M., Wang, T., Santos, J.H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J.N., Weinberg, S.E., Zhao, Y., DeBerardinis, R.J. y Chandel, N.S. (2016) “TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions”, *Molecular cell*, 61(2), pp. 199–209. doi:10.1016/J.MOLCEL.2015.12.002.

Matsushita, M., Fujita, K. y Nonomura, N. (2020) “Influence of Diet and Nutrition on Prostate Cancer”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). doi:10.3390/IJMS21041447.

Miles, F.L., Neuhouser, M.L. y Zhang, Z.F. (2018) “Concentrated sugars and incidence of prostate cancer in a prospective cohort”, *The British journal of nutrition*, 120(6), pp. 703–710. doi:10.1017/S0007114518001812.

Moon, J.-S., Jin, W.-J., Kwak, J.-H., Kim, H.-J., Yun, M.-J., Kim, J.-W., Park, S.W. y Kim, K.-S. (2011) “Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells.”, *The Biochemical journal*, 433(1), pp. 225–33. doi:10.1042/BJ20101104.

Mori, K., Kimura, S., Parizi, M.K., Enikeev, D. V., Glybochko, P. V., Seebacher, V., Fajkovic, H., Mostafaei, H., Lysenko, I., Janisch, F., Egawa, S. y Shariat, S.F. (2019) “Prognostic Value of Lactate Dehydrogenase in Metastatic Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis”, *Clinical genitourinary cancer*, 17(6), pp. 409–418. doi:10.1016/J.CLGC.2019.07.009.

Nakagawa, T., Lanaspa, M., Millan, I.S., Fini, M., Rivard, C., Sanchez-Lozada, L., Andres-Hernando, A., Tolan, D. y Johnson, R. (2020) “Fructose contributes to the Warburg effect for

cancer growth”, *Cancer & Metabolism*, 8(1). doi:10.1186/s40170-020-00222-9.

Nomura, K. y Yamanouchi, T. (2012) “The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(3), pp. 203–208. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.09.006.

Pavlova, N.N. y Thompson, C.B. (2016) “The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism”, *Cell metabolism*, 23(1), pp. 27–47. doi:10.1016/J.CMET.2015.12.006.

Paydary, K., Seraj, S.M., Zadeh, M.Z., Emamzadehfard, S., Shamchi, S.P., Gholami, S., Werner, T.J. y Alavi, A. (2019) “The Evolving Role of FDG-PET/CT in the Diagnosis, Staging, and Treatment of Breast Cancer”, *Molecular imaging and biology*, 21(1). doi:10.1007/S11307-018-1181-3.

Pereira-Nunes, A., Simões-Sousa, S., Pinheiro, C., Miranda-Gonçalves, V., Granja, S. y Baltazar, F. (2020) “Targeting lactate production and efflux in prostate cancer”, *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(11). doi:10.1016/J.BBADIS.2020.165894.

Pertega-Gomes, N., Felisbino, S., Massie, C.E., Vizcaino, J.R., Coelho, R., Sandi, C., Simoes-Sousa, S., Jurmeister, S., Ramos-Montoya, A., Asim, M., Tran, M., Oliveira, E., Lobo Da Cunha, A., Maximo, V., Baltazar, F., Neal, D.E. y Fryer, L.G.D. (2015) “A glycolytic phenotype is associated with prostate cancer progression and aggressiveness: a role for monocarboxylate transporters as metabolic targets for therapy”, *The Journal of Pathology*, 236(4), p. 517. doi:10.1002/PATH.4547.

Pfaffl, M.W. (2001) “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR”, *Nucleic Acids Research*, 29(9), p. e45. doi:10.1093/NAR/29.9.E45.

Prostate Cancer: Stages and Grades | Cancer.Net (sin fecha). Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/stages-and-grades> (Accedido: 8 de enero de 2022).

Proverbs-Singh, T., Feldman, J.L., Morris, M.J., Autio, K.A. y Traina, T.A. (2015) “Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development”, *Endocrine-related cancer*, 22(3), pp. R87–R106. doi:10.1530/ERC-14-0543.

Regina, A., Roux, F. y Revest, P.A. (1997) “Glucose transport in immortalized rat brain capillary endothelial cells in vitro: transport activity and GLUT1 expression”, *Biochimica et biophysica acta*, 1335(1–2), pp. 135–143. doi:10.1016/S0304-4165(96)00131-6.

Reinicke, K., Sotomayor, P., Cisterna, P., Delgado, C., Nualart, F. y Godoy, A. (2012) “Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in benign and malignant human prostate tissue.”, *Journal of cellular biochemistry*, 113(2), pp. 553–62. doi:10.1002/jcb.23379.

Salminen, E., Hogg, A., Binns, D., Frydenberg, M. y Hicks, R. (2002) “Investigations with FDG-PET scanning in prostate cancer show limited value for clinical practice.”, *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 41(5), pp. 425–9. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442917> (Accedido: 16 de agosto de 2016).

Shah, R.B. y Zhou, M. (2019) “Prostate Biopsy Interpretation”, *Prostate Biopsy Interpretation* [Preprint]. doi:10.1007/978-3-030-13601-7.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E. y Jemal, A. (2021) “Cancer Statistics, 2021”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), pp. 7–33. doi:10.3322/CAAC.21654.

Singh, K.K., Desouki, M.M., Franklin, R.B. y Costello, L.C. (2006) “Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues.”, *Molecular cancer*, 5, p. 14. doi:10.1186/1476-4598-5-14.

Softic, S., Cohen, D.E. y Kahn, C.R. (2016) “Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease.”, *Digestive diseases and sciences*, 61(5), pp. 1282–93. doi:10.1007/s10620-016-4054-0.

Steffan, J.J., Dykes, S.S., Coleman, D.T., Adams, L.K., Rogers, D., Carroll, J.L., Jill Williams, B. y Cardelli, J.A. (2014) “Supporting a role for the GTPase Rab7 in prostate cancer progression”, *PloS one*, 9(2). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0087882.

Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M.M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D. y Ralser, M. (2015) “The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway”, *Biological Reviews*, 90(3), pp. 927–963. doi:10.1111/brv.12140.

Stuani, L., Sabatier, M. y Sarry, J.E. (2019) “Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia”, *BMC biology*, 17(1), p. 57. doi:10.1186/S12915-019-0670-4.

Sun, J., Bok, R.A., Delos Santos, J., Upadhyay, D., Delos Santos, R., Agarwal, S., Van Criekinge, M., Vigneron, D.B., Aggarwal, R., Peehl, D.M., Kurhanewicz, J. y Sriram, R. (2021) “Resistance to Androgen Deprivation Leads to Altered Metabolism in Human and Murine Prostate Cancer Cell and Tumor Models”, *Metabolites*, 11(3), pp. 1–21. doi:10.3390/METABO11030139.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. y Bray, F. (2021) “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi:10.3322/CAAC.21660.

Tsouko, E., Khan, A.S., White, M.A., Han, J.J., Shi, Y., Merchant, F.A., Sharpe, M.A., Xin, L. y Frigo, D.E. (2014) “Regulation of the pentose phosphate pathway by an androgen receptor-mTOR-mediated mechanism and its role in prostate cancer cell growth.”, *Oncogenesis*, 3, p. e103. doi:10.1038/oncsis.2014.18.

Vasan, K., Werner, M. y Chandel, N.S. (2020) “Mitochondrial Metabolism as a Target for

Cancer Therapy”, *Cell metabolism*, 32(3), pp. 341–352. doi:10.1016/J.CMET.2020.06.019.

Vayalil, P.K. y Landar, A. (2015) “Mitochondrial oncobioenergetic index: A potential biomarker to predict progression from indolent to aggressive prostate cancer”, *Oncotarget*, 6(40), pp. 43065–43080. doi:10.18632/ONCOTARGET.5487.

Vaz, C. V., Alves, M.G., Marques, R., Moreira, P.I., Oliveira, P.F., Maia, C.J. y Socorro, S. (2012) “Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile”, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(11), pp. 2077–2084. doi:10.1016/J.BIOCEL.2012.08.013.

Wallace, D.C. (2012) “Mitochondria and cancer”, *Nature reviews. Cancer*, 12(10), pp. 685–698. doi:10.1038/NRC3365.

Warburg, O. (1956) “On the origin of cancer cells.”, *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), pp. 309–14.

Warburg, O., Wind, F. y Negelein, E. (1927) “THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY.”, *The Journal of general physiology*, 8(6), pp. 519–30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19872213> (Accedido: 16 de agosto de 2016).

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S. y Chandel, N.S. (2010) “Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), pp. 8788–8793. doi:10.1073/PNAS.1003428107.

World Health Organization (sin fecha) *Cancer*. Disponible en: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (Accedido: 22 de noviembre de 2021).

Xiao, H., Wang, J., Yan, W., Cui, Y., Chen, Z., Gao, X., Wen, X. y Chen, J. (2018) “GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer”, *The Prostate*, 78(2), pp. 86–94. doi:10.1002/PROS.23448.

Zhang, B., Xie, Z. y Li, B. (2019) “The clinicopathologic impacts and prognostic significance of GLUT1 expression in patients with lung cancer: A meta-analysis”, *Gene*, 689, pp. 76–83. doi:10.1016/J.GENE.2018.12.006.